

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA

DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS

**Liliana Scorzoni**

**"Modelos não convencionais para estudo de interação fungo- hospedeiro  
e ação antifúngica".**

Araraquara

2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA  
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS

**Liliana Scorzoni**

**"Modelos não convencionais para estudo de interação fungo- hospedeiro  
e ação antifúngica".**

Defesa de tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP como pré-requisito para obtenção do título de Doutor.

**Orientadora:** Profa. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini

**Coorientadores:** Profa. Dra Ana Marisa Fusco-Almeida

Dr. Oscar Zaragoza

Araraquara

2012

### **Ficha Catalográfica**

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP – Campus de Araraquara

Scorzoni, Liliana

**S423m** Modelos não convencionais para estudo de interação fungo- hospedeiro e ação antifúngica / Liliana Scorzoni. – Araraquara, 2012.  
144 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”.  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e  
Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Maria José Soares Mendes Giannini

Coorientadores: Ana Marisa Fusco-Almeida e Oscar Zaragoza

1. *Candida krusei*. 2. *Galleria mellonella*. 3. *Caenorhabditis elegans*. I. Mendes-Giannini, Maria José Soares, orient. II. Fusco-Almeida, Ana Marisa, coorient. III. Zaragoza, Oscar, coorient. IV. Título.

**CDD: 616.969**

**CAPES: 40300005**

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Micologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UNESP Araraquara e no Centro Nacional de Microbiologia do Instituto de Salud Carlos III, Espanha. Recebeu apoio financeiro da Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior (CAPES) e do PADC-FCFAR e do Ministerio de Asuntos Exteriores y de Cooperación y de la Agencia Española de Cooperación Internacional (MAEC-AECID).

Com muito amor dedico esse trabalho a minha família!

A minha GRANDE FAMÍLIA!

Não existem palavras para agradecer pelo apoio e incentivos dados nos momentos  
alegres ou difíceis!

Sem vocês não seria possível!

## AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Maria José Soares Mendes Giannini, pelo exemplo de dedicação e superação. Muito obrigada por confiar em meu trabalho e pelas grandes oportunidades de crescimento profissional e pessoal! O nosso limite está além do que imaginamos!

À Profa. Dra Ana Marisa, foi por causa dela que tudo começou! Má muito obrigada pelo incentivo e apoio que começou durante a época de faculdade. Com certeza seus “esporos” espalhados surtiram efeito.

Ao Dr. Oscar Zaragoza por duas vezes me conceder a oportunidade de estar em seu laboratório por aprender de tudo um pouco!! Com certeza é um grande exemplo de pessoa e ótimo pesquisador. Muito obrigada por não me deixar desanimar com os interessantes imprevistos da ciência.

Com muito carinho agradeço também a Rosangela, nossa querida Rô. Sou muito grata pela dedicação, pelos conselhos, puxões de orelha. Você é um detalhe que faz toda a diferença.

## Detalhes...

Ouvi por muitas vezes que os detalhes fazem a diferença, mas nunca tinha realmente entendido a essência dessa frase até que por maturidade ou por necessidade essa frase que é falada e jogada aos sete ventos fez todo sentido pra mim. Estou falando dos detalhes bonitos, não daqueles que muitas vezes são mínimos e que são notados sem necessidade. Gentileza, generosidade, ser prestativo, atencioso são qualidades sutis quando são verdadeiras e esses detalhes podem passar sem serem notados por nossa correria do dia a dia, mas a partir do momento que são percebidos fazem TODA A DIFERENÇA.

## Feliz dia do amigo

Lembrei-me dele e senti saudades... Tanto tempo que a gente não se vê! Dei-me conta, com uma intensidade incomum, da coisa rara que é a amizade. E, no entanto, é a coisa mais alegre que a vida nos dá. A beleza da poesia, da música, da natureza, as delícias da boa comida e da bebida perdem o gosto e ficam meio tristes quando não temos um amigo com quem compartilhá-las. A experiência da amizade parece ter suas raízes fora do tempo, na eternidade. Um amigo é alguém com quem estivemos desde sempre. Pela primeira vez estando com alguém, não sentia necessidade de falar. Bastava a alegria de estarem junto, um ao lado do outro. Porque um amigo é alguém cuja presença procuramos não por causa daquilo que se vai fazer juntos, seja bater papo, comer ou jogar. Até que tudo isso pode acontecer. Mas a diferença está em que, quando a pessoa não é amiga, terminando o alegre e animado programa, vêm o silêncio e o vazio – que são insuportáveis. Nesse momento o outro se transforma num incômodo que entulha o espaço e cuja despedida se espera com ansiedade. Com o amigo é diferente. Não é preciso falar. Basta a alegria de estarem juntos, um ao lado do outro. Amigo é alguém cuja simples presença traz alegria, independentemente do que se faça ou diga. Diante do amigo, sabemos que não estamos sós. E alegria maior não pode existir (por Rubem Alves – do livro ‘O retorno e Terno’).



Agradeço a meus amigos e companheiros de trabalho do Laboratório de Micologia Ana Carolina (Carol Tatoon), Aline, Caroline (Panta), Fer Sangalli, Fer Gullo, Haroldo, Julhiany, Jaqueline, Jana, Kaila, Mariana, Nayla, Natália, Patrícia (Laranja) Thaís, Tatiane, Torres, Rosângela, Rosemira, Regina, Suélen, Warley, Vanessa e Valter. Muito obrigada pelo convívio, paciência, força e desabafos nos momentos difíceis e por participarem das conquistas e vitórias.

Agradeço também a uma pessoa que recentemente entrou em minha vida, Gui, pela força e principalmente pela paciência, seu apoio foi fundamental!

As minhas queridas amigas latino-americanas Agustina e Ana Cecília as quais tiveram importantíssimo papel em desde o primeiro minuto de minha estância na Espanha. As queridas Espanholitas do ISCIII; Emília, Rocio, Cris Rodas, Núria, Alícia, Laura, Araceli, Teresa, Maria José, Ana, Letícia, Sara, Luis, Emílio. Ao pessoal do laboratório Gema, Cris A, Cris C, Olga, Susana, Charo, Ana Maria, Sergio sou extremamente grata pela recepção e pela ótima convivência com certeza me lembrarei com muita alegria de cada uma!

Aos meus amigos de toda vida, Mari Carla, Mari Coelho, Diego, Pedro (Mão), o tempo e a distância apenas serviram para aumentar nosso carinho. Obrigada pela força de sempre!

## SUMÁRIO

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....	29
LISTA DE TABELA.....	30
LISTA DE FIGURAS .....	31
Capítulo 1 .....	18
RESUMO.....	19
INTRODUÇÃO .....	21
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
1. Modelos animais não convencionais:.....	32
2. Efeito dos antifúngicos em macrófagos: .....	32
3. Agrotransformação: .....	32
MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
1. Modelo <i>Galleria mellonella</i> .....	33
1.1. Cepas e condições de cultivo .....	33
1.2. Condições de manipulação e incubação de larvas de <i>Galleria mellonella</i> .....	33
1.3. Ensaio de sobrevivência.....	33
1.4. Ensaio de virulência a diferentes temperaturas.....	34
1.5. Curva de crescimento a diferentes temperaturas .....	34
1.6. Ensaio de fagocitose em <i>G. mellonella</i> .....	34
1.7. Determinação da densidade hemocitária .....	35
1.8. Teste de filamentação.....	35
1.9. Quantificação da melanização .....	35
1.10. Tratamento com drogas antifúngicas .....	35
1.11. Teste de toxicidade a antifúngicos .....	36

1.12. Efeito dos antifúngicos sobre a fisiologia de <i>G. mellonella</i> infectadas com leveduras.....	36
1.13. Determinação da carga fúngica .....	36
1.14. Histopatologia .....	37
1.15. Estatísticas .....	37
2. Modelo <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	37
2.1. Cepas e condições de cultivo .....	37
2.2. Condições de manipulação e infecção de <i>C. elegans</i> .....	37
2.3. Virulência e eficácia antifúngica .....	38
2.4. Teste de toxicidade a antifúngicos.....	38
2.5. Curva de crescimento a diferentes temperaturas .....	38
2.6. Estatísticas .....	39
3. Efeitos de anfotericina B e fluconazol na fagocitose .....	39
3.1. Cepas e condições de cultivo .....	39
3.2. Determinação da citotoxicidade de anfotericina B e fluconazol.....	39
3.3. Ensaio de fagocitose .....	40
3.4. Microscopia e processamento dos dados .....	40
3.5. Obtenção e cultivo de macrófagos primários.....	40
3.6. Quantificação de citocinas produzidas pelos macrófagos RAW 264.7 e pelos macrófagos primários.....	41
3.7. Estatísticas.....	41
4. Transformação genética de <i>C. albicans</i> e <i>C. krusei</i> mediada por <i>A. tumefaciens</i> .....	41
4.1. Microorganismo, cultivo e vetor.....	41
4.2. Avaliação da sensibilidade à higromicina ou nourseotricina .....	42
4.3. Preparação de células quimiocompetentes .....	42
4.4. Transformação da bactéria <i>A. tumefaciens</i> .....	42

4.5 Agrotransformação .....	42
4.6. Avaliação da morfologia macroscópica e microscópica.....	43
4.7. Avaliação da capacidade de produção de biofilmes <i>in vitro</i> das cepas transformantes de <i>C. albicans</i> .....	43
4.8. Quantificação do biofilme pelo XTT .....	43
4.9. Avaliação da atividade da fosfolipase e proteinase .....	44
4.10. Avaliação da atividade de hemolisina .....	44
4.11. Avaliação da sensibilidade a diferentes drogas antifúngicas .....	44
4.12. Cultura de células.....	45
4.13. Ensaio de adesão.....	45
4.14. Ensaio de invasão .....	45
4.15. Análise molecular dos transformantes.....	46
RESULTADOS.....	47
1. Modelo <i>Galleria mellonella</i> .....	47
1.2. Resposta de <i>G. mellonella</i> à infecção por <i>C. krusei</i> ou <i>C. albicans</i> ....	47
1.3. Virulência de <i>C. krusei</i> em diferentes temperaturas .....	48
1.4. Curva de crescimento a diferentes temperaturas .....	50
1.5. Fagocitose, Filamentação e Densidade Hemocitária .....	50
1.6. Melanização .....	52
1.7. Tratamento antifúngico em <i>G. mellonella</i> .....	53
1.8. Determinação da carga fúngica .....	58
1.9. Efeito dos antifúngicos sobre a fisiologia de <i>Galleria mellonella</i> durante a infecção.....	59
1.10. Histopatologia .....	61
2. Modelo <i>Caenorhabditis elegans</i> .....	62
2.1. Influência da temperatura na virulência de <i>C. krusei</i> e <i>C. albicans</i> ....	64

2.2. Influência da cascata imunológica de TGF- $\alpha$ na sensibilidade a <i>C. krusei</i> .....	65
3. Efeitos da anfotericina B e fluconazol sob macrófagos RAW 267.7. infectados com <i>C. albicans</i> ou <i>C. krusei</i> .....	65
3.1. Quantificação da fagocitose de <i>C. albicans</i> e <i>C. krusei</i> por macrófagos RAW 267.7 .....	67
3.2. Quantificação de citocinas produzidas por linhagem de macrófagos RAW 267.7. ....	68
3.3. Quantificação de citocinas produzidas por macrófagos primários .....	69
4.0. Transformação genética de <i>C. albicans</i> e <i>C. krusei</i> mediada por <i>A. tumefaciens</i> .....	75
4.1. Morfologia macroscópica e microscópica dos transformantes de <i>C. albicans</i> .....	75
4.2. Avaliação da capacidade de produção e quantificação de biofilme <i>in vitro</i> das cepas transformantes de <i>C. albicans</i> .....	76
4.3. Avaliação da atividade de fosfolipases, proteinase e hemolisina.....	77
4.4. Avaliação da sensibilidade a diferentes antifúngicos .....	77
4.5. Ensaio de adesão e invasão.....	77
4.6. Análise molecular dos transformantes .....	79
DISCUSSÃO.....	80
CONCLUSÃO .....	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	90
Capítulo 2.....	107

## ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

TLR: Toll like receptor (receptor Toll like)

IL: Interleukin (Interleucina)

TNF- $\alpha$ : Tumor necrosis factor - $\alpha$  (Fator de necrose tumoral- $\alpha$ )

DNA: Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)

BHI: Brain Heart Infusion

DO: Densidade ótica

MAPK: Mitogen-activated protein kinase

XTT: [2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5]

LB: Meio Luria-Bertanni

YNB: Yeast Nitrogen Base

BSA: Soro Albumina Bovina

CFUs: Unidades Formadoras de Colônia

## LISTA DE TABELA

Tabela 1: Doses terapêuticas e doses testadas para os antifúngicos utilizados* .....	36
Tabela 2: Capacidade de formação de biofilme dos transformantes de <i>C. albicans</i> pelo ensaio do XTT. ....	76

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Curva de sobrevivência de *G. mellonella* infectadas com distintas concentrações de *C. albicans* (A) ou *C. krusei* (B) incubadas a 37°C..... 47
- Figura 2: Larvas infectadas com  $5 \times 10^6$  ufc/larva de *C. krusei* ATCC 6258 e  $10^6$  ufc/larva de *C. albicans* SC5314 mortas com 4% de paraformaldeído por uma hora e incubadas a 37°C..... 48
- Figura 3: Teste de virulência em diferentes temperaturas. *C. albicans* SC5314 (A), *C. krusei* ATCC 6258 (B), isolado clínico de *C. krusei* CL8053 (C); isolado clínico de *C. krusei* CL80317 (D) incubados a 30 e 37°C. .... 49
- Figura 4: Curva de crescimento de *C. albicans* SC5314 (A) e *C. krusei* ATCC 6258 (B) realizada a 37°C ou 30°C. .... 50
- Figura 5: Fagocitose de *C. albicans* SC5314 e *C. krusei* ATCC 6258 em *G. mellonella* coloração feita por calcofluor (A) Filamentação encontrada nos tecidos de *G. mellonella* infectados com *C. albicans* SC5314 ou *C. krusei* ATCC 6258 (B). Porcentagem de fagocitose observada em larvas infectadas com *C. albicans* SC5314, *C. krusei* ATCC 6258 ou isolados clínicos CL8053 e CL80317 (C). Densidade hemocitária de *G. mellonella* infectadas com *C. albicans*, *C. krusei* e isolados clínicos (D). *C. neoformans* H99 foi usado como controle nos ensaios de fagocitose e densidade hemocitária, (\*  $p < 0,05$ )..... 51
- Figura 6: Melanização produzida em larvas infectadas com distintas concentrações de *C. krusei* ATCC 6258 (A). Quantificação da melanização a partir da densidade óptica (O.D.) da hemolinfa das larvas infectadas com *C. krusei* ATCC 6258 (B) e isolados clínicos (C e D) nas concentrações de  $5 \times 10^5$ ,  $10^6$ ,  $5 \times 10^6$  ufc/larva. Valores em três e em 24 horas, (\*  $p < 0,05$ )..... 52
- Figura 7: Eficácia de tratamento com fluconazol. Larvas infectadas com  $5 \times 10^6$  ufc/larva *C. krusei* e tratadas com fluconazol nas concentrações de 4 e 12 mg/kg. (A) e 32, 64 e 128 mg/kg (B). Larvas infectadas com  $5 \times 10^5$  ufc/larva *C. albicans* e tratadas com fluconazol nas concentrações de 4 e 12mg/kg. (C) e 32, 64 e 128 mg/kg (D)..... 54
- Figura 8: Eficácia de tratamento com anfotericina B. Larvas infectadas com  $5 \times 10^6$  ufc/larva *C. krusei* e tratadas com anfotericina B nas concentrações de 1, 2 e 4 mg/kg. (A) Larvas infectadas com  $5 \times 10^5$  ufc/larva *C. albicans* e tratadas com anfotericina B nas concentrações de 1, 2 e 4 mg/kg (B). .... 55
- Figura 9: Eficácia de tratamento com caspofungina. Larvas infectadas com  $5 \times 10^6$  ufc/larva *C. krusei* e tratadas com caspofungina nas concentrações de 1, 2 e 4 mg/kg. (A) Larvas infectadas com  $5 \times 10^5$  ufc/larva *C. albicans* e tratadas com caspofungina nas concentrações de 1, 2 e 4 mg/kg (B). .... 56



Figura 10: Teste de toxicidade realizado com fluconazol 32, 64 e 128 mg/kg, anfotericina B 1, 2 e 4 mg/kg e caspofungina 1, 2 e 4 mg/kg. ....	57
Figura 11: Combinação de antifúngicos em doses subterapêuticas para o tratamento de infecção por <i>C. krusei</i> . ....	58
Figura 12: Efeito do tratamento antifúngico na carga fúngica de larvas infectadas com $5 \times 10^6$ cells/larvae de <i>C. krusei</i> ou com $5 \times 10^5$ cells/larvae de <i>C. albicans</i> . Barras em preto - larvas sem tratamento, barras em branco - tratamento com fluconazol (12 mg/kg), barras em cinza – tratamento com anfotericina B (4mg/kg) * $p < 0,05$ . ....	59
Figura 13: Densidade hemocitária de larvas infectadas com <i>C. albicans</i> ou <i>C. krusei</i> (A) tratadas com fluconazol 64 mg/kg ou anfotericina B 4 mg/kg; Densidade óptica (D.O) da hemolinfa de larvas infectadas com <i>C. albicans</i> ou <i>C. krusei</i> tratadas com fluconazol 64 mg/kg ou anfotericina B 4 mg/kg (B). Barras pretas - sem tratamento; barras brancas - anfotericina B 4 mg/kg; barras cinzas - fluconazol 64mg/kg, (* $p < 0,05$ ). ....	60
Figura 14: Percentual de fagocitose de larvas infectadas com <i>C. albicans</i> ou <i>C. krusei</i> tratadas com fluconazol 64 mg/kg (FLZ 64) ou Anfotericina B 4 mg/kg (AMB 4.0). ....	60
Figura 15: Histopatologia de <i>G. mellonella</i> infectadas com <i>C. krusei</i> ou <i>C. albicans</i> e tratadas com diferentes antifúngicos. <i>G. mellonella</i> infectada com $5 \times 10^5$ ufc/larva de <i>C. albicans</i> (C-H), ou com $5 \times 10^6$ ufc/larva de <i>C. krusei</i> (K-P). O processamento histopatológico foi realizado após 96 horas de infecção. Controle sem infecção (A, B, I, J), larvas infectadas e sem tratamento (C, D, K, L), larvas infectadas e tratadas com fluconazol 12 mg/kg, (E, F, M and N), larvas infectadas e tratadas com anfotericina B 4 mg/kg. (G, H, O and P). Aumento de 10x (A, C, E, G, I, K, M, O), aumento de 64x. (B, D, F, H, J, L, N ,P).....	61
Figura 16: Larvas de <i>C. elegans</i> AU37 <i>glp-4(bn2)I</i> ; <i>sek-1(km4)</i> , infectadas por <i>C. albicans</i> , <i>C. krusei</i> ou <i>E. coli</i> OP50, não patogênico para as larvas. ....	63
Figura 17: Eficácia terapêutica em modelo <i>C. elegans</i> usando cepa AU37 <i>glp-4(bn2)I</i> ; <i>sek-1(km4)</i> Tratamento com anfotericina B 2 µg/mL, fluconazol 12 µg/mL e caspofungina 2 µg/mL com larvas infectadas com <i>C. krusei</i> (A). <i>C. albicans</i> (B); Combinação de antifúngicos para tratamento de larvas infectadas com <i>C. krusei</i> (C). ....	63
Figura 18: Virulência de <i>Candida albicans</i> SC5314 e <i>C. krusei</i> ATCC 6258 em <i>C. elegans</i> (A). Curva de crescimento de <i>C. albicans</i> SC5314 e <i>C. krusei</i> ATCC 6258 realizada a 25°C (B) .....	64

Figura 19: Influência da cascata imunológica de TGF- $\alpha$ na sensibilidade a <i>C. krusei</i> . Sobrevivência das cepas N2, selvagem e NU3 <i>dbl-1</i> ( <i>nk3</i> ) infectadas com <i>C. krusei</i> .....	65
Figura 20: Cinética de fagocitose de <i>C. krusei</i> no interior dos macrófagos RAW 267.7.....	66
Figura 21 Cinética de fagocitose de <i>C. albicans</i> no interior dos macrófagos RAW 267.7.....	67
Figura 22: Percentual de fagocitose de macrófagos RAW 267.7 infectados com <i>C. albicans</i> (A) ou <i>C. krusei</i> (B) e tratados com anfotericina B 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e fluconazol 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ .....	68
Figura 23: Valores de TNF $\alpha$ ( $\text{pg}/\text{mL}$ ) produzidas por macrófagos RAW infectados com <i>C. albicans</i> ou <i>C. krusei</i> e tratados com fluconazol (A), macrófagos RAW infectados com <i>C. albicans</i> ou <i>C. krusei</i> e tratados com anfotericina B (B).....	69
Figura 24: Valores de TNF $\alpha$ ( $\text{pg}/\text{mL}$ ) produzidas por macrófagos primários infectados com <i>C. albicans</i> ou <i>C. krusei</i> e tratados com fluconazol 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ou anfotericina B 0,5 e 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , (* $p < 0,05$ ).....	70
Figura 25: Valores de IL-1-b ( $\text{pg}/\text{mL}$ ) produzidas por macrófagos primários infectados com <i>C. albicans</i> ou <i>C. krusei</i> e tratados com fluconazol 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ou anfotericina B 0,5 e 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , (* $p < 0,05$ ).....	71
Figura 26: Valores de IL-6 ( $\text{pg}/\text{mL}$ ) produzidas por macrófagos primários infectados com <i>C. albicans</i> ou <i>C. krusei</i> e tratados com fluconazol 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ou anfotericina B 0,5 e 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , (* $p < 0,05$ ).....	72
Figura 27: Valores de IL-10 ( $\text{pg}/\text{mL}$ ) produzidas por macrófagos primários infectados com <i>C. albicans</i> ou <i>C. krusei</i> e tratados com fluconazol 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ou anfotericina B 0,5 e 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , (* $p < 0,05$ ).....	73
Figura 28: Valores de IL-17 ( $\text{pg}/\text{mL}$ ) produzidas por macrófagos primários infectados com <i>C. albicans</i> ou <i>C. krusei</i> e tratados com fluconazol 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ou anfotericina B 0,5 e 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , (* $p < 0,05$ ).....	74
Figura 29: Características macroscópicas e microscópicas (coloração de Gram) de transformantes de <i>C. albicans</i> .....	75
Figura 30: Teste de adesão realizado pelo ensaio de contagem de unidades formadoras de colônias dos transformantes de <i>C. albicans</i> realizado em linhagem de queratinócitos NOK.....	78

Figura 31: Teste de invasão realizado pelo ensaio de contagem de unidades formadoras de colônias dos transformantes de *C. albicans* realizado em linhagem de queratinócitos NOK..... 78

# Capítulo 1

## RESUMO

A incidência de infecções fúngicas oportunistas tem aumentado nas últimas décadas devido à crescente proporção de pacientes imunocomprometidos em nossa sociedade. *Candida krusei* é descrita como um dos agentes de infecções fúngicas em pacientes susceptíveis. Embora sua prevalência seja baixa entre as infecções fúngicas (2-7%), a resistência intrínseca ao fluconazol torna esta levedura importante no contexto relacionado à epidemiologia e na procura de novas alternativas terapêuticas. Modelos de organismos não mamíferos são alternativas viáveis para estudar a virulência de fungos e eficácia de drogas. Neste trabalho utilizou-se *Galleria mellonella* e *Caenorhabditis elegans* como modelos para estudar a virulência e avaliar a eficácia antifúngica de anfotericina B e fluconazol durante a infecção por *C. krusei*, bem como cultura de macrófagos e testes de agrotransformação. No modelo de *G. mellonella* foi realizada a caracterização completa da interação de *C. krusei* por meio da determinação do índice de fagocitose, quantificação da densidade hemocitária, melanização, estudos de filamentação, carga fúngica e histopatologia. Além disso, foi realizado estudo de eficácia antifúngica entre *G. mellonella* e *C. elegans* mostrando resultados compatíveis entre os dois modelos. Além disso, utilizou-se cultura de macrófagos RAW 267.7 para verificar o efeito das duas drogas sobre a fagocitose e produção de citocinas quando as células foram infectadas com *C. krusei*. Não houve alterações quanto à fagocitose nesse modelo, entretanto a produção de TNF- $\alpha$  mostrou-se excessivamente aumentada com o tratamento com anfotericina sugerindo que além do efeito direto da droga existem também mecanismos de imunomodulação envolvidos nessa resposta. A construção de transformantes é alternativa de estudo de virulência e patogenicidade dos fungos; por agrotransformação obteve-se mutantes com distintos fenótipos quanto à produção de biofilme, atividade de fosfolipases, proteinase e hemolisina, adesão e invasão de linhagem de queratinócitos NOK. Os dados deste estudo contribuíram para o maior entendimento da relação *C. krusei*-hospedeiro.

## ABSTRACT

The incidence of opportunistic fungal infections has increased in the last decades due to the increasing proportion of immunocompromised patients. *Candida krusei* is described as one of the agents of fungal infections in susceptible patients. Although its prevalence is low among fungal infections (2-7%), the intrinsic resistance to fluconazole makes this yeast important in this context related to epidemiology and new therapies. Models of non-mammalian are viable alternatives to study virulence of fungi and drug efficacy. In this work we used *Galleria mellonella* and *Caenorhabditis elegans* as models for studying virulence and evaluate the efficacy of antifungal agent's amphotericin B, fluconazole and caspofungin during infection by *C. krusei*, and *C. albicans*, as well as, macrophages and agrotransformation studies. The model of *G. mellonella* was done full characterization of the interaction with *C. krusei* by determining the phagocytosis index, measuring the density haemocytic, melanization, filamentation studies, fungal burden and histopathology. In addition, we conducted a study of antifungal efficacy between *G. mellonella* and *C. elegans* showing compatible results between the two models. Furthermore, we used macrophage culture RAW 267.7 to determine the effect of drugs amphotericin B and fluconazole on phagocytosis and production of cytokines when the cells were infected with *C. krusei* and *C. albicans*. There was no change on the phagocytosis in this model, however, the production of TNF- $\alpha$  was shown to be excessively increased with treatment with amphotericin suggesting that in addition to the direct effect of the drug, immunomodulation mechanisms are also involved in this response. The construction of transformants is an alternative study virulence and pathogenicity of fungi; obtained by agro transformation mutants with distinct phenotypes for the production of biofilm, phospholipases and proteinase activities, hemolysin, adhesion and invasion of keratinocyte NOK strain. Data from this study contributed to a better understanding *C. krusei*-host interaction.

## INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas são importantes causas de morbidade e mortalidade por todo o mundo. Apesar da melhoria das técnicas diagnósticas e aumento da disponibilidade de drogas antifúngicas mais eficazes e com menor toxicidade, as micoses continuam com alta incidência, gerando altos custos de internação e tratamento. Os principais fatores de risco para o desenvolvimento de micoses invasoras são infecção por HIV, neutropenia, quimioterapia, transplantes hematopoéticos e transplante de órgãos, corticoterapia, uso de dispositivos intravasculares, antibióticos de amplo espectro. Relatos de infecções por leveduras pouco frequentes como *Trichosporon*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus* não-*neoformans* tem sido descritas, entretanto as espécies do gênero *Candida* ainda prevalecem como principal agente causador dessas infecções (Miceli, Diaz *et al.*, 2011; Peman e Salavert, 2012).

Atualmente são conhecidas mais de cem espécies de *Candida*, entretanto essas infecções em sua maioria são causadas por *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei* e uma minoria tem como responsáveis *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae* e *C. rugosa* (Horn, Neofytos *et al.*, 2009). A espécie com maior incidência é *C. albicans* e a distribuição epidemiológica das outras espécies pode variar geograficamente e também com o tipo de paciente e práticas médicas. *C. parapsilosis* tem alta incidência em pacientes neonatos; *C. krusei* está associada à profilaxia ou uso de fluconazol e a pacientes com câncer assim como *C. glabrata*, *C. tropicalis* que infectam principalmente pacientes com neoplasias hematológicas (Peman, Canton *et al.*, 2012; Peman e Salavert, 2012).

*C. albicans* é levedura comensal, especializada e adaptada para sobreviver no trato gastrointestinal e genital de indivíduos sadios, raramente é encontrada no ambiente, entretanto, pode tornar-se potencialmente patogênica causando infecções superficiais e sistêmicas (Rangel-Frausto, Wiblin *et al.*, 1999; Shao, Huang *et al.*, 2007). Apesar de *C. albicans* ser parte da microbiota normal de humanos essa relação comensal pode ser interrompida por desequilíbrios no hospedeiro (alteração na microbiota devido a uso de

antibióticos, imunossupressão). Isso obriga essa levedura a expressar diferentes mecanismos para se defender das alterações produzidas no organismo do hospedeiro tornando-se assim patogênica. Na verdade, a transição de comensal para patógeno pode ser atribuída a um extenso repertório de virulência determinado por condições predisponentes adequadas (Hube, 2004; Miceli, Diaz *et al.*, 2011). Os fatores de virulência são expressos dependendo do tipo de manifestação clínica, do local, estágio de infecção e também a natureza da resposta do hospedeiro e estes incluem a capacidade de alterar a morfologia celular (blastoconídios para produção de hifas), fatores responsáveis pela adesão, atividade extracelular de enzimas e produção de biofilme (Naglik, Albrecht *et al.*, 2004; Ramage, Mowat *et al.*, 2009).

No Brasil, o maior estudo epidemiológico envolvendo nove cidades localizadas na região central, sul, sudeste aponta uma incidência de 2,49 casos/1000 admissões (Colombo, Nucci *et al.*, 2006). Na região nordeste a incidência é de 3,9 /1000 admissões, no sul, no estado do Paraná 1,27/1000, no sudeste, em São Paulo 1,66 /1000. *C. albicans* é a espécie mais frequente seguida de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* as quais variam sua incidência dependendo da região (Colombo, Nucci *et al.*, 2006; Nucci e Colombo, 2007; Franca, Ribeiro *et al.*, 2008; Hinrichsen, Falcao *et al.*, 2008). Os valores de incidência são altos em comparação com as incidências encontradas na Espanha, 0,92 casos /1000 internações (Peman, Canton *et al.*, 2012), França 0,29/1000 (Richet, Roux *et al.*, 2002) e Estados Unidos 0.28–0.96 casos /1000 internações (Pfaller e Diekema, 2007; 2010).

Recente estudo englobando Europa, América Latina e América do Norte compara a epidemiologia de candidemias em unidades de terapia intensiva (UTI) e em outros ambientes hospitalares. Segundo esse estudo a incidência de infecções por *Candida* nas UTIs caiu entre os anos de 2008 e 2009, entretanto houve incremento nos outros ambientes hospitalares e esse fato serve de alerta que essas infecções não estão restritas a UTIs. Em ambos ambientes, os agentes etiológicos foram *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (Horn, Neofytos *et al.*, 2009)



Nas últimas décadas observaram-se alterações no perfil epidemiológico das infecções causadas por espécies do gênero *Candida*, registrando-se aumento no número de casos de *Candida* não-*albicans* por todo o mundo (Viscoli, Girmenia *et al.*, 1999; Trick, Fridkin *et al.*, 2002; Pfaller e Diekema, 2007; Peman, Canton *et al.*, 2012). Estudos em diferentes países como França, Dinamarca, Finlândia, Canadá, demonstraram que a espécie mais frequentemente isolada em casos de candidemia depois de *C. albicans* foi *C. glabrata*, na Turquia, *C. tropicalis* e no Brasil e Espanha, *C. parapsilosis* (Bonfietti, Martins Mdos *et al.*, 2012). Entre essas espécies existem algumas que são intrinsecamente resistentes ou que possuem sensibilidade diminuída aos antifúngicos atualmente utilizados nas práticas médicas. A profilaxia antifúngica e o aumento do uso de fluconazol estão associados ao aumento das infecções pelas espécies não-*albicans* (Rogers, 2006; Chow, Golan *et al.*, 2008; Lai, Chu *et al.*, 2012). Com exceção das espécies que são intrinsecamente resistentes aos antifúngicos, relatos apontam que o número de isolados clínicos que apresenta resistência é baixo (Rogers, 2006; Bonfietti, Martins Mdos *et al.*, 2012; Pfaller, 2012).

Entretanto a resistência aos antifúngicos *in vitro*, nem sempre se correlaciona com a resistência clínica. A resistência *in vitro* pode ser classificada em primária ou intrínseca, quando o fungo é resistente sem prévio contato com o antifúngico, ou secundária/adquirida nesse caso existe exposição ao antifúngico. Já a resistência clínica é a falta de resposta do paciente infectado quando em tratamento antifúngico. Os melhores resultados de correlação *in vitro* – clínica é encontrada em pacientes HIV positivos com candidíase orofaríngea (Pappas, Rex *et al.*, 2004; Rogers, 2006; Rodriguez-Tudela, Alcazar-Fuoli *et al.*, 2008)

Entre as principais drogas utilizadas no tratamento das infecções fúngicas sistêmicas estão os azóis e os polienos, as duas classes tem ação sobre o ergosterol, o qual possui funções importantes na fluidez e integridade da membrana (Lupetti, Danesi *et al.*, 2002). Fluconazol é uma droga antifúngica da classe dos azóis que tem atividade fungistática sobre leveduras e cujo mecanismo é a inibição da síntese de ergosterol através da ligação à enzima

lanosterol 14- $\alpha$ -demetilase. A falta do ergosterol causa alterações na membrana e como consequência, inibição do crescimento. Diferentes mecanismos de resistência foram descritos para os azóis: superexpressão das bombas de efluxo (genes MDR1, CDR1 e CDR2), superexpressão dos genes responsáveis pela biossíntese do ergosterol, não apenas ERG 11 (lanosterol 14- $\alpha$ -demetilase) como também ERG 9, ERG 1, ERG 7, ERG 25, ERG 3. Foram também descritas mutações no gene ERG 11, as quais geram produtos com afinidade alterada ao fluconazol, devido a substituições de aminoácidos (Lupetti, Danesi *et al.*, 2002; Sanglard, Ischer *et al.*, 2003; Pfaller, 2012).

Anfotericina B é um antifúngico pertencente à classe dos polienos, descoberto em 1950, a partir de culturas de *Streptomyces nodosus* (Trejo e Bennett, 1963). Possui amplo espectro de ação contra leveduras e fungos (Ellis, 2002; Pappas *et al.*, 2009; Waness, Dawsari *et al.*, 2009; Muhammed, Coleman *et al.*, 2011), também é usado no tratamento de parasitas como *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* spp (Yardley e Croft, 1999; Paila, Saha *et al.*, 2010). Devido a sua alta toxicidade foram desenvolvidas diferentes formulações e hoje se encontram disponíveis nas formas de deoxicolato de sódio, em formulações coloidais, lipídicas e lipossomais. O mecanismo de ação da anfotericina B ainda é desconhecido, porém atualmente são aceitos os seguintes efeitos: as moléculas de anfotericina B podem se intercalar ao ergosterol presente na membrana causando a formação de poros pelos quais são perdidos íons gerando desequilíbrio osmótico e consequentemente a morte (Finkelstein e Holz, 1973; Brajtburg, Powderly *et al.*, 1990). Pode também ligar-se ao ergosterol presente na membrana e sequestrá-lo e, como a membrana possui muitas funções vitais, essas são prejudicadas (Palacios, Dailey *et al.*, 2011). Além dos efeitos sobre o ergosterol vários trabalhos mostram que a droga induz a produção de radicais livres, os quais são extremamente tóxicos as células (Sokol-Anderson, Brajtburg *et al.*, 1986; Haido e Barreto-Bergter, 1989; Sangalli-Leite, Scorzoni *et al.*, 2011). A resistência à anfotericina B é rara e está relacionada com a diminuição da produção de ergosterol pela célula fungica; não havendo ergosterol o efeito do antifúngico não ocorre (Vandeputte, Tronchin *et al.*, 2007). Além disso, são descritos casos de resistência cruzada

de anfotericina B e azóis, já que os últimos tem ação na síntese do ergosterol (Lupetti, Danesi *et al.*, 2002). São também descritos como mecanismo de resistência o aumento da catalase, gerando maior resistência ao estresse oxidativo, causado pela droga (Blum, Perkhofer *et al.*, 2008). Anfotericina B também é capaz de produzir efeitos imunomodulatórios em diferentes tipos celulares *in vitro* assim como em modelos animais. A presença da droga induz a produção de diferentes citocinas, quimiocinas e prostaglandinas, esse efeito pode ser pró-inflamatório por via dos receptores Toll-like receptor 2, TLR2, produção de citocinas tipo Th1, ou via TLR4, produção de citocinas tipo Th2, anti-inflamatórias (Mesa-Arango, Scorzoni *et al.*, 2012).

A caspofungina foi a primeira droga da classe das equinocandinas aprovada para uso clínico, na mesma classe posteriormente surgiram a micafungina e anidulafungina. As equinocandinas têm como alvo a parede celular fúngica através da inibição da  $\beta$ -1,3-D-glucana sintase sendo ativos para leveduras do gênero *Candida* com ação fungicida inclusive para as resistentes aos azóis e fungistática para *Aspergillus*, entretanto *C. neoformans*, *Fusarium spp*, *Trichosporum spp* são intrinsecamente resistentes. Poucos casos de resistência clínica as equinocandinas foram descritos e são associadas a mutações nas subunidades FKS 1 da glicana sintetase (Denning, 2002; Chen, Slavin *et al.*, 2011; Perlin, 2011). Foi descrito um fenômeno *in vitro* conhecido como efeito paradoxal que se trata de presença de crescimento em altas concentrações de caspofungina (Chen, Slavin *et al.*, 2011).

Entre as espécies não-*albicans*, *C. krusei* é uma espécie particularmente importante, apesar de apresentar baixa incidência, é a quinta espécie mais prevalente, principalmente em pacientes hemato-oncológicos e sua incidência varia entre zero e 7,6% em todo o mundo, sendo a menor incidência encontrada na Indonésia e a mais alta na República Checa (Hachem, Hanna *et al.*, 2008; Pfaller, Diekema *et al.*, 2008). *C. krusei* é resistente a fluconazol, apresenta baixa sensibilidade a outras substâncias antifúngicas como anfotericina B, flucitosina e voriconazol (Abbas, Bodey *et al.*, 2000; Drago, Scaltrito *et al.*, 2004; Munoz, Sanchez-Somolinos *et al.*, 2005) e também são descritos casos de falha terapêutica com o tratamento com caspofungina

(Hakki, Staab *et al.*, 2006), por isso é classificada por alguns autores como multidroga resistente (Pfaller, Diekema *et al.*, 2008). Apesar da resistência intrínseca ao fluconazol, *C. krusei* normalmente é sensível ao voriconazol em testes realizados *in vitro*, isso pode ser explicado pela ligação mais efetiva do voriconazol as isoenzimas do citocromo P-450 dessa espécie. (Pfaller e Diekema, 2007). Além disso, voriconazol foi usado com sucesso para tratar pacientes infetados com *C. krusei* (Kullberg, Sobel *et al.*, 2005).

O mecanismo de resistência de *C. krusei* a fluconazol não é bem compreendido. Alguns autores defendem a ideia de que a 14 $\alpha$ -desmetilase de *C. krusei* possui sequência de aminoácidos diferente, o que implica em diferente conformação e assim afinidade e encaixe diminuídos com as enzimas do citocromo P450, diferentes de outras espécies sensíveis. Entretanto, a resistência de *C. krusei* ao fluconazol não parece estar atribuída a superexpressão das bombas de efluxo (Orozco, Higginbotham *et al.*, 1998; Fukuoka, Johnston *et al.*, 2003).

Durante a infecção fungica, componentes da resposta imune inata e adaptativa entram em ação. O fungo é reconhecido e ativa a resposta inflamatória por meio dos receptores que reconhecem lecitina-like, dectina-1,  $\beta$ -glucana e receptores Toll-like na tentativa de eliminar o invasor. Durante esse processo são liberadas citocinas inflamatórias, degranulação de células fagocíticas, produção de espécies reativas de oxigênio (Ben-Ami, Lewis *et al.*, 2008; Romani, 2011). Assim, a resposta imune inata tem duplo papel, primeiro a eliminação do fungo pela fagocitose e segundo a produção de mediadores próinflamatórios como as citocinas os quais ativarão a parte adaptativa do sistema imune e apresentação de antígenos para a produção de anticorpos. Nessa etapa são liberadas citocinas inflamatórias via receptor Th1- TNF- $\alpha$ , IFN-gama, IL-1, IL-6 e IL-12 e citocinas anti-inflamatórias via receptor Th2 - IL-10, IL-4, IL-5 (Romani, 2011).

Além dos mecanismos de ação dos antifúngicos diretamente nos fungos, essas drogas também tem ação no hospedeiro, auxiliando assim, as respostas imunológicas. Dessa forma, a formulação anfotericina B deoxicolato

ou formulações lipídicas apresentam resposta imunomoduladora (proinflamatória e anti-inflamatória respectivamente) através da produção de citocinas. O fluconazol também possui atividade imunomoduladora com ação sinérgica a fagocitose. Por outro lado as equinocandinas ajudam a expor as moléculas de  $\beta$ -glicana presentes na parede celular para aumentar o reconhecimento dos fungos pelos neutrófilos e macrófagos. Com isso a ação antifúngica é uma combinação entre o mecanismo de ação da droga e a resposta imune do hospedeiro (Ben-Ami, Lewis *et al.*, 2008; Romani, 2011).

O uso de animais em pesquisa científica sempre foi um assunto preocupante; as exigências e as boas práticas de laboratório são cada vez maiores. Em 1959, Russell e Burch propuseram a teoria dos três R (Reduction, Refinement and Replacement) visando conscientizar o mundo científico sobre o tema e também obrigá-los a buscar alternativas e restringindo assim o uso de animais de experimentação. São sugeridas técnicas físico-químicas, uso de modelos matemáticos e computacionais, testes *in vitro* com cultura de tecidos, técnicas de microarranjo, entretanto a total substituição dos animais não é possível visto que é a melhor maneira de reproduzir o que acontece no corpo humano (Arora, Mehta *et al.*, 2011)

Diferentes sistemas foram introduzidos no estudo fungo-hospedeiro como alternativa aos modelos animais convencionais: modelos invertebrados como *Acanthamoeba castellanii*, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Galleria mellonella*, modelo em Zebrafish e recentemente o uso de embriões de galinha mostrou-se adequado como modelo alternativo. Esses modelos mostraram-se eficientes, para estudos de virulência, fagocitose, eficácia antifúngica, estudos de compostos antimicóticos; e no caso de alguns organismos o conhecimento do genoma possibilita estudo de rotas específicas. Entretanto todos os modelos possuem vantagens e desvantagens a respeito de via de inoculação do agente patógeno, precisão da concentração inoculada, custo, facilidade de manipulação, crescimento a 37°C, disponibilidade do genoma sequenciado (Fuchs e Mylonakis, 2006; Mylonakis, Casadevall *et al.*, 2007; Meijer e Spaink, 2011; Desalermos, Fuchs *et al.*, 2012; Jacobsen, Grosse *et al.*, 2012).

*Galleria mellonella* é um Lepidoptera (Pyralidae) que tem sido utilizado para estudar a virulência do fungo. Este inseto é encontrado naturalmente no ambiente e se alimenta de mel, pólen e cera de abelha. *G. mellonella* apresenta vantagens importantes como modelo de estudo fungo-hospedeiro: as larvas podem ser incubadas à temperatura variando entre 25 a 37 °C, por isso é possível simular o habitat e também as condições de infecção fúngica em mamíferos. Além disso, é possível administrar quantidades exatas de agentes patogênicos. *Galleria mellonella* possui seis tipos de células fagocíticas as quais desempenham papel importante no sistema de defesa. Além disso, a densidade de células na hemolinfa não é constante, e alterações durante a infecção podem ser facilmente medidas e usadas como um parâmetro da resposta da larva após a exposição a agentes patogênicos. Em adição a viabilidade das larvas pode ser facilmente constatada pela falta de movimento e melanização maciça induzida em resposta à infecção (Haido e Barreto-Bergter, 1989; Fuchs e Mylonakis, 2006; Fuchs, O'brien *et al.*, 2010; Desalermos, Fuchs *et al.*, 2012).

*Caenorhabditis elegans* é um nematoide encontrado no solo e se alimenta de bactérias, pode ser hermafrodita ou macho, medindo aproximadamente um mm de comprimento (Wood, 1988) Além disso, *C. elegans* é sensível à infecção por bactérias e fungos patógenos como *Pseudomonas aeruginosa* (Gallagher e Manoil, 2001), *Streptococcus pneumoniae* (Garsin, Sifri *et al.*, 2001), *Serratia marcescens* (Kurz e Ewbank, 2000) e *C. neoformans* (Mylonakis, Ausubel *et al.*, 2002). Por esta razão é um modelo bem conhecido para estudar a patogenicidade fúngica podendo assim, ser usado como um hospedeiro para estudos em *Candida* spp. Trabalhos anteriores mostram que o modelo pode ser utilizado para estudar virulência e eficácia a antifúngicos, pesquisar novos compostos antifúngicos, a filamentação e, além disso, por estar completo o seu sequenciamento genético permite estudos de vias específicas (Breger, Fuchs *et al.*, 2007; Okoli, Coleman *et al.*, 2009). Ainda, a presença de sistema imune para reconhecimento e a eliminação de patógenos com alta homologia genética entre *C. elegans* e humanos significa que o entendimento deste nematoide pode contribuir para

significativas descobertas, em relação à interação patógeno hospedeiro (Gravato-Nobre e Hodgkin, 2005). No modelo *C. elegans* são conhecidas rotas para resposta imune sendo uma delas a rota TGF- $\beta$ -like, a qual influencia na resposta contra *S. marcescens* e *P. aeruginosa* (Mallo, Kurz *et al.*, 2002) outra a de receptores insulina like, como os envolvidos nas cascatas DAF-2/DAF-16, os quais estão associados a sensibilidade a infecções por *Enterobacter faecalis* e *Staphylococcus aureus* (Grasin *et al.*, 2003), além disso também existem os receptores Toll like, receptores de morte celular programada (PCD), e as cascatas envolvendo três MAP kinases: p38 MAP Kinase, c-Jun amino terminal kinase e ERK-extracelular signal regulated kinase (Gravato-Nobre e Hodgkin, 2005).

Muitos estudos foram realizados buscando o entendimento da patogênese de *Candida* e com isso melhorar o tratamento e a sobrevida dos pacientes, entretanto, o entendimento de sua virulência permanece com grandes lacunas. A combinação de um genoma diploide e um ciclo incompleto sexual têm dificultado abordagens genéticas para o estudo de sua virulência. Atualmente, ferramentas importantes como o sequenciamento do genoma de *C. albicans*, ferramentas de bioinformática e técnicas modernas de biologia molecular são peças chave para desvendar fatores importantes. (Noble e Johnson, 2005).

A transformação genética pode ser definida como o processo de introdução de DNA em células hospedeiras com a finalidade de alterar o fenótipo do organismo receptor e/ou fazer com que esse expresse esse DNA introduzido (Ruiz-Diez, 2002). Essas ferramentas podem auxiliar nos estudos de caracterização de genes específicos e conseqüentemente no melhor entendimento dos mecanismos de virulência e patogenicidade.

Os métodos clássicos para a transformação de fungos são baseados na obtenção de esferoplastos, ou seja, células desprovidas da parede celular, ou mesmo a utilização de células intactas que posteriormente sofrem tratamento químico ou eletroporação para que o DNA exógeno entre na célula (Ruiz-Diez, 2002). Um dos entraves na utilização de metodologias clássicas é a dificuldade

encontrada para transformar alguns fungos, em especial fungos patógenos humanos. Na natureza, membros do gênero *Agrobacterium*, um bacilo aeróbio Gram negativo é causador de tumores em numerosas espécies de plantas (Hooykaas e Schilperoort, 1984; Lee, Dudley *et al.*, 1992).

Essas bactérias são atraídas ao tecido vegetal por compostos fenólicos tais como acetosiringona e hidroxiaacetosiringona, que são exsudadas por células lesadas em decorrência de ferimentos superficiais causados por insetos, geadas ou tratos culturais. A formação desses tumores é consequência da transferência de parte de seu plasmídeo Ti (*Tumor inducing*) para o genoma da planta. Essas sequências de DNA (T-DNA) são integradas ao genoma do hospedeiro e genes que codificam enzimas que regulam o crescimento da planta são expressos resultando em uma multiplicação celular descontrolada (Zhu, Oger *et al.*, 2000; Gelvin, 2003). O plasmídeo *Ti* também contém outro segmento, denominado região de virulência, que é composta por um número grande de genes *vir* que são necessários a tumogenicidade (Zhu, Oger *et al.*, 2000). Proteínas codificadas pela região *vir* são também envolvidas na formação, transporte e integração do T-DNA (Zhu, Oger *et al.*, 2000; Zupan, Muth *et al.*, 2000)

Nos anos 80, pesquisas foram realizadas com o objetivo de desarmar genes responsáveis pela virulência dessa bactéria e substituir esses genes por outros de interesse, assim espécies de plantas seriam capazes de expressar novos fenótipos (Bevan, Barnes *et al.*, 1983). Além disso, o desenvolvimento de um sistema de vetores binários, no qual foram separados os T-DNA dos genes de virulência gerou grande utilização de *Agrobacterium* spp como veículo de transferência de genes em estudos com plantas (Gelvin, 2009).

Esta metodologia, para fungos filamentosos, foi descrita por de Groot *et al.* 1998 (De Groot, Bundock *et al.*, 1998). Staats (2007) realizaram uma inativação gênica de um gene anabólico de *Metarhizium anisopliae* e essa metodologia mostrou-se 100 vezes mais eficiente do que as convencionais (Staats, Junges *et al.*, 2007). *Beauveria bassiana*, um zigomiceto, também foi agrotransformado com sucesso abrindo inúmeras possibilidades de



entendimento da biologia e patogenicidade do fungo. (Nyilasi, Papp *et al.*, 2008). A obtenção de mutantes de *Aspergillus carbonarius*, produtor de ocratoxina A, uma toxina que apresenta efeitos nefrotóxico e carcinogênico. Mutantes com significativa redução ou aumento da capacidade de produção dessa toxina. A identificação dos genes nocauteados contribuiu para a compreensão da biossíntese da toxina. A técnica ainda foi eficiente na transformação de *Aspergillus fumigatus* (Sugui, Chang *et al.*, 2005) e também para *Trichophyton mentagrophytes*, dermatófito clinicamente importante, cujos transformantes podem contribuir para estudos moleculares assim como a identificação de fatores de virulência. (Yamada, Makimura *et al.*, 2009). A técnica também foi útil em *C. neoformans* para a identificação de cinco novos genes responsáveis pela síntese de melanina que é um importante fator de virulência desse fungo (Walton, Idnurm *et al.*, 2005).

Uma das vantagens da transformação via *A. tumefaciens* em relação aos outros métodos é a praticidade, uma vez que dispensa a obtenção de protoplastos e o uso de equipamentos de alto custo. Além disso, tem-se alta eficiência de transformação e a predominância de transformantes com o DNA exógeno integrado em cópia única ao genoma (De Groot, Bundock *et al.*, 1998; Mullins, Chen *et al.*, 2001). Essas características fazem deste sistema um importante método de análise genética de fungos, como para estudos de nocaute e expressão gênica (Mullins, Chen *et al.*, 2001; Amey, Mills *et al.*, 2003; Idnurm, Reedy *et al.*, 2004)

## OBJETIVOS GERAIS

Esse trabalho tem como objetivo investigar a relação fungo-hospedeiro de *C. albicans* e *C. krusei* na presença de antifúngicos em modelos *in vitro* e modelos animais não convencionais bem como buscar o entendimento dos mecanismos de virulência desses fungos por meio da construção de mutantes por agrotransformação.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Modelos animais não convencionais:
  - 1.1. Estudar a virulência de *C. krusei* e *C. albicans* em modelos animais não convencionais *Galleria mellonella* e *Caenorhabditis elegans*.
  - 1.2. Avaliar a eficácia de tratamentos *in vivo* com fluconazol, anfotericina B e caspofungina, assim como, combinação desses antifúngicos *in vivo* e correlacionar com o perfil de sensibilidade encontrado *in vitro*.
2. Efeito dos antifúngicos em macrófagos:
  - 2.1. Avaliar o efeito de fluconazol, anfotericina B no processo de fagocitose de *C. albicans* e *C. krusei* em linhagem celular de macrófagos RAW 267.7.
  - 2.2. Verificar o comportamento quanto à produção de citocinas da linhagem celular RAW 267.7 e macrófagos primários infectados com *C. albicans* e *C. krusei* e tratadas com fluconazol e anfotericina B.
3. Agrotransformação:
  - 3.1. Produzir transformantes de *C. albicans* e *C. krusei* pela técnica de agrotransformação.
  - 3.2. Realizar testes fenotípicos com os transformantes em busca de cepas fenotipicamente alteradas.
  - 3.3. Identificar o local de inserção do T-DNA causados pela agrotransformação.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### 1. Modelo *Galleria mellonella*

#### 1.1. Cepas e condições de cultivo

*Candida albicans* SC5314, *Candida krusei* ATCC 6258, dois isolados clínicos de *Candida krusei* (CL8053 e CL80317) pertencentes à coleção de leveduras do Laboratório de Referência em Micologia do Centro Espanhol de Microbiologia, Madrid e *Cryptococcus neoformans* variedade *grubii* (H99) foram utilizados neste estudo. As leveduras foram cultivadas por 18 horas em meio líquido Sabouraud (Difco, BD, USA) a 30°C sob agitação.

#### 1.2. Condições de manipulação e incubação de larvas de *Galleria mellonella*

*Galleria mellonella* (R.J. Mous Livebait, The Netherlands) em estágio larvário selecionadas com peso entre 0,3 - 0,5 g foram separadas em placas de Petri (grupos de 10 larvas) e incubadas a 37°C no escuro na noite anterior aos experimentos. Larvas com alterações de cor (manchas escuras ou com melanização aparente) foram excluídas pois essas alterações podem significar que a larva não esteja totalmente sã. Antes da infecção, foi realizada a assepsia das pró-patas com etanol a 70%. Antifúngicos e suspensões de leveduras foram injetados nas larvas com auxílio de seringas Hamilton (Hamilton, EUA) de 10 µL. A morte das larvas foi avaliada por inspeção visual da cor (marrom-escuro) ou por falta de movimento após tocá-las com uma pinça. Para cada condição, um total de 20 larvas foi utilizado e cada experimento foi repetido pelo menos duas vezes.

#### 1.3. Ensaio de sobrevivência

Para as curvas de sobrevivência foram utilizados de  $10^7$ ,  $5 \times 10^6$  e  $2,5 \times 10^6$  ufc/larva de *C. krusei* e  $10^6$ ,  $5 \times 10^5$  e  $10^5$  ufc/larva de *C. albicans*. As suspensões fúngicas foram preparadas em PBS acrescido de 20 mg/L de ampicilina para evitar a contaminação bacteriana. As larvas foram infectadas por inoculação com seringa Hamilton, onde 10 µL de suspensão fúngica foi aplicado na pró-patas direita e posteriormente foram incubadas a 37°C e monitoradas durante 7 dias. Como controle, para ambas as leveduras foram

realizadas infecções com células previamente mortas com 4% de paraformaldeído por 1 h, garantindo que a morte acontece pela infecção da levedura. Todas as suspensões fúngicas foram contadas com Automatic Cell Counter, TC10, Bio Rad.

#### **1.4. Ensaio de virulência a diferentes temperaturas**

Larvas infectadas com  $5 \times 10^6$  ufc/larva de *C. krusei* ATCC 6258 ou dos isolados clínicos (CL8053 e CL80317) ou com  $5 \times 10^5$  ufc/larva de *Candida albicans* SC5314 foram incubadas a 30°C ou a 37°C e monitoradas durante 07 dias.

#### **1.5. Curva de crescimento a diferentes temperaturas**

*Candida albicans* SC5314 e *C. krusei* ATCC 6258 a  $10^3$  ufc/mL foram cultivadas em Sabouraud (Difco, BD, USA) e a densidade ótica (D.O) foi determinada a cada hora por 72hrs a (530nm) usando espectrofotômetro Labsystems IEMS Reader MF. Esse experimento foi executado 30 ou 37°C.

#### **1.6. Ensaio de fagocitose em *G. mellonella***

Uma suspensão fúngica de  $10^7$  ufc/larva de *Candida albicans* SC5314 ou *Candida krusei* ATCC 6258 e dois isolados clínicos (CL8053 and CL80317) foram corados com Calcofluor White (Sigma, St. Louis, MO) na concentração de 10 µg/mL durante 30 min a 37°C. Em seguida, as larvas *G. mellonella* (cinco larvas por grupo) foram infectadas e fagocitose foi analisada após 3 horas de incubação a 37°C. A hemolinfa foi coletada em tubos Eppendorf e diluída 1:2 em tampão de IPS (Insect salina fisiológica: cloreto de sódio 150 mM, cloreto de potássio 5 mM, 10 mM Tris-HCl pH 6,9, EDTA 10 mM e 30 mM de citrato de sódio) para evitar a coagulação e melanização. A fagocitose foi visualmente quantificada utilizando um microscópio Leica DMI 3000B com fluorescência excitado em 440 nm e emitido em 500-520 nm. Foram contadas 100 células da hemolinfa e a partir dessa contagem foi estabelecida a porcentagem de células que apresentavam leveduras em seu interior consideradas fagocitadas. *Cryptococcus neoformans* H99 cepa foi utilizada como controle (Mylonakis, Moreno *et al.*, 2005).

### 1.7. Determinação da densidade hemocitária

Grupos de cinco larvas foram infectados com  $10^7$  ufc/larva de *C. albicans* SC5314, *C. krusei* ATCC 6258 ou com isolados clínicos (CL8053 e CL80317) e incubadas a 37°C durante 3 horas. A hemolinfa de cada larva foi coletada separadamente em tubos Eppendorf e diluída 1:10 em tampão IPS e as células foram contadas utilizando hemocitômetro. *C. neoformans* H99 foi utilizado como controle (Mylonakis, Moreno *et al.*, 2005).

### 1.8. Teste de filamentação

Grupos de cinco larvas de *G. mellonella* foram infectados com  $10^7$  ufc/mL de *C. albicans* SC5314 e *C. krusei* ATCC 6258 ou com isolados clínicos (CL8053 e CL80317). As larvas foram incubadas a 37°C durante 24 horas. As larvas foram maceradas em membrana de nylon de poros de 100 nm (Falcon, BD, USA) com um mL de IPS. O líquido foi então coletado e corado com Calcofluor (Sigma, St. Louis, MO), como descrito anteriormente, e a morfologia da levedura foi observada em microscópio de fluorescência Leica 3000B DMI.

### 1.9. Quantificação da melanização

Grupos de cinco larvas foram infectados com  $5 \times 10^5$ ,  $10^6$  e  $5 \times 10^6$  ufc/mL, PBS e incubadas a 37°C. Em seguida, a hemolinfa de cada larva foi coletada separadamente após três e 24h em tubos Eppendorf, diluídos com tampão de IPS 1:10, centrifugados 4500 g por 5 minutos. A densidade óptica (OD) do sobrenadante foi então determinada a 405 nm.

### 1.10. Tratamento com drogas antifúngicas

As larvas infectadas com  $5 \times 10^6$  ufc/mL de *C. krusei* e  $5 \times 10^5$  ufc/mL de *C. albicans* foram tratados com anfotericina B (1, 2 e 4 mg/kg) ou fluconazol (8, 12, 32, 64 e 128 mg/kg) ou caspofungina (1, 2 e 4 mg/kg) através da pró-pata esquerda. Grupos de 10 larvas foram tratados com os antifúngicos isoladamente para testar a toxicidade. Também foram avaliadas combinações de antifúngicos com doses subterapêuticas de anfotericina 1 mg/kg com fluconazol 4 mg/kg, anfotericina 1 mg/kg com fluconazol 12 mg/kg, anfotericina 1 mg/kg com caspofungina 1 mg/kg. As conversões das doses terapêuticas de humanos para larvas estão na tabela 1.

**Tabela 1: Doses terapêuticas e doses testadas para os antifúngicos utilizados\***

Antifúngico	Dose terapêutica (mg/kg)	Dose terapêutica ( $\mu$ g/larva)	Doses testadas (mg/kg)	Doses testadas ( $\mu$ g/larva)
Anfotericina B	0.5 -1	0,2 – 0,4	1, 2, 4	0,4 ; 0,8; 12
Fluconazol	6 – 12	4,8 – 2,4	6, 12, 32, 64, 128	4,8 ; 2,4; 12,8; 25,6; 51,2
Caspofungina	0.7 - 1	0,28 – 0,4	1, 2, 4	0,4 ; 0,8; 1,6

\* para a conversão foi considerado um peso médio das larvas de 0,4 g e as doses terapêuticas empregadas basearam-se nas consideradas para pacientes não neutropênicos (Pappas *et al.*, 2009).

### 1.11. Teste de toxicidade a antifúngicos

Grupos de 20 larvas não infectadas foram tratadas anfotericina B (1, 2 e 4 mg/kg) ou fluconazol (8, 12, 32, 64 e 128 mg/kg) ou caspofungina (1, 2 e 4 mg/kg) para verificar a toxicidade desses antifúngicos.

### 1.12. Efeito dos antifúngicos sobre a fisiologia de *G. mellonella* infectadas com leveduras

Larvas infectadas com *C. krusei* ou *C. albicans* e tratadas com fluconazol 12 e 64 mg/kg ou anfotericina B 4 mg/kg foram submetidas a análises de fagocitose, densidade hemocitária e melanização conforme metodologia citada anteriormente.

### 1.13. Determinação da carga fúngica

Cinco larvas infectadas, tratadas e não tratadas com fluconazol 12 mg/kg ou anfotericina B 4 mg/kg foram coletadas diferentes tempos de infecção (dia 1 a dia 5). Foram então lavadas com etanol a 70% e cortadas em pequenos pedaços com um bisturi. Dois mL de PBS-ampicilina foram adicionados e o tecido foi homogeneizado suavemente com vortex e pérolas de vidro durante 10 segundos. A mistura foi finalmente suspensa em 9 mL de PBS-ampicilina. Diferentes diluições foram feitas para cada amostra e 50  $\mu$ L a partir destas diluições foram colocadas em placas de agar Sabouraud-cloranfenicol (Oxoid). As placas foram incubadas durante 48 h a 37°C e as unidades formadoras de colônias foram determinadas.

### 1.14. Histopatologia

Três larvas de grupos diferentes (não infectadas, infectadas e/ou tratados com antifúngicos) foram coletadas nos dias 1 a 4. As larvas foram conservadas em etanol a 70% e foram feitas incisões longitudinais com um bisturi na parte dorsal do inseto. As amostras foram fixadas com 10% de fomalina tamponada durante 24 horas. Em seguida, as amostras foram desidratadas com concentrações crescentes de etanol, lavadas com xilol, e incorporadas em parafina. As secções de tecido (05 microns) foram coradas com uma solução de ácido periódico de Schiff (PAS) e observadas em microscópio Leica DMI3000.

### 1.15. Estatísticas

Gráficos e análises estatísticas foram realizadas com Graph Pad Prisma 5 (La Jolla CA, EUA). As curvas de sobrevivência foram analisadas pelo método de Log-rank (Mantel-Cox) e a carga fúngica, fagocitose, densidade hemocitária e quantificação da melanização foram analisadas por t-Test.

## 2. Modelo *Caenorhabditis elegans*

### 2.1. Cepas e condições de cultivo

*Candida albicans* SC5314, *Candida krusei* ATCC 6258 pertencentes à coleção de leveduras do Laboratório de Referência em Micologia do Centro Espanhol de Microbiologia, Madrid, Espanha foram utilizadas neste estudo. As leveduras foram cultivadas *overnight* em meio líquido Sabouraud (Difco, BD, USA) a 30°C sob agitação. A partir desse cultivo 100 µL de cada cultivo foram semeados em placas com meio BHI sólido com 90 µg/mL de kanamicina, 200 µg/mL de ampicilina e incubadas *por* 18 horas a 35 °C. Essas placas foram usadas para a infecção do *C. elegans*.

### 2.2. Condições de manipulação e infecção de *C. elegans*

A cepa de *C. elegans* AU37 *glp-4(bn2)* I; *sek-1(km4)* foi usada para todos os experimentos. Essa cepa é comumente usada para testes de virulência e tratamento antifúngico, pois a mutação *glp-4* gera larvas estéreis a 25°C. Entretanto a única mutação em *glp-4* torna o teste muito longo devido a demora na morte dos gusanos, o que poderia causar degradação dos

antifúngicos e além de gerar muitas variáveis deixando o teste inseguro. Com isso o uso do duplo mutante *glp-4; sek-1* torna o teste viável pois SEK-1 codifica uma p38 MAPK importante para a resposta celular, tornando assim as larvas mais sensíveis à infecção pelas leveduras (Mylonakis, Ausubel *et al.*, 2002; Breger, Fuchs *et al.*, 2007). Também foram utilizadas as cepas N2 e a NU3 *dbl-1 (nk3)*, gene que codifica ligantes de TGF- $\beta$ , que está associado a resistência a infecções por *Serratia marcescens* (Mallo, Kurz *et al.*, 2002). As larvas sincronizadas em estágio larvário L4 foram colocadas nas placas de BHI com *C. albicans* ou *C. krusei* crescidas e incubadas por 3 horas a 25°C para que os gusanos se alimentem. O controle foi realizado com *Escherichia coli* OP50, não patogênica para os gusanos. Após o período de incubação os gusanos foram lavados com M9. Um total de 20 a 30 gusanos foram usados por tratamento.

### **2.3. Virulência e eficácia antifúngica**

Os antifúngicos anfotericina 2  $\mu\text{g/mL}$ , fluconazol 12  $\mu\text{g/mL}$ , caspofungina 2  $\mu\text{g/mL}$  foram diluídos em meio líquido BHI 40% em 60% de M9 (Tampakakis, Okoli *et al.*, 2008) mais antibióticos 10  $\mu\text{g/mL}$  colesterol em etanol, 200  $\mu\text{g/mL}$  ampicilina e 90  $\mu\text{g/mL}$  kanamicina e colocados em placas com 12 poços. Após o período de incubação (3 hs), os gusanos foram lavados com meio M9 para a retirada das leveduras e 30-40 larvas infectados com *C. albicans* ou *C. krusei* foram colocados nas placas. A placa foi incubada a 25°C e a morte das larvas foi avaliada diariamente com auxílio de lupa Leica MZ75 e as larvas mortas foram retiradas.

### **2.4. Teste de toxicidade a antifúngicos**

Grupos de 20 larvas não infectadas foram tratadas com anfotericina B (2 mg/kg) ou fluconazol (12 mg/kg) ou caspofungina (4 mg/kg) para verificar a toxicidade desses antifúngicos. A presença de larvas mortas indica toxicidade.

### **2.5. Curva de crescimento a diferentes temperaturas**

*Candida albicans* SC5314 e *C. krusei* ATCC 6258 a  $10^3$  ufc/mL foram cultivadas em Sabouraud (Difco, BD, USA) e a densidade ótica (D.O) foi



determinada a cada hora por 72hs a (530 nm) usando espectrofotômetro Labsystems IEMS Reader MF. Esse experimento foi executado a 25 °C.

## **2.6. Estatísticas**

Gráficos e análises estatísticas foram realizadas com Graph Pad Prisma 5 (La Jolla CA, EUA). As curvas de sobrevivência foram analisadas pelo método de Log-rank (Mantel-Cox) e por t-Test.

## **3. Efeitos de anfotericina B e fluconazol na fagocitose**

### **3.1. Cepas e condições de cultivo**

As cepas de *C. albicans* e *C. krusei* e as condições de cultivo foram as mesmas descritas no item 1.1. A linhagem celular de macrófagos RAW 264.7 foi cultivada em DEMEN (Lonza, Verviers, Belgium) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS; HyClone-Perbio), 10% NCTC (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), e 1% de aminoácidos não essenciais (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>

### **3.2. Determinação da citotoxicidade de anfotericina B e fluconazol**

Os macrófagos foram cuidadosamente removidos das placas de cultivo por pipetagem contínua com DEMEN suplementado. Foi preparada uma suspensão de macrófagos a  $2,5 \times 10^5$  cells/mL da qual 200 µL foram colocados em cada poço da placa de 96 poços e incubados a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> overnight. No dia seguinte o meio de cultura dos macrófagos (DEMEN suplementado) foi retirado e substituído por DEMEN suplementado e acrescido de 8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,06; 0,03 µg/mL de anfotericina B ou 32; 64; 8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125 µg/mL de fluconazol e incubado a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>, overnight. A citotoxicidade foi determinada pelo ensaio de redução do XTT. Foi preparada uma solução de 0,5 mg/mL de XTT (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), acrescida de menadiona a 25 µM/mL. A cada poço contendo os macrófagos com as diferentes concentrações de antifúngicos foram adicionados 100 µL de solução de XTT-menadiona e as placas foram incubadas por 2 horas a 37°C. Após leitura medida por espectrofotômetro a 450nm foi determinada porcentagem de células vivas por concentração de antifúngicos.

### 3.3. Ensaio de Fagocitose

Os experimentos foram realizados em placas de vidro de 96 poços. Os macrófagos foram cuidadosamente removidos das placas de cultivo por pipetagem contínua com DEMEN suplementado e a concentração dos macrófagos ajustada a  $2,5 \times 10^5$  cells/mL; 200  $\mu$ L dessa suspensão celular foi colocada em cada poço da placa e incubados a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> por 12 horas. Considerando que os macrófagos se multiplicam, a concentração no dia seguinte foi de  $10^5$  células/mL, portanto para cada poço foi retirado o meio e adicionadas suspensões celulares de *C. albicans* ou *C. krusei* na concentração de  $5 \times 10^5$  cells/mL realizadas no mesmo meio (proporção 1 macrófago: 1 levedura) e incubadas a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>, overnight por 2 horas para a fagocitose. Decorridas as 2 h de fagocitose, os poços foram lavados três vezes com meio DEMEN suplementado para retirada de leveduras que não foram fagocitadas e foi adicionado o mesmo meio acrescido ou não de fluconazol 8  $\mu$ g/mL ou anfotericina B 2  $\mu$ g/mL. Para cada experimento foram preparados dois poços de cada situação e os vídeos foram obtidos de dois campos distintos de cada poço.

### 3.4. Microscopia e processamento dos dados

Os vídeos foram realizados em microscópio confocal SP5 Leica Microsystems usando aumento de 20X a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub> overnight. As imagens foram analisadas pelos softwares ImageJ e ImageTool.

### 3.5. Obtenção e cultivo de macrófagos primários

Foram utilizados camundongos CD1 machos com 8 a 12 semanas de vida dos quais os macrófagos peritoneais foram retirados por meio de lavagem do peritônio com PBS acrescido de 1% de estreptomicina. Os macrófagos coletados foram centrifugados e a concentração celular foi ajustada a  $10^6$  células/mL, já que os macrófagos primários não se multiplicam e 200  $\mu$ L dessa suspensão celular foi colocada em placas de 96 poços e foi procedida a fagocitose com e sem antifúngicos conforme descrito anteriormente no item 3.3

### **3.6. Quantificação de citocinas produzidas pelos macrófagos RAW 264.7 e pelos macrófagos primários**

Para a quantificação de citocinas foram realizadas fagocitoses com macrófagos RAW 264.7 e macrófagos primários infectados com *C. albicans* ou *C. krusei*, na presença e na ausência de fluconazol 8 µg/mL ou anfotericina B 2 µg/mL. Nesse caso a proporção foi de 1 macrófago: 2 leveduras. Após 2 horas de fagocitose, as leveduras não fagocitadas foram retiradas conforme descrito anteriormente e foi acrescentado meio novo com ou sem antifúngicos e submetidos à nova incubação por 18 hrs. Após incubação o sobrenadante foi coletado e reservado (-20°C). A quantificação de citocinas dos macrófagos RAW 264.7 foi realizada com o kit cytometric bead array (CBA) mouse Th1/Th2/Th17 kit (BD Biosciences) usando o citometro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences) e os dados foram analisados pelo software FCAP Array. As citocinas produzidas pelos macrófagos primários foram quantificadas pelo kit Mouse Cytokine/Chemokine Magnétic Bead Panel II, Millipore e medidos no aparelho Bio-Plex 200, Bio Rad, Luminex X Map technology.

### **3.7. Estatísticas**

Gráficos foram realizadas com Graph Pad Prisma 5 (La Jolla CA, EUA) e analisadas por t-Test

## **4. Transformação genética de *C. albicans* e *C. krusei* mediada por *A. tumefaciens***

### **4.1. Microorganismo, cultivo e vetor**

Foram utilizadas *Candida albicans* ATCC 90028 e *Candida krusei* ATCC 6258 pertencente à Micoteca do Laboratório de Micologia Clínica UNESP-Araraquara. Para a obtenção de transformantes de *C. albicans* a cepa de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 e o vetor pPZP-HYG foram utilizados, os quais foram gentilmente doados pelo Prof. Dr. Augusto Schrank da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Para a obtenção dos transformantes de *C. krusei* foi utilizada a cepa de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105, o vetor pPZP-HYG e também *A. tumefaciens* LBA4404 com o vetor pPZP-NAT.

#### 4.2. Avaliação da sensibilidade à higromicina ou nourseotricina

O teste de sensibilidade e determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizado por microdiluição em caldo segundo documento M-27A2 (CLSI, 2002). A concentração na qual houve a inibição total do crescimento das leveduras foi utilizada para a seleção dos transformantes. A determinação dessas CIMs foi necessária para a seleção dos mutantes positivos, resistentes a essas substâncias.

#### 4.3. Preparação de células quimiocompetentes

*A. tumefaciens* foi inoculada em 100 mL de LB líquido e incubada 28°C sob agitação, overnight. A seguir, o cultivo foi resfriado em gelo por 30 minutos, centrifugado e lavado sucessivamente com PBS em quantidades decrescentes (50 mL, 25 mL e 10 mL 15 minutos, 4000 g, 4°C). As células foram colocadas em glicerol 10% em uma concentração de  $10^{10}$  células/mL aliqüotadas e armazenadas a - 80°C.

#### 4.4. Transformação da bactéria *A. tumefaciens*

A transformação de *A. tumefaciens* foi realizada por choque térmico, para isso foram adicionados 200 – 1000 ng do vetor pPZP-HYG ou pPZP-NAT (volume máximo de 5 µL) às células; essa mistura foi mantida em gelo por 30 minutos e posteriormente congeladas com nitrogênio líquido e incubada a 37°C por 5 minutos. A seguir um mL de meio LB líquido foi adicionado as bactérias e as mesmas foram incubadas por 2 horas a 28°C, 1800 g. Esse cultivo (100 µL) então foi transferido para meio sólido LB + kanamicina (50 µg/mL) e incubadas a temperatura ambiente (Holsters, De Waele *et al.*, 1978).

#### 4.5 Agrotransformação

*A. tumefaciens* foi cultivada em LB acrescido de kanamicina 50 µg/mL a 28°C, sob agitação. A seguir o cultivo foi lavado duas vezes com MI - Meio Indutor (Bundock, Den Dulk-Ras *et al.*, 1995) acrescido de 100 µM de acetoceringona, a densidade óptica foi ajustada a 0,15 a 530nm e o cultivo foi novamente incubado 30°C por 6 h ou até que a DO atinja 0,6 (equivalente a  $6 \times 10^9$  cels/mL). As leveduras foram cultivadas em Sabouraud líquido overnight 30°C sob agitação e a concentração celular ajustada a  $10^6$  cels/mL em PBS.

Para o co-cultivo foram testadas distintas proporções de levedura/bactéria, sendo a mais eficiente 1:1000 ( $10^6$  células/mL/ $10^9$  células/mL), essa mistura foi centrifugada para a retirada do meio de cultura e colocada no centro de uma placa contendo IM acrescidos de 100  $\mu$ M acetoceringona e incubada por 72 horas 28°C. Após 72 h do co-cultivo, todo o crescimento foi lavado com PBS e transferidos para meio seletivo sólido (Sabouraud + 100  $\mu$ g/mL de cefotaxima + 250  $\mu$ g/mL higromicina ou Sabouraud + 100  $\mu$ g/mL de cefotaxima + 100  $\mu$ g/mL nourseotricina). As placas foram incubadas à temperatura ambiente ou a 30°C por no mínimo 48 h. Os possíveis transformantes foram transferidos para nova placa contendo meio seletivo. A técnica foi realizada paralelamente com *C. neoformans* pois a eficácia na transformação dessa levedura já é conhecida (Idnurm, Reedy *et al.*, 2004)

#### **4.6. Avaliação da morfologia macroscópica e microscópica**

A morfologia macroscópica foi avaliada inoculando 10  $\mu$ L de uma suspensão celular de  $10^8$  ufc/mL em placas de Sabouraud, essas foram incubadas 37°C por 48 h. A partir dessas colônias foi realizada a coloração de Gram para a verificação da morfologia microscópica.

#### **4.7. Avaliação da capacidade de produção de biofilmes *in vitro* das cepas transformantes de *C. albicans***

A partir de um cultivo recente, foi preparado inoculo de  $10^7$  cels/mL em meio YNB (Yeast Nitrogen Base, Difco/BD Becton, Dickinson and Company Sparks, Md 21152) acrescido de 2% de glicose. Depositou-se 100  $\mu$ L desse inoculo em placas de 96 poços. A placa foi mantida por 2 h em estufa a 37°C para a pré-adesão. A seguir o meio de cultura foi retirado cuidadosamente e os poços foram lavados com PBS por três vezes, adicionou-se YNB e incubou-se novamente 37°C sob agitação. Esse experimento foi realizado em 24 e 48 h, porém melhores resultados foram observados em 24 h.

#### **4.8. Quantificação do biofilme pelo XTT**

A quantificação da formação de biofilme foi realizada pelo ensaio de redução do XTT. Foi preparada uma solução de 0,5 mg/mL de XTT em PBS e foi adicionada menadiona na concentração final de 25  $\mu$ M/mL. Ao biofilme que

foi previamente lavado por 2 vezes com PBS, foram adicionados 100  $\mu$ L solução de XTT-menadiona e as placas foram incubadas por 2 horas a 37°C. A redução do XTT gera uma coloração alaranjada correspondente a atividade metabólica do biofilme e é medida em espectrofotômetro a 450nm.

#### **4.9. Avaliação da atividade da fosfolipase e proteinase**

As atividades enzimáticas das proteinases e fosfolipases foram verificadas de acordo com (Price, Wilkinson *et al.*, 1982). A partir de um cultivo recente em Sabouraud foi preparado inóculo de  $10^8$  ufc/mL e 10  $\mu$ L foi inoculado em placas com meio de cultura apropriado e incubadas a 37°C por 48 e 72 hrs. Para o ensaio da determinação da atividade de fosfolipase foi utilizado o agar egg (10 g de peptona, 30 g glicose, 57,3 g NaCl, 0,55 g  $\text{CaCl}_2$ , 20 g ágar e 10% egg yolk por litro de água) e para o ensaio da determinação da atividade de proteinase foi utilizado o meio BSA (23,4 g YCB, 4 g BSA, 2 g extrato de levedura, 10 g glicose). As determinações das atividades de proteinase e fosfolipase foram dadas pela razão entre a medida do diâmetro da colônia pela medida do diâmetro total (halo de inibição + halo da colônia) e foi classificada como zona de precipitação (Pz) de acordo com PRICE *et al.*, 1992,  $Pz = 1,0$  (negativo),  $Pz \leq 0,63$ , (fortemente positivo), entre 0,64 a 0,99 (positivo).

#### **4.10. Avaliação da atividade de hemolisina**

A partir de um cultivo recente em Sabouraud foi realizado um inóculo de  $10^8$  ufc/mL e 10  $\mu$ L foram inoculados em placas com agar sangue com 3% de glicose, incubadas a 37°C por 48 e 72 h. As cepas foram classificadas como: Gama hemolíticas ( $\gamma$  - hemolítica) não produzem nenhum halo, alfa hemolítica ( $\alpha$  - hemolíticas) linhagens produziram um halo verde ou beta-hemolítico ( $\beta$  - hemolítico) produzem um halo amarelo (Tsang, Chu *et al.*, 2007).

#### **4.11. Avaliação da sensibilidade a diferentes drogas antifúngicas**

As determinações das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) de fluconazol, anfotericina B e caspofungina foram avaliadas por metodologia de diluição em caldo segundo documento M-27A2 (CLSI, 2002).

#### 4.12. Cultura de células

A linhagem NOK de queratinócitos (células orais normais imortalizadas com o gene *h-tert* doadas pelo Department of Medicine Harvard Medical School-Dr Karl Munger) foi utilizada nesse estudo. Os queratinócitos foram cultivados em 5% de CO<sub>2</sub> em meio Keratinocyte SFM (Invitrogen) com antibióticos (5,0 mL Penicilina/Estreptomomicina; 0,5 mL Gentamicina; 1,5 Anfotericina B para 500 mL de meio) e mantidos a temperatura de 36,5°C. Decorridos 3 a 4 dias, as garrafas de células foram submetidas à tripsinização. Essa linhagem foi utilizada para os ensaios de adesão e invasão.

#### 4.13. Ensaio de adesão

Os queratinócitos foram cultivados em placas de 12 poços em uma concentração de 10<sup>5</sup> células/mL. A cada poço foi adicionado uma suspensão celular de 10<sup>3</sup> ufc/mL de cada transformante de *C. albicans*; após 2 horas de incubação a 37°C os poços foram lavados com PBS por três vezes para a remoção das leveduras não aderidas e as células foram tratadas com tripsina por 2 minutos. Em seguida, 100 µL dessa suspensão foi plaqueada em Sabouraud e incubada a 37°C por 48 h. O número de colônias de cada transformante foi contado e comparado com os resultados da cepa ATCC.

#### 4.14. Ensaio de invasão

A cada poço com 10<sup>5</sup> células/mL de queratinócitos foi adicionado um inoculo de 10<sup>3</sup> ufc/mL de cada transformante, após 5 horas de incubação a 37°C, os poços foram lavados com PBS por 3 vezes para a remoção das leveduras não aderidas e as células foram tratadas com 5 µg/mL de nistatina por 60 minutos com o objetivo de matar as leveduras que se encontravam aderidas as células, mantendo assim, apenas as que invadiram as células. As células então foram mais uma vez lavadas com PBS por três vezes e lisadas adicionando 1mL de água gelada por 20 minutos. A seguir, 100 µL dessa suspensão foi plaqueada em Sabouraud e incubada a 37°C por 48 h. O número de colônias de cada transformante foi contado e comparado com os resultados da cepa ATCC.

#### 4.15. Análise molecular dos transformantes

A extração de DNA foi realizada segundo (Möller, Bahnweg *et al.*, 1992). A quantificação e determinação da pureza foi realizada segundo (Sambrook, 1989). O DNA foi então fragmentado com a enzima de restrição *Sau3AI* e clonado em *E. coli* XL1 blue com o kit Inst-AClone (Fermentas) e posteriormente o DNA plasmidial foi extraído das colônias positivas. O sequenciamento foi realizado pelo método de Sanger *et al.*, (1974) utilizando o sequenciador automático ABI Prism 3130 DNA Analyzer (Applied Biosystems) utilizando o kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Amersham Biosciences), seguindo as recomendações do fabricante, utilizando o oligonucleotídeo T7 forward promoter. A reação de sequenciamento foi realizada utilizando o seguinte ciclo: ciclo inicial de 1min/96°C seguido de 25 ciclos de 10seg/96°C, 5seg/50°C, 4min/60°C. A sequencia nucleotídica foi determinada através da incorporação de dideoxynucleotídeos (ddNTP) terminadores que foram analisadas e avaliadas automaticamente através dos cromatogramas gerados e interpretados pelo *software Sequence Scanner v1.0* (Applied Biosystems) convertidos em sequencia de DNA.



## RESULTADOS

### 1. Modelo *Galleria mellonella*

#### 1.2. Resposta de *G. mellonella* à infecção por *C. krusei* ou *C. albicans*

*G. mellonella* foi infectada com diferentes concentrações destas leveduras e a morte aumentou de acordo com a concentração de leveduras (figura 1A e B). A resposta de *G. mellonella* a *C. krusei* ou a *C. albicans* foi dose dependente. Foram selecionadas as concentrações  $5 \times 10^6$  ufc/larva de *C. krusei* ATCC 6258 e  $5 \times 10^5$  ufc/larva de *C. albicans* SC5314, que correspondiam ao equilíbrio em que as larvas não morriam todas no primeiro dia e nem muito tardiamente. Como controle e para verificar se a morte das larvas não foi pela grande quantidade de leveduras injetadas, infectou-se as larvas com  $5 \times 10^6$  ufc/larva de *C. krusei* ATCC 6258 e  $10^6$  ufc/larva de *C. albicans* SC5314 mortas com 4% de paraformaldeído por uma hora (figura 2).

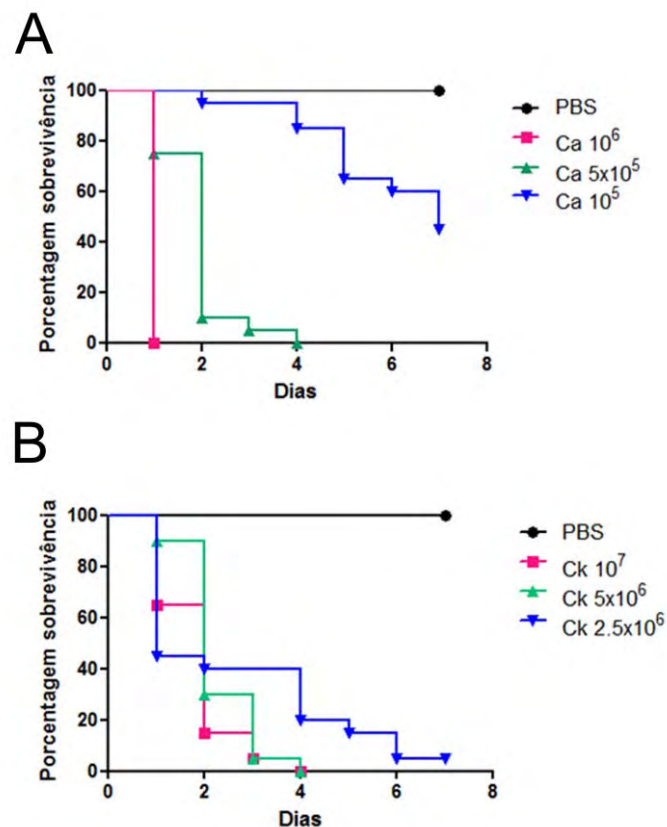


Figura 1: Curva de sobrevivência de *G. mellonella* infectadas com distintas concentrações de *C. albicans* (A) ou *C. krusei* (B) incubadas a 37°C.

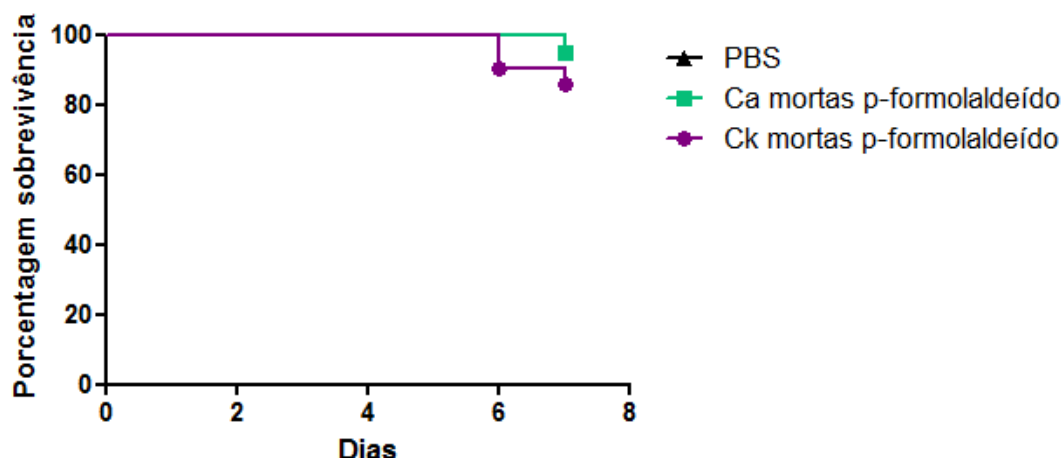


Figura 2: Larvas infectadas com  $5 \times 10^6$  ufc/larva de *C. krusei* ATCC 6258 e  $10^6$  ufc/larva de *C. albicans* SC5314 mortas com 4% de paraformaldeído por uma hora e incubadas a 37°C.

### 1.3. Virulência de *C. krusei* em diferentes temperaturas

Foi verificado se a temperatura pode influenciar na virulência de *C. krusei* e para isso as larvas infectadas foram incubadas a 30 e 37°C. A virulência de *C. albicans* diminui quando a incubação é realizada a 30°C (figura 3A). Por outro lado a temperatura não altera o padrão de virulência de *C. krusei* ATCC 6258 conforme mostrado na figura 3B. Entretanto para verificar se esse era um comportamento padrão da espécie foi realizado o mesmo experimento usando duas cepas clínicas de *C. krusei*. A virulência dos isolados clínicos também não foi afetada pela temperatura (figuras 3C e 3D).

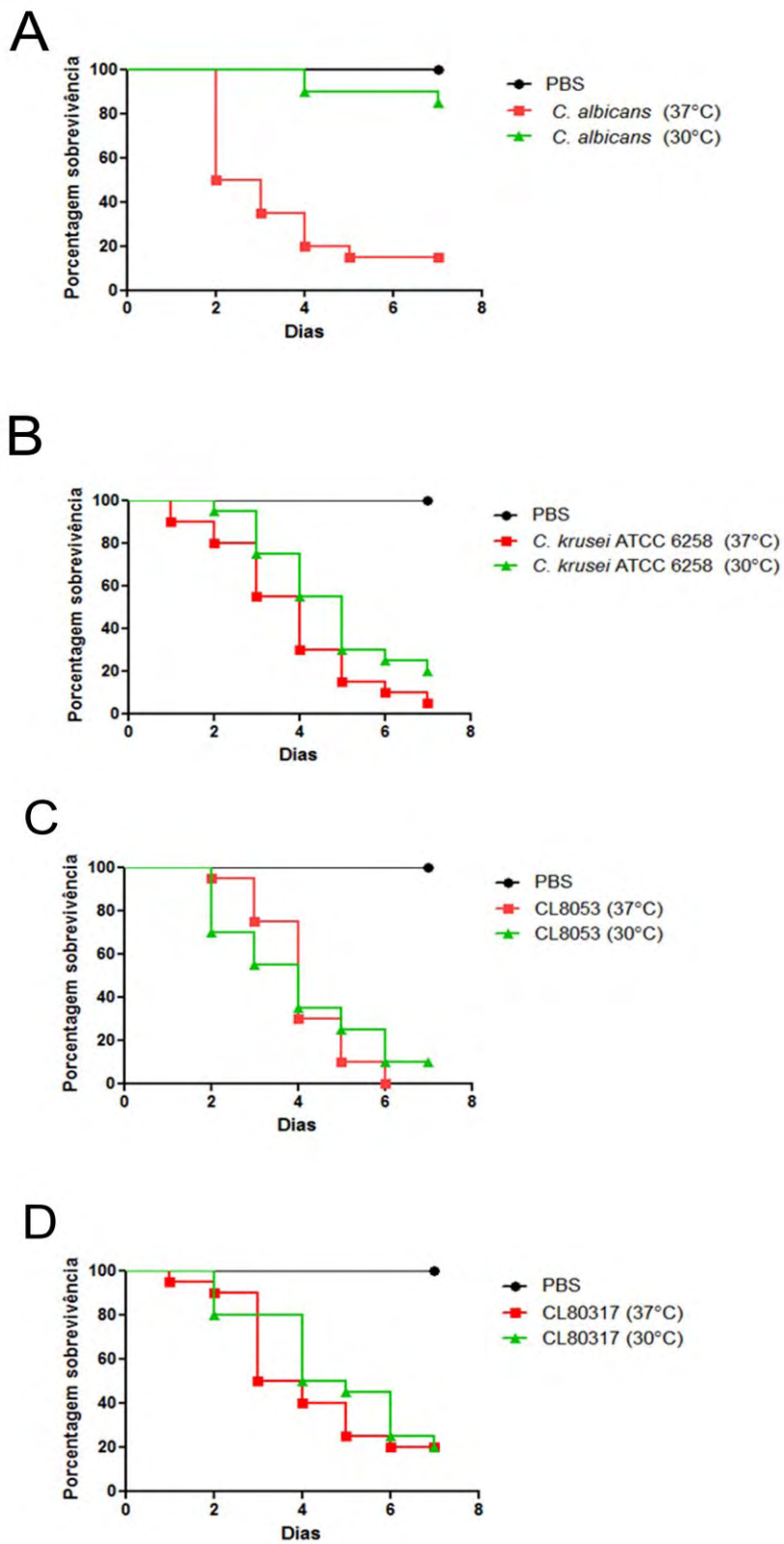


Figura 3: Teste de virulência em diferentes temperaturas. *C. albicans* SC5314 (A), *C. krusei* ATCC 6258 (B), isolado clínico de *C. krusei* CL8053 (C); isolado clínico de *C. krusei* CL80317 (D) incubados a 30 e 37°C.

#### 1.4. Curva de crescimento a diferentes temperaturas

O crescimento de *C. albicans* SC5314 e *C. krusei* ATCC 6258 foi avaliado a diferentes temperaturas 37°C e 30°C. As duas leveduras apresentaram diferenças no crescimento apenas quando incubadas a 37°C. Esses dados estão de acordo com os resultados observados nos experimentos *in vivo* em *G. mellonella* (37°C e 30°C).

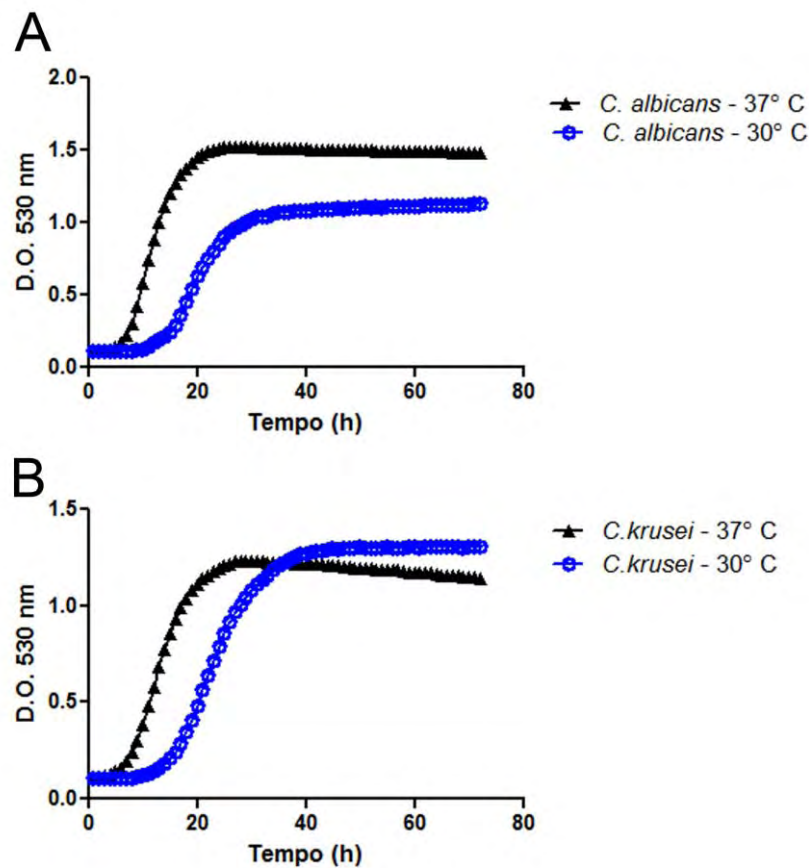


Figura 4: Curva de crescimento de *C. albicans* SC5314 (A) e *C. krusei* ATCC 6258 (B) realizada a 37°C ou 30°C.

#### 1.5. Fagocitose, Filamentação e Densidade Hemocitária

Para compreender melhor os mecanismos de virulência de *C. krusei* foram realizados os seguintes testes: ensaios de fagocitose, quantificação de células hemocitárias de larvas infectadas, além de verificar a presença de filamentação. O ensaio de fagocitose mostrou baixo índice de *C. krusei*

fagocitadas assim como *C. albicans* (figuras 5A e 5C), diferente do que foi descrito para *C. neoformans*. Em relação à filimentação, tanto *C. albicans* como *C. krusei* são capazes de filimentar in vivo no modelo de *G. mellonella*. A densidade hemocitária das larvas infectadas com *C. krusei* ou com os isolados clínicos CL8053 e CL80317 diminuiu consideravelmente quando se compara com as infectadas com *C. neoformans* ou com o controle PBS (figura 5D). O mesmo foi observado para as larvas infectadas com *C. albicans*.

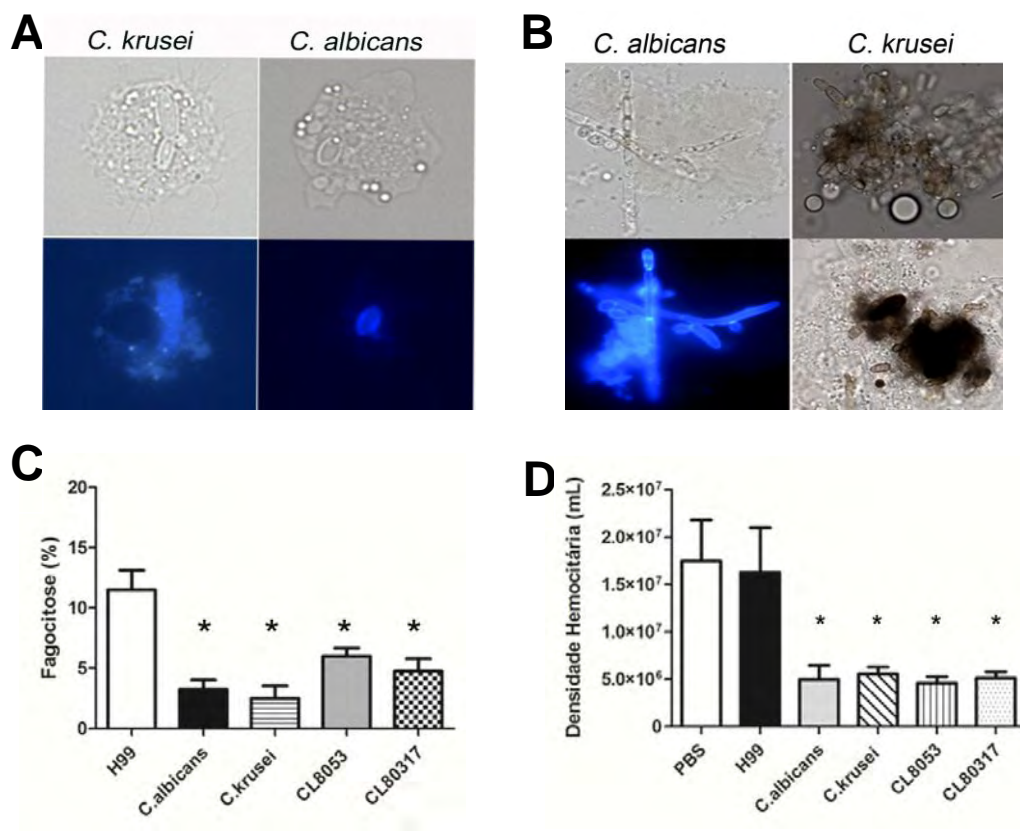


Figura 5: Fagocitose de *C. albicans* SC5314 e *C. krusei* ATCC 6258 em *G. mellonella* coloração feita por calcofluor (A) Filimentação encontrada nos tecidos de *G. mellonella* infectados com *C. albicans* SC5314 ou *C. krusei* ATCC 6258 (B). Porcentagem de fagocitose observada em larvas infectadas com *C. albicans* SC5314, *C. krusei* ATCC 6258 ou isolados clínicos CL8053 e CL80317 (C). Densidade hemocitária de *G. mellonella* infectadas com *C. albicans*, *C. krusei* e isolados clínicos (D). *C. neoformans* H99 foi usado como controle nos ensaios de fagocitose e densidade hemocitária (\*  $p < 0,05$ ).

## 1.6. Melanização

A melanização é um processo de resposta a organismos estranhos observada em *G. mellonella*. Durante o estudo foi observada melanização rápida e intensa que aparentemente teria relação com a quantidade de células usadas na infecção (figura 6A). A melanização de *C. krusei* e dos dois isolados clínicos CL8053 e CL80317 foi então medida espectrofotometricamente (405 nm) a partir da hemolinfa das larvas nos tempos de três e 24 horas. Na figura 6B observa-se significativo aumento de melanização em larvas infectadas por *C. krusei* em três e 24 horas, em concentração de  $5 \times 10^6$  ufc/larva. Nas outras concentrações, não houve aumento de densidade óptica com o tempo. O mesmo comportamento foi observado com isolados clínicos CL8053 e CL80317 (figuras 6C e D).

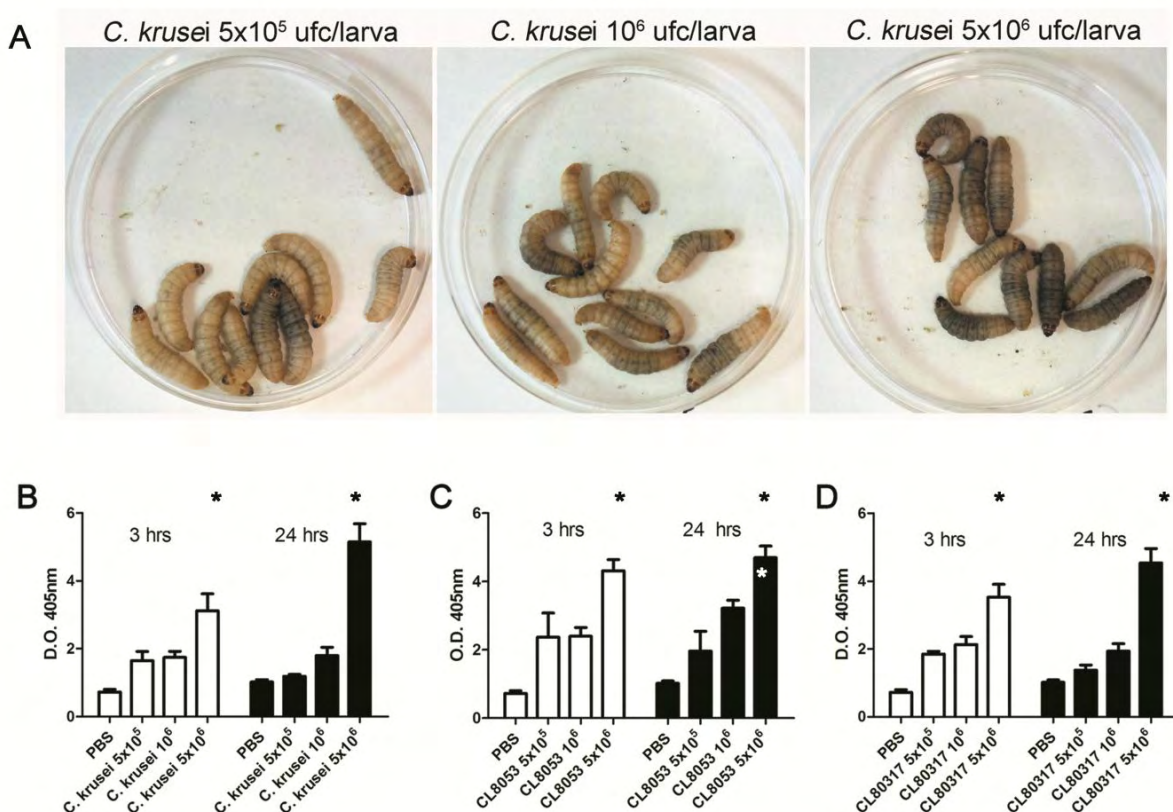


Figura 6: Melanização produzida em larvas infectadas com distintas concentrações de *C. krusei* ATCC 6258 (A). Quantificação da melanização a partir da densidade óptica (O.D.) da hemolinfa das larvas infectadas com *C. krusei* ATCC 6258 (B) e isolados clínicos (C e D) nas concentrações de  $5 \times 10^5$ ,  $10^6$ ,  $5 \times 10^6$  ufc/larva. Valores em três e em 24 horas (\*  $p < 0,05$ ).



### 1.7. Tratamento antifúngico em *G. mellonella*

Larvas infectadas com *C. krusei* ATCC 6258  $5 \times 10^6$  ufc/larva foram tratadas com fluconazol nas concentrações de 4, 12, 32, 64, 128 mg/kg (conversões  $\mu\text{g/larva}$  tabela 1) com o objetivo de verificar a eficácia dessa droga nesse modelo. Entretanto, observou-se que fluconazol não apresentou aumento da sobrevivência das larvas infectadas por *C. krusei* mesmo nas concentrações mais altas (figura 7A e B). Além disso, não existem diferenças estatísticas entre as diferentes doses testadas. Os mesmos experimentos de eficácia de fluconazol foram realizados com larvas infectadas com *C. albicans* SC5314  $5 \times 10^5$  ufc/larva (figura 7 C e D), e verificou-se sobrevivência de 80% das larvas no quarto dia de experimento. Foi realizado teste de toxicidade com todas as concentrações e observou-se que fluconazol 128 mg/kg apresenta toxicidade matando 20% das larvas, o que explica a porcentagem mais alta de morte quando as larvas são tratadas com essa concentração em comparação as mais baixas (figura 10A).

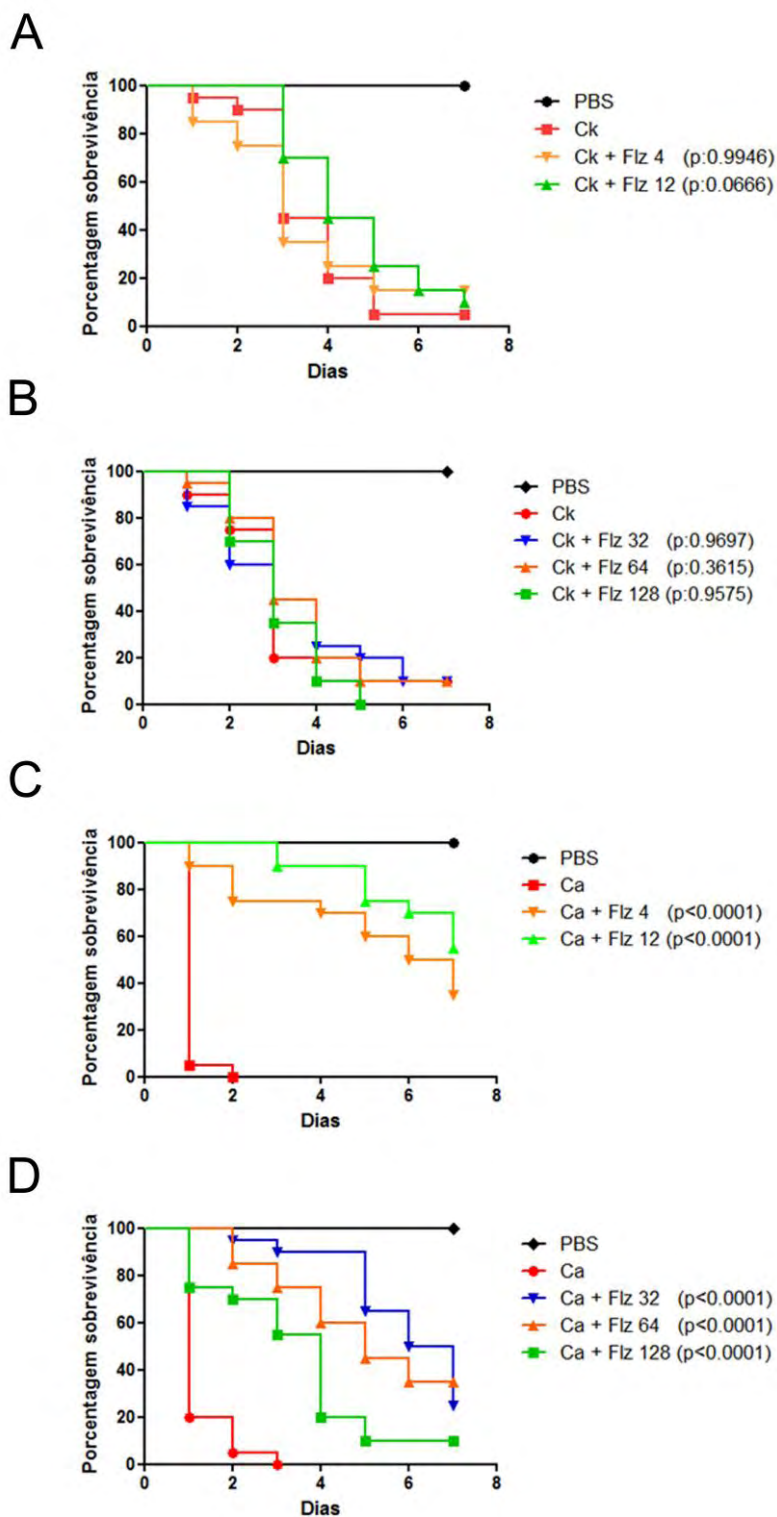


Figura 7: Eficácia de tratamento com fluconazol. Larvas infectadas com  $5 \times 10^6$  ufc/larva *C. krusei* e tratadas com fluconazol nas concentrações de 4 e 12 mg/kg. (A) e 32, 64 e 128 mg/kg (B). Larvas infectadas com  $5 \times 10^5$  ufc/larva *C. albicans* e tratadas com fluconazol nas concentrações de 4 e 12 mg/kg. (C) e 32, 64 e 128 mg/kg (D).



Por outro lado larvas infectadas por *C. krusei* nas mesmas condições anteriores tratadas com anfotericina B 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  apresentaram aumento na sobrevivência de 60% no quarto dia do experimento (Figuras 8A), da mesma forma as infectadas com *C. albicans* e tratadas com anfotericina B apresentaram aumento na sobrevivência em todas as concentrações testadas (figura 8B).

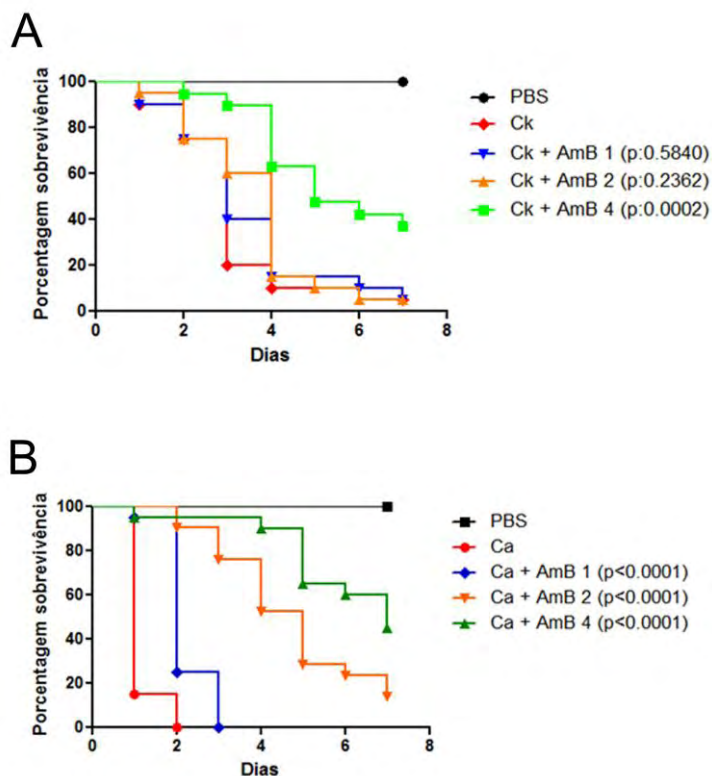


Figura 8: Eficácia de tratamento com anfotericina B. Larvas infectadas com  $5 \times 10^6$  ufc/larva *C. krusei* e tratadas com anfotericina B nas concentrações de 1, 2 e 4 mg/kg. (A) Larvas infectadas com  $5 \times 10^5$  ufc/larva *C. albicans* e tratadas com anfotericina B nas concentrações de 1, 2 e 4 mg/kg (B).

Da mesma forma realizou-se o tratamento com caspofungina para as larvas infectadas com *C. krusei* sendo eficaz na concentração de 4 mg/kg e apresentando sobrevivência de 90% das larvas no quarto dia de experimento (figura 9A), assim como foi observado com o tratamento de anfotericina B, o

tratamento de larvas infectadas com *C. albicans* e tratadas com caspofungina foram eficazes em todas as concentrações testadas (figura 9B).

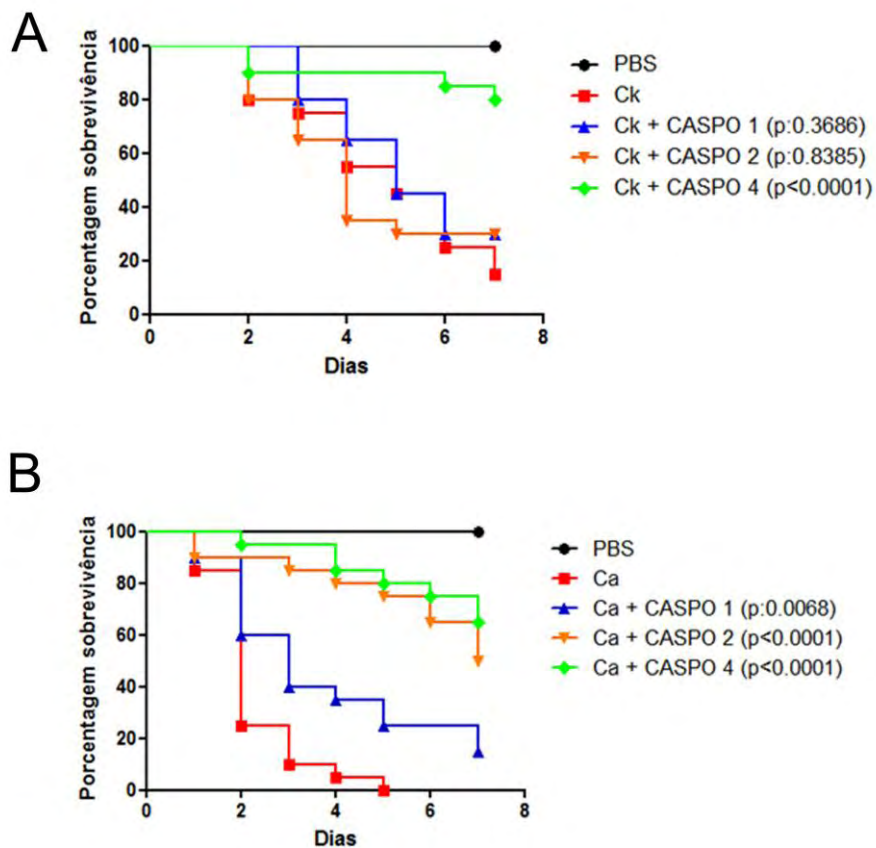


Figura 9: Eficácia de tratamento com caspofungina. Larvas infectadas com  $5 \times 10^6$  ufc/larva *C. krusei* e tratadas com caspofungina nas concentrações de 1, 2 e 4 mg/kg. (A) Larvas infectadas com  $5 \times 10^5$  ufc/larva *C. albicans* e tratadas com caspofungina nas concentrações de 1, 2 e 4 mg/kg (B).

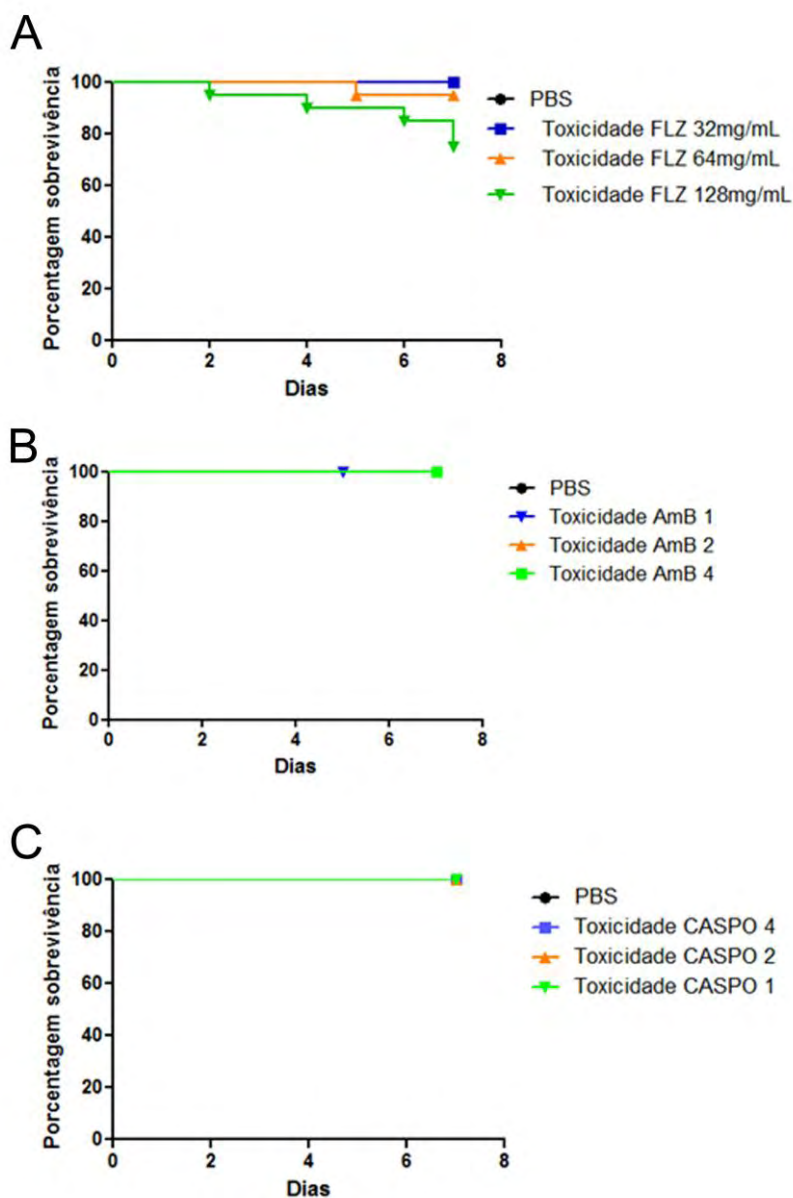


Figura 10: Teste de toxicidade realizado com fluconazol 32, 64 e 128 mg/kg, anfotericina B 1, 2 e 4 mg/kg e caspofungina 1, 2 e 4 mg/kg.

Realizaram-se ainda combinações de antifúngicos em doses subterapêuticas buscando melhora na eficácia do tratamento e diminuição da toxicidade. Para isso as larvas infectadas com *C. krusei* foram tratadas com as seguintes combinações de antifúngicos anfotericina B 1 mg/kg + fluconazol 4 mg/kg; anfotericina B 1 mg/kg + fluconazol 12 mg/kg. A combinação de anfotericina B + fluconazol não apresentou melhorias significativas em relação ao fluconazol sozinho tanto em 4 mg/kg como em 12 mg/kg (figura 11).

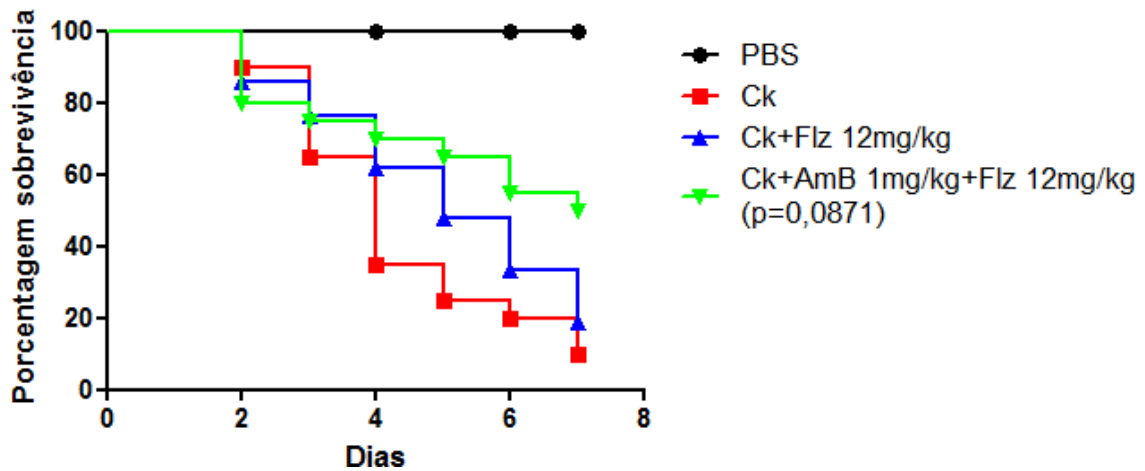


Figura 11: Combinação de antifúngicos em doses subterapêuticas para o tratamento de infecção por *C. krusei*.

### 1.8. Determinação da carga fúngica

A carga fúngica foi determinada pela recuperação das leveduras infectadas com *C. albicans* ou *C. krusei* e tratadas com fluconazol (12 mg/kg) ou anfotericina B (4 mg/kg). O número de UFCs das duas leveduras sem tratamento sofreu aumento com o passar dos dias. Observou-se grande diminuição no número de UFC de *C. albicans* tratadas com fluconazol ou anfotericina B. Nas larvas infectadas com *C. krusei* houve a redução em 10 vezes a carga fúngica com o tratamento com anfotericina B, entretanto, no tratamento com fluconazol, a redução no número de ufc foi observado apenas no início do experimento.

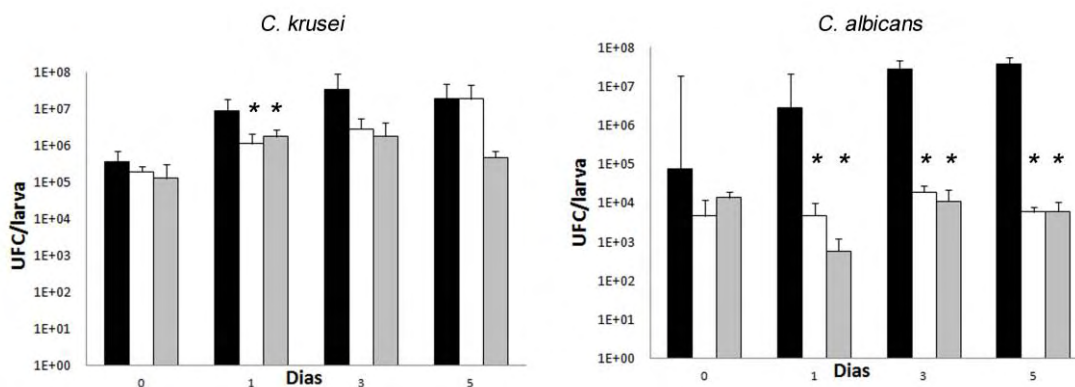


Figura 12: Efeito do tratamento antifúngico na carga fúngica de larvas infectadas com  $5 \times 10^6$  cells/larvae de *C. krusei* ou com  $5 \times 10^5$  cells/larvae de *C. albicans*. Barras em preto - larvas sem tratamento, barras em branco - tratamento com fluconazol (12 mg/kg), barras em cinza - tratamento com anfotericina B (4 mg/kg) - \*  $p < 0,05$ .

### 1.9. Efeito dos antifúngicos sobre a fisiologia de *Galleria mellonella* durante a infecção

Avaliou-se também o efeito na densidade hemocitária, fagocitose e melanização de larvas infectadas com *C. albicans* ou *C. krusei* e tratadas com fluconazol 64 mg/kg ou anfotericina B 4 mg/kg. Os tratamentos antifúngicos não alteraram a densidade hemocitária com *C. krusei* (figura 13A). No entanto o tratamento com fluconazol reduziu duas vezes ( $p=0,017$ ) a densidade hemocitária em larvas infectadas com *C. albicans* (figura 13A). Com relação à melanização, as larvas infectadas com *C. krusei* não tiveram a melanização influenciada pelo tratamento antifúngico, por outro lado nas larvas infectadas com *C. albicans* a melanização foi reduzida em 1,8 vezes com anfotericina B ( $p=0,0139$ ) e 1,5 vezes ( $p=0,003$ ) com fluconazol em 24 horas (figura 13 B). Não foram observadas diferenças na melanização com 3 horas de tratamento. Não houve diferenças na fagocitose com o tratamento em qualquer das leveduras avaliadas (figura 14). As drogas antifúngicas por si só não causam nenhum efeito em *G. mellonella* nos parâmetros analisados.

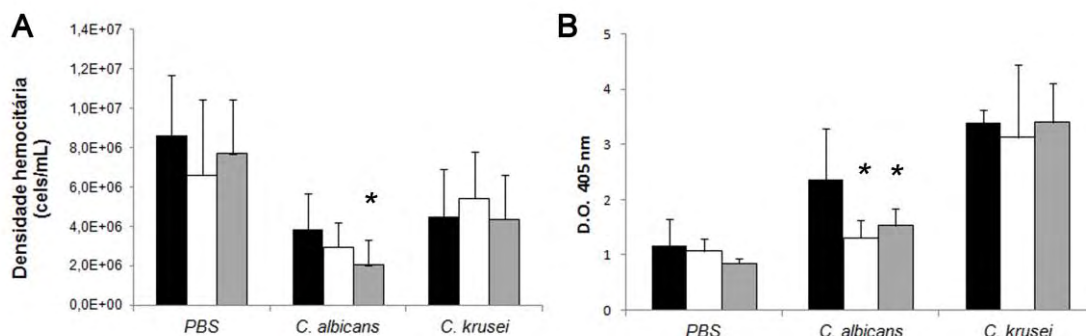


Figura 13: Densidade hemocitária de larvas infectadas com *C. albicans* ou *C. krusei* (A) tratadas com fluconazol 64 mg/kg ou anfotericina B 4 mg/kg; Densidade óptica (D.O) da hemolinfa de larvas infectadas com *C. albicans* ou *C. krusei* tratadas com fluconazol 64 mg/kg ou anfotericina B 4 mg/kg (B). Barras pretas - sem tratamento; barras brancas - anfotericina B 4 mg/kg; barras cinzas - fluconazol 64mg/kg, (\* $p < 0,05$ ).

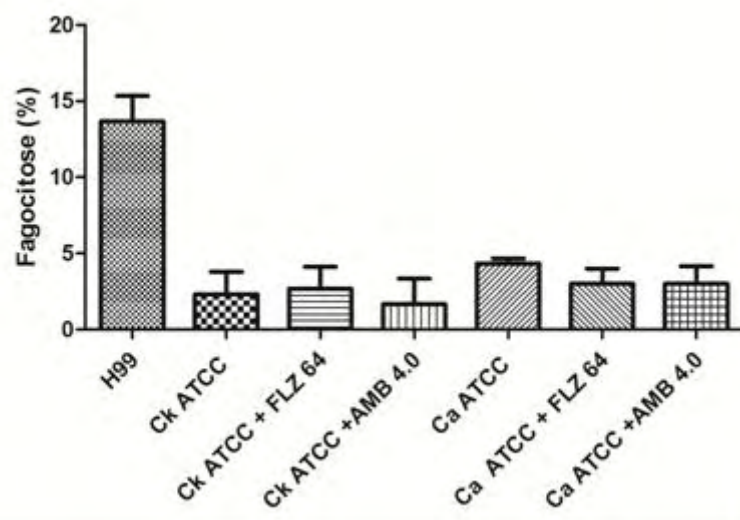


Figura 14: Percentual de fagocitose de larvas infectadas com *C. albicans* ou *C. krusei* tratadas com fluconazol 64 mg/kg (FLZ 64) ou Anfotericina B 4 mg/kg (AMB 4.0).



### 1.10. Histopatologia

Na histopatologia de larvas infectadas com *C. albicans* ou *C. krusei* foram observadas tanto leveduras e pseudohifas espalhadas por todo o tecido. O tratamento com fluconazol 12 mg/kg ou anfotericina B 4 mg/kg reduziu o numero tanto de *C. albicans* como de *C. krusei*, além disso, as leveduras foram encontradas rodeadas por uma estrutura bem definida de células de *G. mellonella*. Anfotericina B apresentou o mesmo efeito que fluconazol, entretanto o numero de leveduras encontradas no tratamento com anfotericina B foi menor. As estruturas fúngicas são observadas em cor avermelhada.

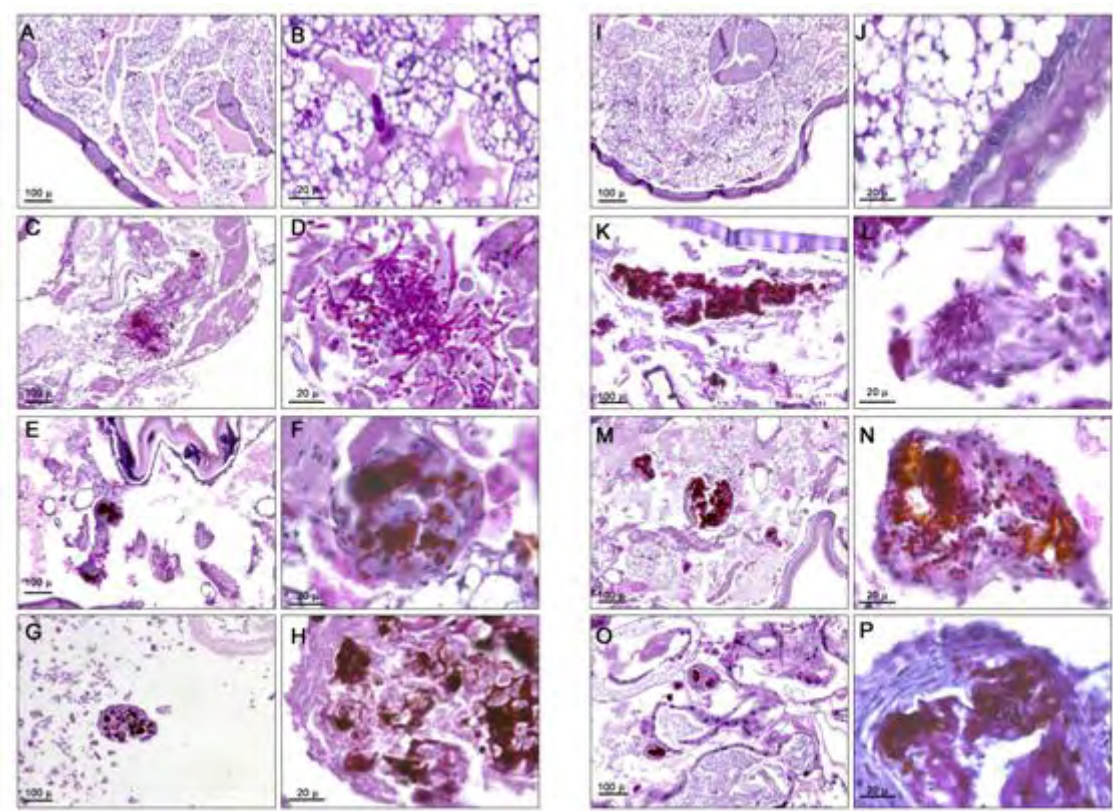


Figura 15: Histopatologia de *G. mellonella* infectadas com *C. krusei* ou *C. albicans* e tratadas com diferentes antifúngicos. *G. mellonella* infectada com  $5 \times 10^5$  ufc/larva de *C. albicans* (C-H), ou com  $5 \times 10^6$  ufc/larva de *C. krusei* (K-P). O processamento histopatológico foi realizado após 96 horas de infecção. Controle sem infecção (A, B, I, J), larvas infectadas e sem tratamento (C, D, K, L), larvas infectadas e tratadas com fluconazol 12 mg/kg, (E, F, M and N), larvas infectadas e tratadas com anfotericina B 4 mg/kg. (G, H, O and P). Aumento de 10x (A, C, E, G, I, K, M, O), aumento de 64x. (B, D, F, H, J, L, N ,P).

## 2. Modelo *Caenorhabditis elegans*

O modelo animal não convencional *C. elegans* foi também usado para avaliar a virulência e a eficácia aos antifúngicos. Realizou-se a infecção das larvas com *C. albicans* e *C. krusei* as quais foram patogênicas para as larvas e, além disso, foi observada intensa filamentação em larvas mortas (figura 16).

Realizou-se o tratamento com anfotericina B 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , fluconazol 12  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e caspofungina 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , além da combinação de antifúngicos no tratamento de *C. krusei* com doses subterapêuticas de fluconazol e anfotericina B. Para *C. krusei*, os tratamentos antifúngicos com anfotericina B 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e caspofungina 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  geraram sobrevivência de 65% e 85% das larvas, respectivamente. Entretanto, o tratamento com Fluconazol 12  $\mu\text{g}/\text{mL}$  não foi eficaz contra a infecção por *C. krusei* (figura 17A). Em relação a *C. albicans*, todos os tratamentos das larvas infectadas com foram eficazes gerando sobrevivência de 90%, 85% e 95% das larvas com o tratamento com anfotericina B 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , fluconazol 12  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e caspofungina 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente (figura 17B). Em relação a combinação de antifúngicos fluconazol 12  $\mu\text{g}/\text{mL}$  + anfotericina B 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para o tratamento de larvas infectadas com *C. krusei* não se mostrou mais eficaz do que o tratamento feito apenas com fluconazol 12  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (figura 17C).



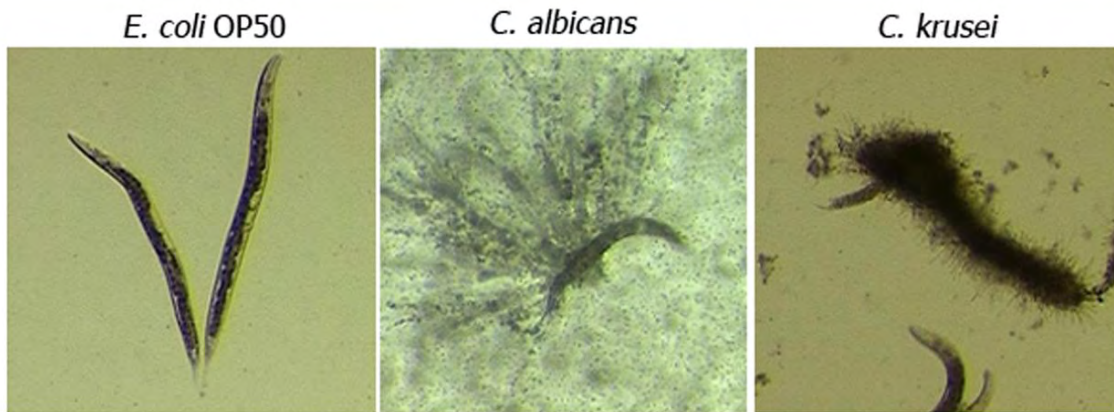


Figura 16: Larvas de *C. elegans* AU37 *glp-4(bn2)I*; *sek-1(km4)*, infectadas por *C. albicans*, *C. krusei* ou *E. coli* OP50, não patogênico para as larvas.

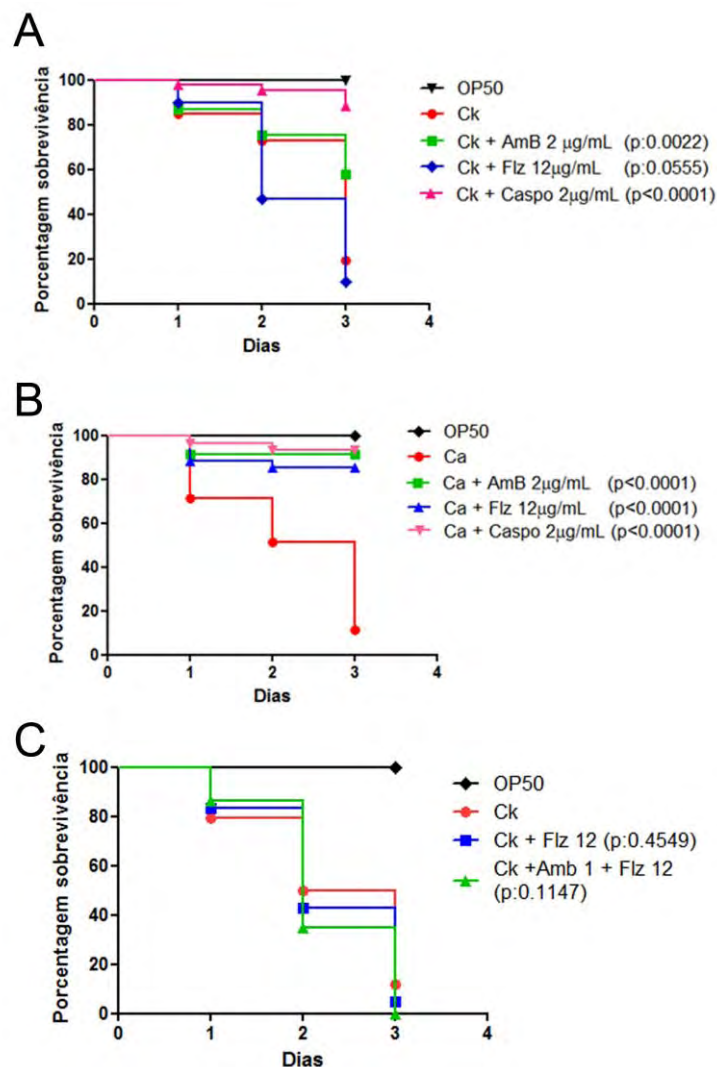


Figura 17: Eficácia terapêutica em modelo *C. elegans* usando cepa AU37 *glp-4(bn2)I*; *sek-1(km4)* Tratamento com anfotericina B 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , fluconazol 12  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e caspofungina 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  com larvas infectadas com *C. krusei* (A). C.

*albicans* (B); Combinação de antifúngicos para tratamento de larvas infectadas com *C. krusei* (C).

### 2.1. Influência da temperatura na virulência de *C. krusei* e *C. albicans*

No modelo de *C. elegans* comparou-se a virulência das duas espécies de *Candida*, diferentemente do que ocorre no modelo de *G. mellonella* as duas espécies apresentam virulência semelhante (figura 18). Esse resultado pode ser explicado pelo crescimento semelhante das duas espécies a 25°C, temperatura na qual os experimentos são realizados.

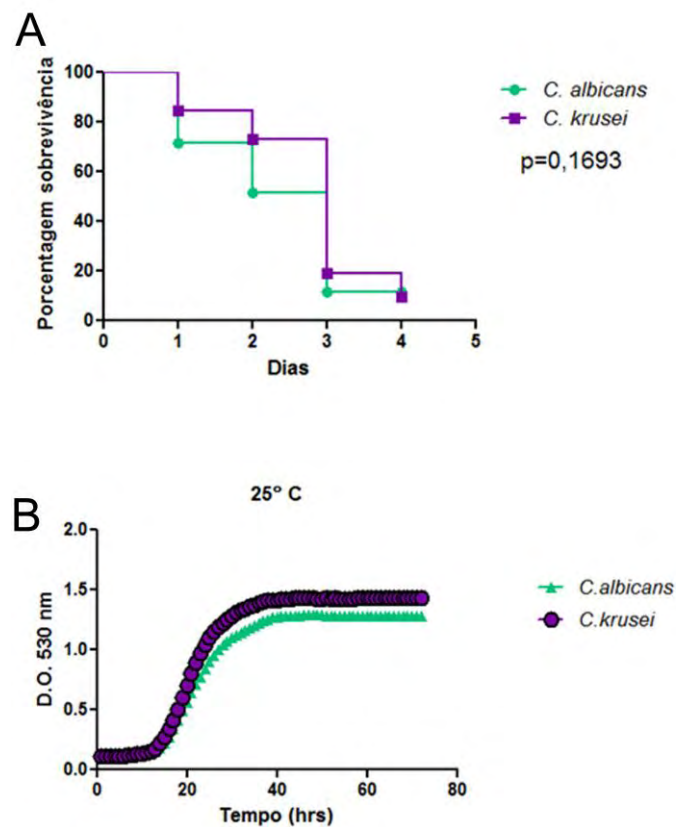


Figura 18: Virulência de *Candida albicans* SC5314 e *C. krusei* ATCC 6258 em *C. elegans* (A). Curva de crescimento de *C. albicans* SC5314 e *C. krusei* ATCC 6258 realizada a 25°C (B)

## 2.2. Influência da cascata imunológica de TGF- $\alpha$ na sensibilidade a *C. krusei*

A cascata imunológica de TGF- $\alpha$  tem papel protetor em *C. elegans* contra a bactéria *Serratia marcescens* aqui, verificamos que larvas mutantes dessa rota também são mais sensíveis à infecção por *C. krusei*, mostrando que essa rota é importante na defesa contra *C. krusei*.

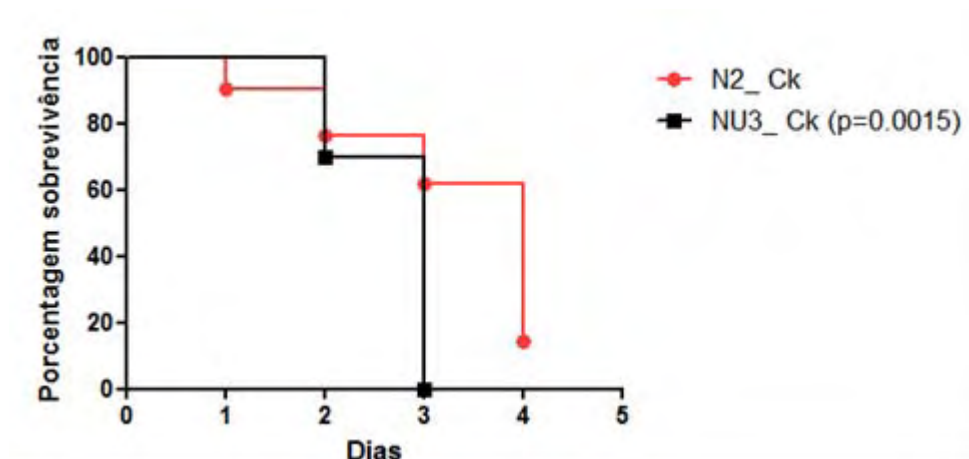


Figura 19: Influência da cascata imunológica de TGF- $\alpha$  na sensibilidade a *C. krusei*. Sobrevivência das cepas N2, selvagem e NU3 *dbl-1* (*nk3*) infectadas com *C. krusei*

## 3. Efeitos da Anfotericina B e Fluconazol sob Macrófagos RAW 267.7. infectados com *C. albicans* ou *C. krusei*

A fagocitose de *C. albicans* e *C. krusei* por macrófagos RAW 267.7 foi avaliada na presença e na ausência de anfotericina B 2  $\mu$ g/mL e fluconazol 8  $\mu$ g/mL. As concentrações usadas foram avaliadas quanto a sua citotoxicidade pela técnica do XTT, não sendo citotóxicas nas concentrações selecionadas para o teste. Distintos eventos foram avaliados, os quais mostraram diferenças quanto ao tratamento antifúngico entre as leveduras avaliadas. *C. albicans* apresentou intensa filamentação possivelmente causada pelo soro fetal bovino presente no meio de cultivo dos macrófagos, com isso, as observações relatadas de macrófagos sem tratamento e tratados com fluconazol foram feitas com até 3 horas de experimento. *Candida albicans* e *C. krusei* fagocitadas são capazes não apenas de sobreviver dentro do macrófago como também formar pseudo-hifas (figura 20 e 21) e com isso o macrófago altera forma, tamanho, se

desloca ao longo da pseudo-hifa na tentativa de concluir a fagocitose. Entretanto o crescimento da levedura é muito intenso e a digestão termina não sendo realizada, e a pseudo-hifa atravessa o macrófago (*C. albicans*) podendo também estourar a célula e liberar as leveduras. Esse comportamento é observado quando os macrófagos foram apenas infectados e também quando foram infectados e tratados com fluconazol. A adição de anfotericina B matou grande parte das leveduras não fagocitadas, entretanto algumas leveduras que já se encontravam fagocitadas antes do tratamento continuaram crescendo no interior dos macrófagos. Além disso, observou-se a fagocitose das leveduras mortas por ação de anfotericina B. Em adição o macrófago tenta se dividir, mas volta a se fundir, pois estão conectados por uma pseudo-hifa.

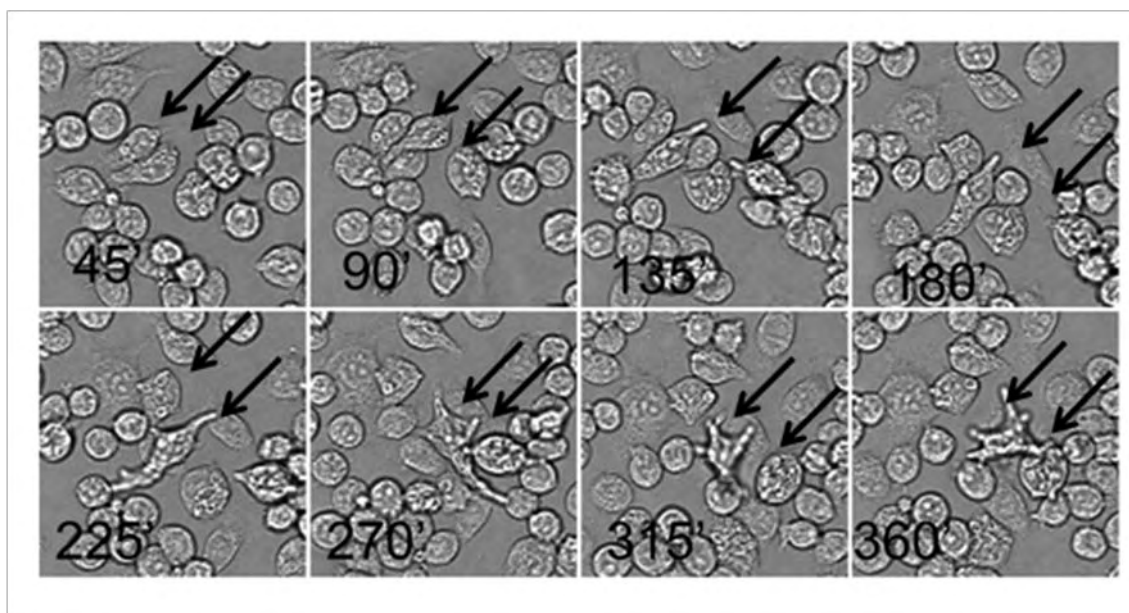


Figura 20: Cinética de fagocitose de *C. krusei* no interior dos macrófagos RAW 267.7.

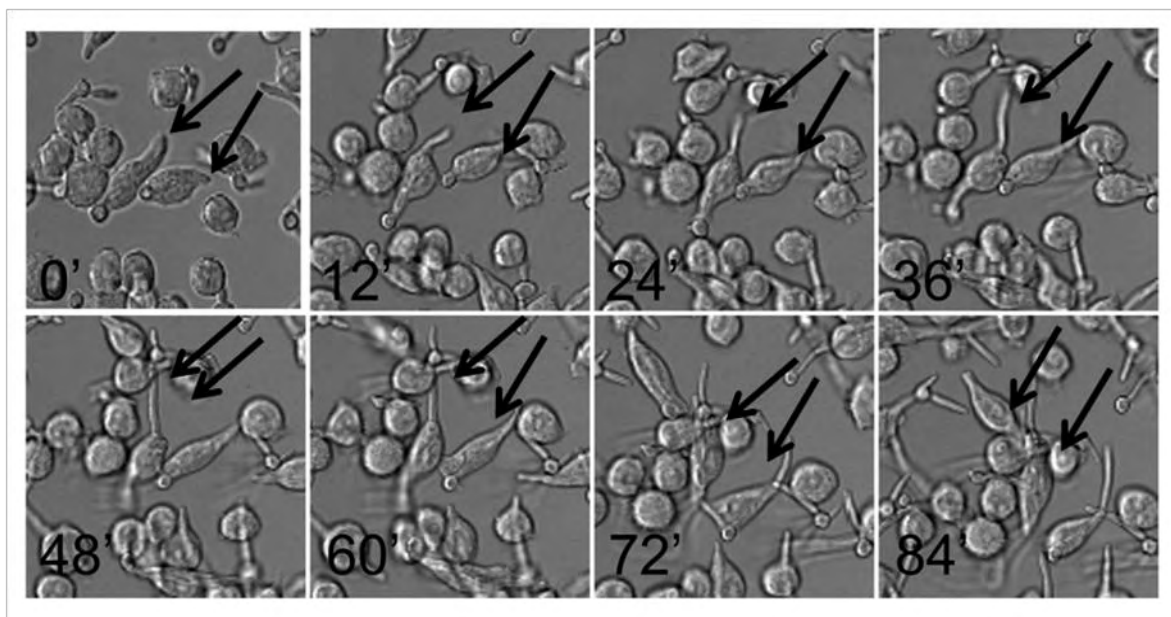


Figura 21 Cinética de fagocitose de *C. albicans* no interior dos macrófagos RAW 267.7

### 3.1. Quantificação da fagocitose de *C. albicans* e *C. krusei* por macrófagos RAW 267.7

A confecção de vídeos dos modelos *in vivo* permitiu analisar a fagocitose durante a infecção por *C. albicans* e *C. krusei* assim como quantificar o número de eventos de fagocitose com e sem tratamento com anfotericina B 2  $\mu\text{g/mL}$  e fluconazol 8  $\mu\text{g/mL}$ . Durante o ensaio de fagocitose uma média de 10% dos macrófagos fagocitaram *C. albicans* (figura 21A), entretanto esse valor diminuiu com o tratamento com anfotericina 2  $\mu\text{g/mL}$  para 5% ( $p= 0,0082$ ), houve também aumento da fagocitose com o tratamento com fluconazol 8  $\mu\text{g/mL}$ , entretanto esse valor não foi estatisticamente significativo ( $p=0,3145$ ). Houve diferença de fagocitose entre os tratamentos sendo que com fluconazol 8  $\mu\text{g/mL}$  o índice de fagocitose foi maior do que com anfotericina 2  $\mu\text{g/mL}$  ( $p= 0,0247$ ).

Durante a infecção de RAW 267.7 com *C. krusei* observou-se um percentual de 6% de fagocitose dessa levedura (figura 21B), entretanto o tratamento antifúngico não influenciou a fagocitose quando em comparação com o de não tratados. O tratamento com anfotericina B 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  aumentou a fagocitose de *C. krusei* em 1,3 vezes em relação ao tratamento com fluconazol 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $p=0,0345$ ).

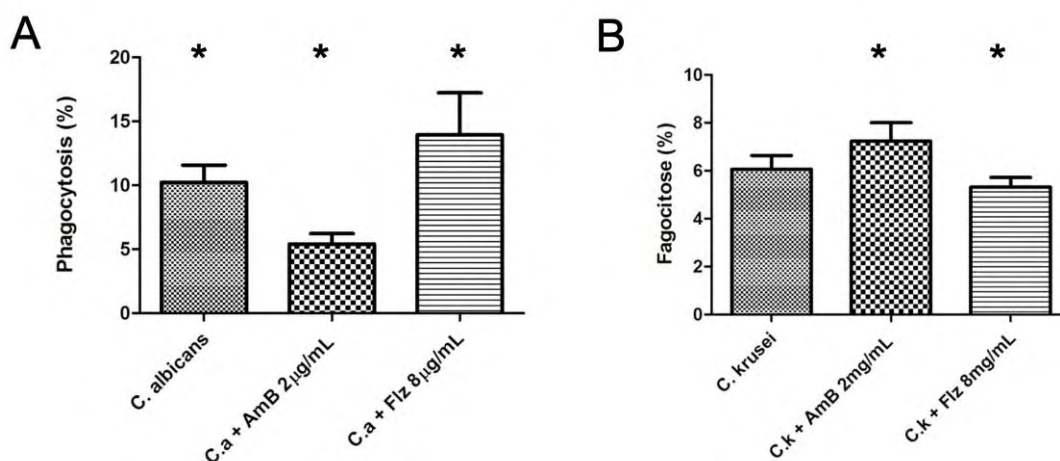


Figura 22: Percentual de fagocitose de macrófagos RAW 267.7 infectados com *C. albicans* (A) ou *C. krusei* (B) e tratados com anfotericina B 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e fluconazol 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

### 3.2. Quantificação de citocinas produzidas por linhagem de macrófagos RAW 267.7.

A quantificação das citocinas produzidas pela linhagem celular RAW 267.7 mostrou que entre as sete citocinas quantificadas apenas houve detecção de TNF- $\alpha$  (figura 23), a qual apresentou distintas quantidades quando do tratamento com fluconazol e anfotericina B, assim como resposta as infecções de *C. albicans* e *C. krusei*. Quando os macrófagos foram tratados com anfotericina B houve a produção de 130 vezes mais TNF- $\alpha$ , do que o controle sem tratamento. O tratamento com fluconazol não demonstrou diferenças em relação ao controle. A infecção de macrófagos com *C. albicans* ou com *C. krusei* não apresentou diferenças quanto à produção de TNF- $\alpha$ . *C. albicans* é capaz de induzir maior produção de TNF- $\alpha$  do que *C. krusei*, tanto



com tratamento com fluconazol (2,3 vezes mais) com anfotericina (1,6 vezes mais).

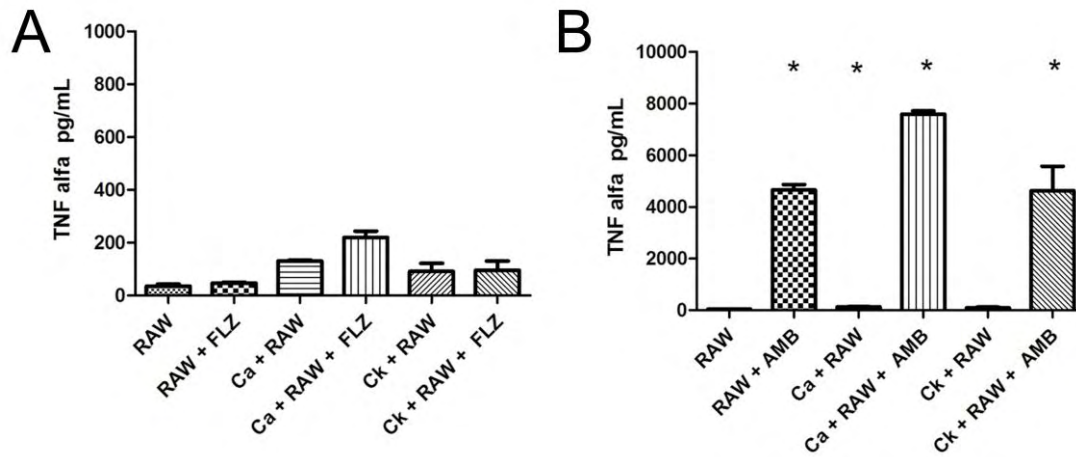


Figura 23: Valores de TNF  $\alpha$  (pg/mL) produzidas por macrófagos RAW infectados com *C. albicans* ou *C. krusei* e tratados com fluconazol (A), macrófagos RAW infectados com *C. albicans* ou *C. krusei* e tratados com anfotericina B (B), \*  $p < 0,05$ .

### 3.3. Quantificação de citocinas produzidas por macrófagos primários

A infecção e tratamento de macrófagos primários com *C. albicans* e *C. krusei* gerou maior número de citocinas liberadas quando comparadas com os macrófagos RAW 267.7. Foram detectadas as citocinas TNF  $\alpha$ , IL-1-b, IL-6, IL-10 e IL-17.

O TNF- $\alpha$  sofreu aumento de 43, 54 e 3 vezes quando os macrófagos foram tratados com anfotericina 2  $\mu\text{g/mL}$ , 0,5  $\mu\text{g/mL}$  e fluconazol 8  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente (figura 24). A infecção por *C. albicans* aumentou a concentração de TNF- $\alpha$  em 178 vezes em relação ao controle de macrófagos sem infectar e o tratamento com anfotericina 0,5  $\mu\text{g/mL}$  aumentou a liberação dessa citocina em 5 vezes em relação ao controle de macrófagos sem tratamento. *C. krusei* aumentou a liberação de TNF- $\alpha$  em quase 200 vezes, entretanto o tratamento antifúngico não causou alterações significativas.

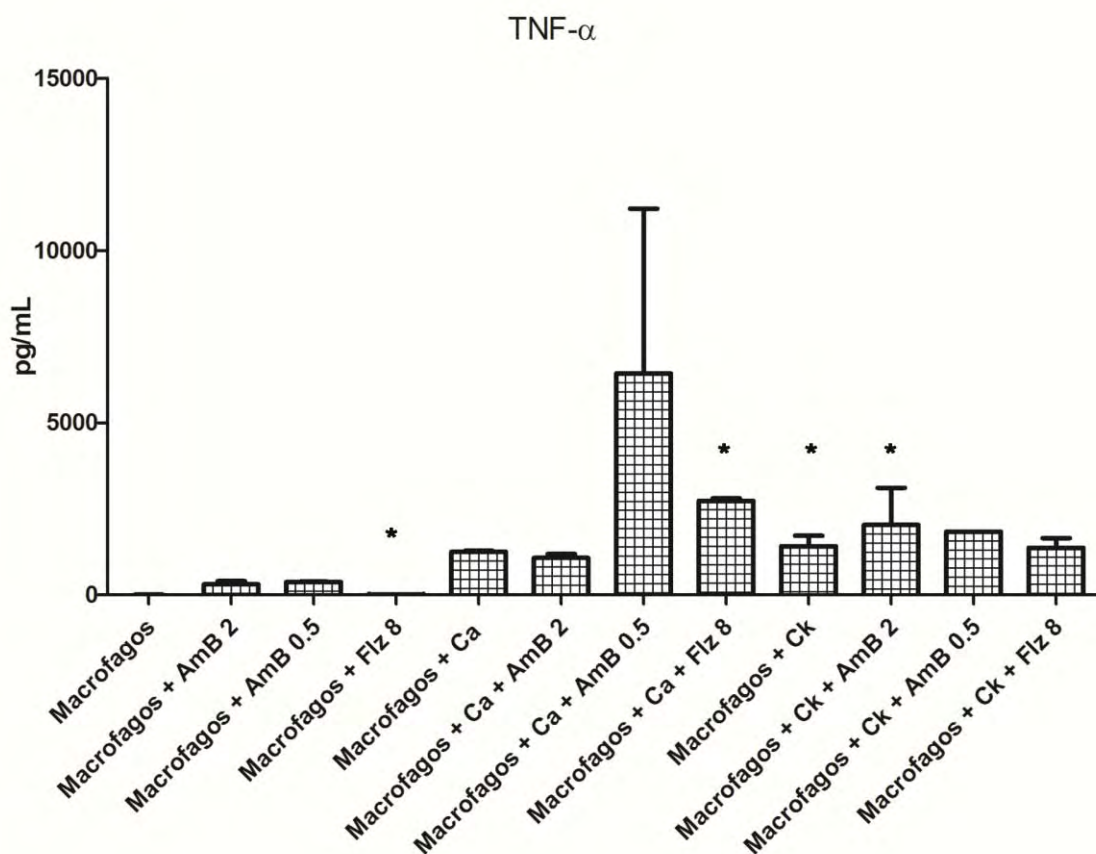


Figura 24: Valores de TNF  $\alpha$  (pg/mL) produzidas por macrófagos primários infectados com *C. albicans* ou *C. krusei* e tratados com fluconazol 8  $\mu$ g/mL ou anfotericina B 0,5 e 2  $\mu$ g/mL, (\*  $p < 0,05$ ).

A citocina IL-1-b aumentou 12, 14 e 2 vezes com o tratamento de macrófagos com anfotericina 2  $\mu$ g/mL, 0,5  $\mu$ g/mL e fluconazol 8  $\mu$ g/mL, respectivamente (figura 24). Quando infectada com *C. albicans* houve o aumento de 60 vezes na liberação de IL-1-b em relação ao controle sem infectar. Por outro lado *C. krusei* causou o aumento de IL-1-b em 180 vezes e o tratamento com anfotericina 2  $\mu$ g/mL gerou aumento de 2,3 vezes. Os tratamentos antifúngicos não produziram alterações quando na liberação de citocinas quando os macrófagos estavam infectados com *C. albicans* e *C.*



*krusei*

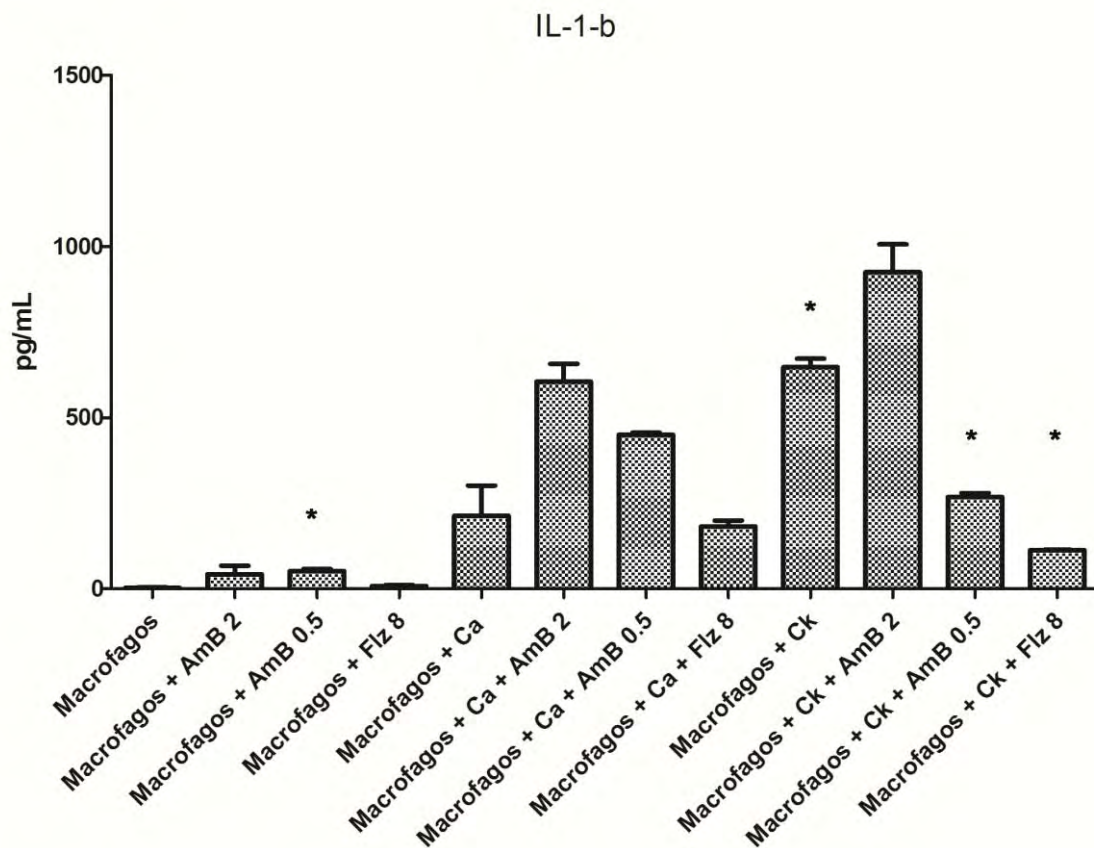


Figura 25: Valores de IL-1-b (pg/mL) produzidas por macrófagos primários infectados com *C. albicans* ou *C. krusei* e tratados com fluconazol 8  $\mu$ g/mL ou anfotericina B 0,5 e 2  $\mu$ g/mL, (\*  $p < 0,05$ ).

Outra citocina detectada nesse experimento foi a IL-6, a qual teve seus valores aumentados em 15, 18 e 3 vezes com os tratamentos de anfotericina 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e fluconazol 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  respectivamente (figura 26). *Candida albicans* gerou aumento de 10 vezes na liberação dessa citocina e o tratamento com anfotericina 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  macrófagos infectados com *C. albicans* aumentou a IL-6 em 5 vezes. *Candida krusei* causou a liberação de IL-6 em 53 vezes mais que o controle sem infecção.

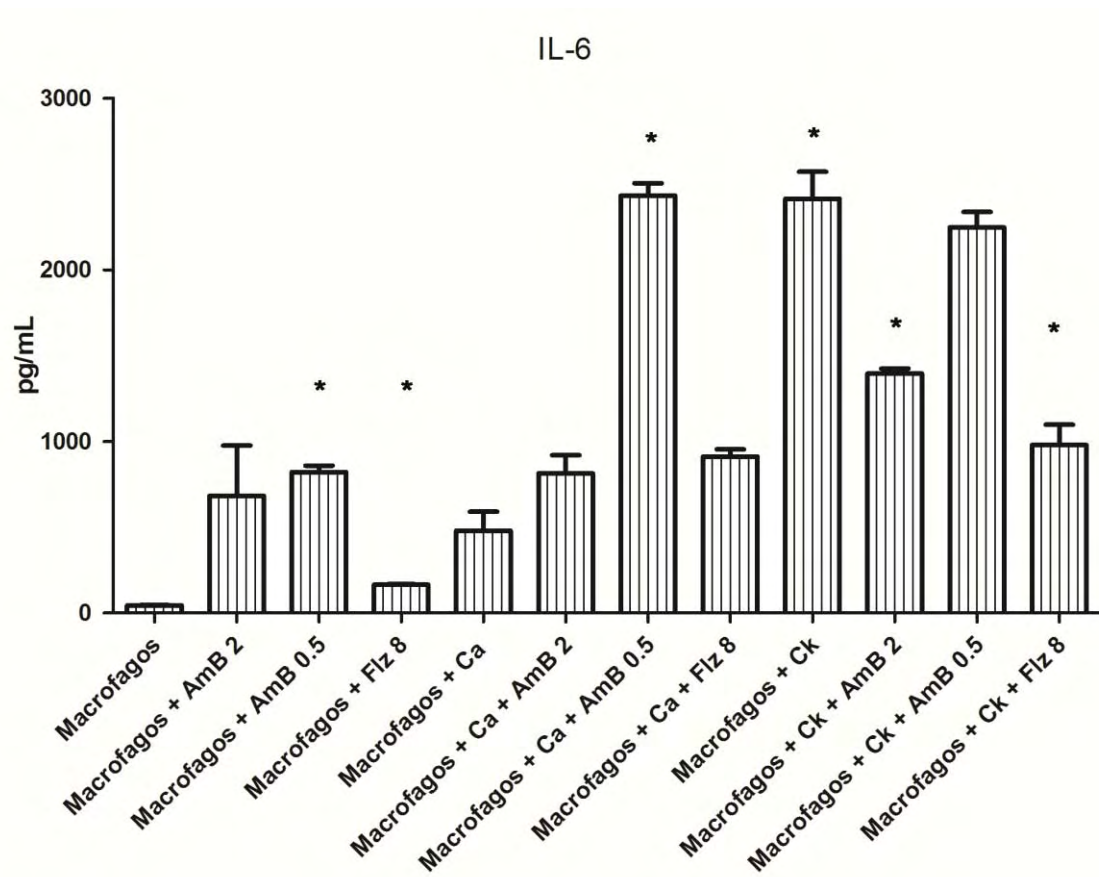


Figura 26: Valores de IL-6 (pg/mL) produzidas por macrófagos primários infectados com *C. albicans* ou *C. krusei* e tratados com fluconazol 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ou anfotericina B 0,5 e 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , (\*  $p < 0,05$ ).

Em relação a IL-10 houve o aumento de 25, 20 e 3 vezes com os tratamentos com anfotericina 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e fluconazol 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  respectivamente (figura 27). Houve o aumento de quatro vezes com a infecção

por *C. albicans* e o tratamento antifúngico gerou o aumento na liberação dessa citocina em 24, 10, 3 vezes em relação aos macrófagos infectados e não tratados. Mais uma vez o aumento desta citocina com a infecção por *C. krusei* foi alto, 51 vezes.

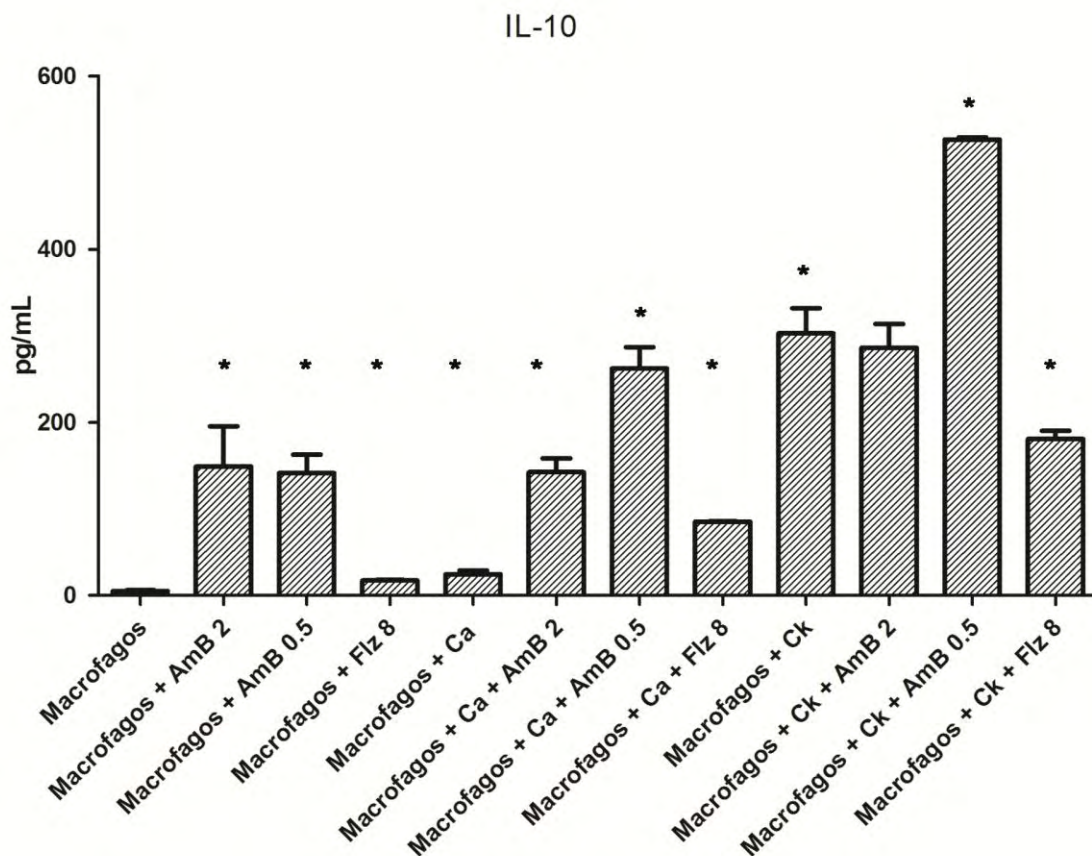


Figura 27: Valores de IL-10 (pg/mL) produzidas por macrófagos primários infectados com *C. albicans* ou *C. krusei* e tratados com fluconazol 8  $\mu\text{g/mL}$  ou anfotericina B 0,5 e 2  $\mu\text{g/mL}$ , (\*  $p < 0,05$ ).

A última citocina analisada foi IL-17 a qual sofreu menor alteração com os tratamentos (figura 28). *Candida albicans* causou o aumento em 4,5 vezes na liberação de IL-17 e os tratamentos com anfotericina 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dos macrófagos infectados com *C. albicans* 3 vezes. Curiosamente *C. krusei* aumentou a liberação de IL-17 em 23 vezes, entretanto todos os tratamentos causaram a diminuição na liberação dessa citocina.

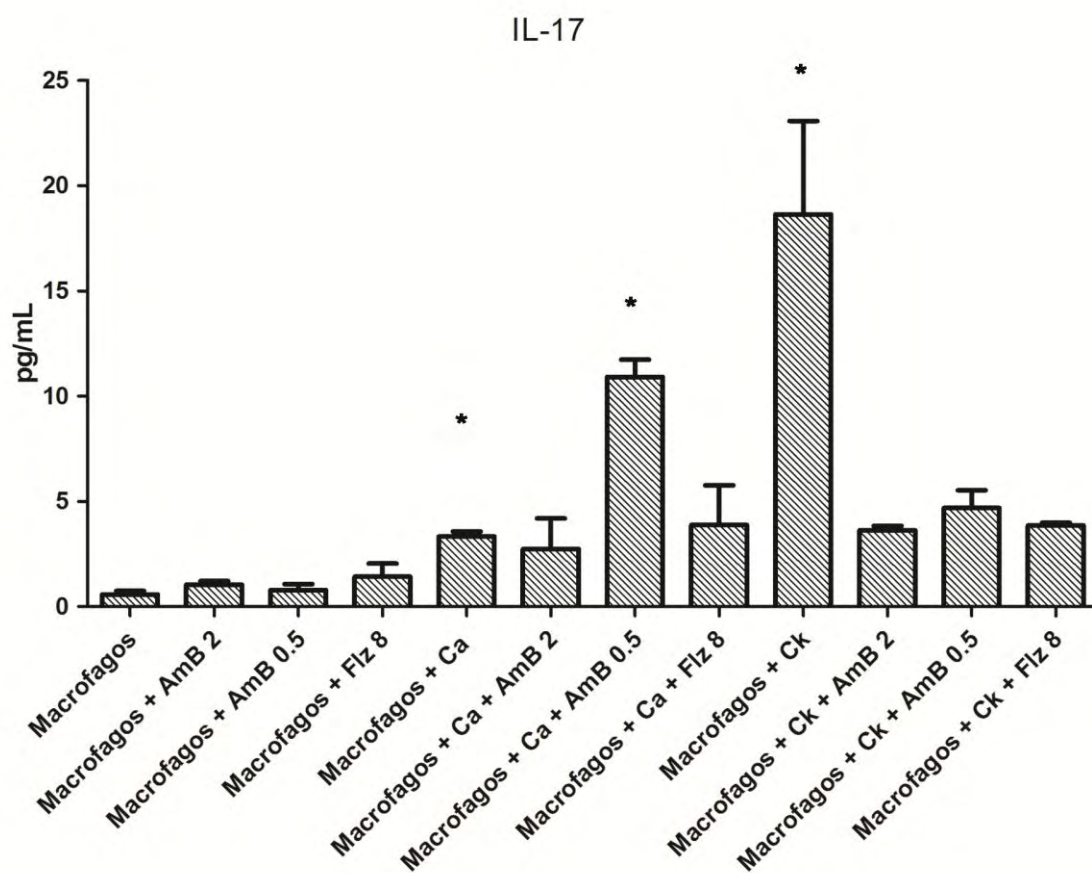


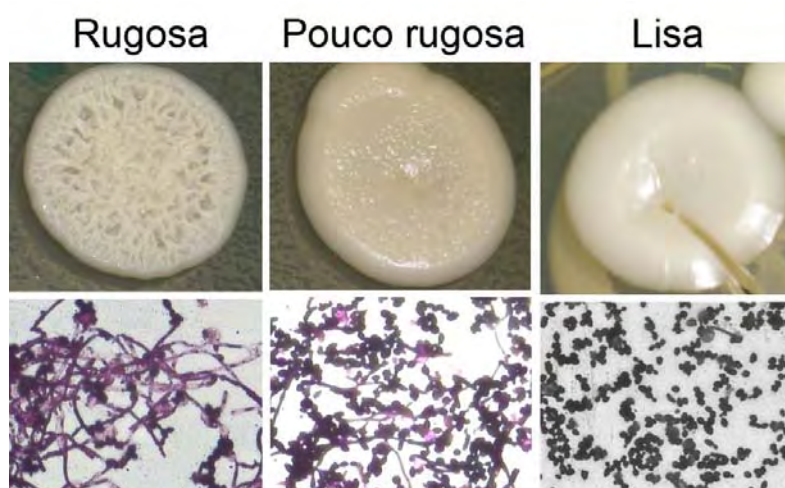
Figura 28: Valores de IL-17 (pg/mL) produzidas por macrófagos primários infectados com *C. albicans* ou *C. krusei* e tratados com fluconazol 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ou anfotericina B 0,5 e 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , (\*  $p < 0,05$ ).

#### 4.0. Transformação genética de *C. albicans* e *C. krusei* mediada por *A. tumefaciens*

A técnica de agrotransformação proposta nesse estudo foi aplicada com sucesso para *C. albicans* gerando até o momento 200 mutantes. Devido ao emprego do marcador de resistência higromicina B, presente no vetor pPZP-HYG foi necessária a realização do teste de sensibilidade para essa droga com o objetivo de posteriormente usá-la para a seleção dos mutantes. De acordo com a técnica de microdiluição, a CIM foi 200  $\mu\text{g/mL}$ , entretanto foi utilizada a concentração de 250  $\mu\text{g/mL}$  como critério de segurança. Foram selecionados aleatoriamente 14 mutantes para a realização de diferentes ensaios buscando diferentes características fenotípicas. A transformação genética por agrotransformação não foi eficaz para *C. krusei*, pois gerava número de mutantes muito baixos e instáveis pois após vários cultivos perdiam a resistência à marca de seleção, indicando que possivelmente a inserção não foi estável.

#### 4.1. Morfologia macroscópica e microscópica dos transformantes de *C. albicans*

Foram observados três diferentes tipos de morfologia macroscópica dos transformantes e estas foram classificadas como rugosa, pouco rugosa e lisa. A partir dessas culturas foi realizada a coloração de Gram (Figura 29).



**Figura 29:** Características macroscópicas e microscópicas (coloração de Gram) de transformantes de *C. albicans*.

Os transformantes de *C. albicans* com características de rugosa foram: 7A, 8A, 9A, 3B, 7B, 8B, 1C, 2C, 10C, as pouco rugosas: 4B, 11B, 8C, 3C e apenas a amostra 9B apresentou morfologia macroscópica com aspecto de colônia lisa.

#### 4.2. Avaliação da capacidade de produção e quantificação de biofilme *in vitro* das cepas transformantes de *C. albicans*

Os biofilmes foram formados em placas de 96 poços durante um período de 24 h, após esse período a quantificação foi realizada pela técnica do XTT. A tabela 2 apresenta a avaliação da produção de biofilme das 20 amostras transformantes de *C. albicans*, foi considerado que a cepa de *C. albicans* ATCC 90028 correspondia a 100% de produção de biofilme. Foi observada a diminuição significativa da capacidade de formação de biofilme para as cepas 8A, 7B, 3B, 8B, 11B, 2C (Tabela 2).

Tabela 2: Capacidade de formação de biofilme dos transformantes de *C. albicans* pelo ensaio do XTT.

Cepa	Formação de biofilme XTT (%)
7B	40,5
2C	49,0
8A	50,0
11B	61,4
8B	68,8
3B	71,4
9B	80,0
8C	81,6
10C	82,8
4B	85,7
9A	85,7
3C	85,7
7A	88,6
1C	91,0
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	100



### **4.3. Avaliação da atividade de fosfolipases, proteinase e hemolisina**

Todos os transformantes testados apresentaram atividade de proteinase com valores de PZ variando de 0,4 a 0,83. A maioria dos transformantes apresentou fenótipo positivo para proteinase, fenótipo observado também para *C. albicans* ATCC 90028, entretanto os transformantes 4B e 11B apresentaram proteinase fortemente ativa. Todos os transformantes testados apresentaram atividade de hemolisina com valores de PZ variando de 0,4 a 0,9, porém os transformantes 3C e 11B apresentaram hemolisina fortemente ativa, esse fenótipo foi diferente ao observado pelo controle *C. albicans* ATCC 90028 (Positiva). No ensaio de fosfolipase, todos os transformantes apresentaram fosfolipase positiva, resultado igualmente encontrado para *C. albicans* 90028.

### **4.4. Avaliação da sensibilidade a diferentes antifúngicos**

A sensibilidade dos transformantes foi avaliada para as drogas fluconazol, anfotericina B e caspofungina, pelo micrométodo segundo documento M-27A2 (CLSI, 2002). As CIMs encontradas para os transformantes para todas as drogas testadas foram semelhantes às de *C. albicans* ATCC 90028.

### **4.5. Ensaio de adesão e invasão**

A avaliação da adesão em linhagem celular de queratinócitos NOK resultou em uma variação de 1 a 85% na porcentagem de adesão entre os transformantes. Foram avaliados 14 transformantes e 86% destes apresentaram aumento de adesão (figura 29). *C. albicans* ATCC 90028 apresentou adesão de 12%. Os transformantes 8C, 9B, 8A foram os que apresentaram os mais altos índices de adesão: 7; 5,6 e 5,2 vezes maior que a cepa *C. albicans* ATCC 90028, respectivamente e as com menor índice de adesão foram 9A e 4B.

O transformante 11B foi o que apresentou o maior índice de invasão com valor quase duas vezes maior que a invasão encontrada em *C. albicans* ATCC 90028. Os transformantes 9A, 4B, 8B, 3C e 8C apresentaram os índices mais baixos de invasão (figura 30). A cepa 8C apresentou alto valor de adesão e baixo de invasão.

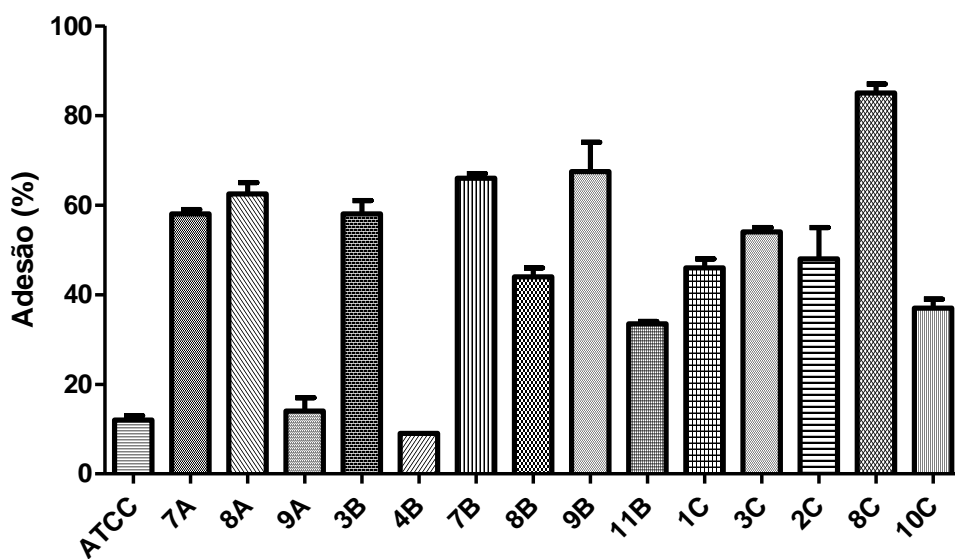


Figura 30: Teste de adesão realizado pelo ensaio de contagem de unidades formadoras de colônias dos transformantes de *C. albicans* realizado em linhagem de queratinócitos NOK.

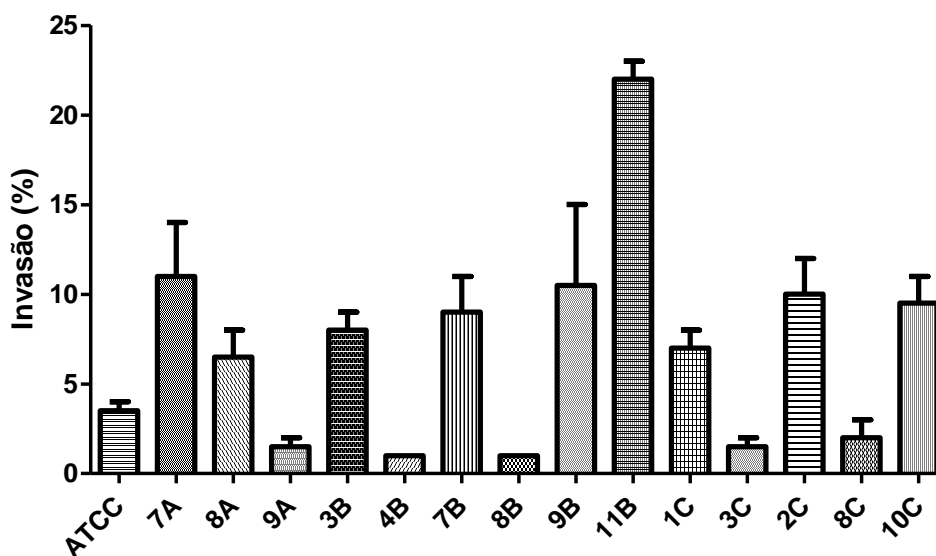


Figura 31: Teste de invasão realizado pelo ensaio de contagem de unidades formadoras de colônias dos transformantes de *C. albicans* realizado em linhagem de queratinócitos NOK.



#### **4.6. Análise molecular dos transformantes**

Foi realizado sequenciamento do DNA da amostra 1C, a que apresentou maior capacidade de formação de biofilme em relação ao controle, com o objetivo de localizar o local de inserção do T-DNA provido da agrotransformação. O gene afetado pela agrotransformação codifica a proteína hipotética CaO19.12730 (e-value 1e-87), a qual é uma proteína motora da classe das kinesinas similar a SMY1 em *S. cerevisiae*.

## DISCUSSÃO

Grande parte da pesquisa realizada em fungos não apresenta uma visão multidisciplinar por isso, parte dos mecanismos de interação fungo-hospedeiro não é bem elucidada, assim, para a melhor compreensão dessa interação tornam-se necessários estudos *in vivo*. Por questões éticas, custo e novas exigências de proteção o uso de animais de experimentação está cada vez, mais restrito gerando a necessidade de padronização de modelos animais alternativos, os quais possam ser usados em *screening* e complementar os estudos realizados em mamíferos (Mylonakis, Casadevall *et al.*, 2007)

Entre os modelos alternativos para estudo dos fungos estão as amebas, (*Acanthamoeba castellanii* e *Dictyostellium discoideum*) as quais são uteis para estudos de fagocitose e avaliação de formação de hifas, os nematodes (*Caenorhabditis elegans*), que além de ter o genoma conhecido permitindo o uso de diferentes mutantes, pode ser usado para testes de toxicidade e avaliação de novas drogas. Insetos como *Drosophila melanogaster* possibilita o uso de ferramentas genéticas como microarranjo e RNA de interferência. Por outro lado, *Galleria mellonella* viabiliza estudos de fagocitose, formação de hifas e avaliação de novos compostos (Fuchs e Mylonakis, 2006; Desalermos, Fuchs *et al.*, 2012). O modelo embriões de galinha mostrou-se adequado para o estudo da patogenicidade de *C. albicans* e assim como de mutantes de *C. albicans* com resultados comparáveis aos de modelo murino (Jacobsen, Grosse *et al.*, 2012). Zebrafish (*Danio rerio*) também possui o genoma completamente sequenciado (Vascotto, Beckham *et al.*, 1997), e semelhanças genéticas e fisiológicas com os mamíferos, sendo útil na descoberta de medicamentos. Em adição, técnicas para a geração de linhagens transgênicas, mutação alvo, e transferência nuclear tornaram o modelo Zebrafish ainda mais útil para os pesquisadores (Parng, Seng *et al.*, 2002).

Durante a evolução, os animais invertebrados desenvolveram sistema imunológico contra patógenos e por isso existe grande similaridade funcional e estrutural entre os sistemas imunológicos de mamíferos e insetos sendo esse mais um motivo que apoia o uso desses modelos (Fuchs e Mylonakis, 2006).

Nesse estudo foram usadas larvas de *G. mellonella* e *C. elegans* para avaliar a virulência de *C. krusei* bem como comprovar a resistência *in vitro* dessa levedura ao fluconazol. *Galleria mellonella* é de fácil manipulação, baixo custo, permite a inoculação de quantidades exatas do microrganismo e dos antifúngicos para tratamento e além de tudo permite estudos a temperaturas de 25 a 37 °C. Além disso, permite avaliar parâmetros fisiológicos como quantidade de células hemocíticas, fagocitose e filamentação *in vivo* (Jacobsen, Grosse *et al.*, 2012).

O estudo da virulência de diferentes fungos tem sido realizado em *G. mellonella* com sucesso. Em *C. neoformans* o fenótipo de aumento capsular também conhecido por células gigantes, encontrado quando essa levedura infecta mamíferos, também foi observado em *G. mellonella* (García-Rodas, Casadevall *et al.*, 2011). Cepas clínicas e ambientais de *Fusarium* spp produzem a morte de *G. mellonella*, além disso, os macroconídeos são mais virulentos que os microconídeos (Coleman, Muhammed *et al.*, 2011).

A versatilidade do conhecimento genômico possibilita entender campos ainda não bem elucidados como a imunologia das infecções fúngicas sendo essa uma das principais vantagens do modelo *C. elegans* (Pukkila-Worley, Ausubel *et al.*, 2011). Estudos anteriores mostram que *C. elegans* é suscetível a infecções por diferentes espécies de *Candida* e esse modelo é útil para a realização de testes *in vivo* para o desenvolvimento de novos compostos antifúngicos (Breger, Fuchs *et al.*, 2007; Okoli, Coleman *et al.*, 2009).

Estudos anteriores mostraram que *G. mellonella* infectada com  $2 \times 10^6$  ufc/larva de *C. krusei* é capaz de matar 20% das larvas em 72 horas (Cotter, Doyle *et al.*, 2000). Em nossos estudos realizou-se curvas de sobrevivência com diferentes concentrações fúngicas de *C. krusei*. Como resultado observou-se que a morte de *G. mellonella* é dependente da concentração fúngica aplicada. A concentração selecionada para os experimentos posteriores foi  $5 \times 10^6$  ufc/larva porque com essa dose é possível verificar que a morte foi progressiva, não ocorrendo no primeiro dia de experimento, esse parâmetro é importante para a avaliação do tratamento antifúngico. Entretanto quando se

compara a curva de sobrevivência de *C. krusei* com a de *C. albicans*, *C. krusei* é menos virulenta, pois a quantidade de leveduras suficientes para causar 100% de morte no quarto dia é 10 vezes maior. A concentração de leveduras também é mais alta do que as descritas para matar *C. neoformans*,  $1 \times 10^6$  ufc/larva (Fuchs, O'Brien *et al.*, 2010). Alguns microorganismos não são capazes de causar infecção em *G. mellonella*, como é o caso de *Pneumocystis murina* (Fuchs, Bishop *et al.*, 2011).

A possibilidade de estudar a virulência em intervalos de temperatura entre 25 a 37°C é uma vantagem do modelo *G. mellonella*. *C. neoformans* apresentou maior virulência neste quando incubados a 37°C do que a 30°C (Mylonakis, Moreno *et al.*, 2005; García-Rodas, Casadevall *et al.*, 2011). Além disso *Fusarium spp* e *Acinetobacter baumannii* também tiveram sua virulência em *G. mellonella* alterada devido à temperatura (Coleman, Muhammed *et al.*, 2011; Fuchs, Bishop *et al.*, 2011). Para verificar a influência da temperatura na virulência de *C. krusei* as larvas foram infectadas e incubadas a 30°C e a 37°C, entretanto não foram observadas diferenças estatísticas quanto à mortalidade nas diferentes temperaturas. Para avaliar se esse é um comportamento padrão da espécie *krusei* o mesmo experimento foi realizado com duas cepas clínicas CL8053 e CL80317 e mais uma vez a temperatura não influenciou na mortalidade das larvas. Entretanto *C. albicans* tem sua virulência aumentada quando as larvas são incubadas a 37°C. Resultados semelhantes foram encontrados por Fuchs *et al.* (2010). Esses resultados foram comprovados pela realização da curva de crescimento a 30°C e a 37°C; o crescimento de *C. krusei* foi afetado pela temperatura (tempo de geração 0,85 vezes menor quando as células foram crescidas a 37°C comparadas com 30°C), no entanto, *C. albicans* tem seu tempo de geração diminuído em 2 vezes quando crescidas a 37°C comparadas com 30°C, esses resultados apoiam os dados obtidos em *G. mellonella*.

*G. mellonella* possui em suas cavidades a hemolinfa com funções semelhantes à encontradas no sangue nos mamíferos, a qual é composta de seis tipos diferentes de células, entre estas com capacidade fagocítica, plasmócito e granulócitos, os quais também participam dos processos de

formação de nódulos (as células do inseto se agregam para capturar a levedura) e encapsulação (defesa multicelular são observadas camadas sobrepostas em torno da levedura), sendo esta associada ao processo de melanização (Vilmos e Kurucz, 1998). Além disso, possuem lecitinas, lisozimas, carboidrases, serino proteases e produz melanina através da cascata da fenoloxidase e apesar de não produzir anticorpos sintetiza substâncias que auxiliam na resposta imunológica (Tojo, Naganuma *et al.*, 2000; Brennan, Thomas *et al.*, 2002).

A fagocitose também ajuda na eliminação dos patógenos em *G. mellonella*. Segundo García – Rodas (2011) larvas infectadas com *C. neoformans* apresenta alto percentual de fagocitose, entretanto aparentemente as altas taxas de fagocitose não parecem influenciar no sucesso da eliminação da infecção. Nesse estudo foi avaliado o percentual de fagocitose quando as larvas estão infectadas com *C. krusei* ATCC e cepas clínicas e verificou-se que esse percentual é baixo, variando entre 2,5 e 6%, Comportamento semelhante foi observado com o percentual de fagocitose de *C. albicans*. *C. neoformans* foi usado como controle e o percentual de fagocitose está próximo aos encontrados na literatura. Durante esse experimento não foram observadas leveduras na hemolinfa, isso sugere que *Candida* spp tenha afinidade pelos tecidos da larva migrando rapidamente.

Nesta etapa do trabalho avaliou-se a concentração hemocitária de larvas infectadas com *C. krusei*, com as das cepas clínicas de *C. krusei* e com *C. albicans*. Os resultados mostram que houve diminuição da densidade hemocitária de 3,4 vezes quando as larvas foram infectadas com *C. albicans* ou *C. krusei* em relação ao controle (PBS). Também utilizamos como controle larvas infectadas com *C. neoformans* devido ao conhecido perfil de alta densidade hemocitária após a infecção, os quais não apresentaram diminuição em relação ao controle. Nossos estudos corroboram os dados da literatura pois por estarem envolvidos na resposta celular, a quantidade de hemócitos pode variar durante a infecção. A baixa sobrevivência está relacionada com baixa densidade hemocitária, em outras palavras microorganismos mais virulentos causam a diminuição do número de células na hemolinfa, isso foi

demonstrado em um estudo no qual foi comparada a sobrevivência com a concentração hemocitária de espécies de levedura com distinta virulência. *C. albicans* foi a espécie que causava menor sobrevivência e apresentava baixa concentração de células na hemolinfa, por outro lado as larvas infectadas com *Sacharomyces cerevisiae* apresentaram maior sobrevivência e concentração hemocitária, portanto o percentual de células hemocíticas pode ser usado como parâmetro indicativo de virulência (Bergin, Brennan *et al.*, 2003). Durante a avaliação da eficácia do composto [Ag<sub>2</sub>(mal)(phen<sub>3</sub>)] observou-se que este influenciou na sobrevivência de larvas infectadas com *C. albicans*, aumentando também a concentração hemocitária (Rowan, Moran *et al.*, 2009). *C. neoformans* produz aumento do número de hemócitos nas duas primeiras horas pós-infecção, entretanto a concentração diminui com o passar dos dias (Mylonakis, Ausubel *et al.*, 2002; García-Rodas, Casadevall *et al.*, 2011).

A melanização é uma resposta humoral manifestada no inseto que resulta em um pigmento negro denominado melanina cuja enzima catalizadora é a fenoloxidase. Essa reação é observada durante a infecção quando existe contato com o microorganismo, lise celular e durante o processo de encapsulação rodeando o invasor (Bidla, Hauling *et al.*, 2009). Durante a infecção das larvas com *C. krusei* foi observada rápida melanização com pouco tempo de infecção embora ainda estivessem vivas, observou-se que a intensidade do processo depende da concentração de inóculo, entretanto em todas as concentrações testadas foi observada melanização. A fim de saber se a melanização é devido à patogenicidade da levedura ou apenas por causa da presença de exógeno, *G. mellonella* foram infectados com *C. krusei* morta com 4% de paraformaldeído. Observou-se novamente melanização, entretanto a sobrevivência foi similar a das larvas infectadas com PBS. As larvas infectadas com *C. albicans* também se apresentaram melanizadas e assim como em *C. krusei*, a intensidade do processo depende da concentração de inóculo. Isso sugere que o processo pode estar relacionado com a espécie, já que em *C. neoformans* essa reação não foi observada (Fuchs, O'Brien *et al.*, 2010). Em *A. fumigatus*, mutantes da cascata de produção de melanina que apresentavam cor causavam maior intensidade de melanização na larva e presença da

melanina está associada à exacerbação da resposta imune e diminuição da (Jackson, Higgins *et al.*, 2009). Isso está de acordo com os resultados obtidos com o tratamento de fluconazol e anfotericina B os quais diminuíram a melanização das larvas com 24 horas de tratamento.

O modelo de *G. mellonella* tem demonstrado ser útil na avaliação da eficácia de antifúngicos. Em *C. neoformans* foram avaliados os tratamentos com anfotericina B e fluconazol (Mylonakis, Moreno *et al.*, 2005). O pré-tratamento e tratamento com caspofungina para larvas infectadas com *C. albicans* apresentou sucesso aumentando a sua sobrevivência (Kelly e Kavanagh, 2011). O tratamento de *Fusarium* spp com anfotericina B também foi eficaz nesse modelo animal não convencional (Coleman, Muhammed *et al.*, 2011).

Em nosso estudo utilizou-se dois modelos não convencionais, *G. mellonella* e *C. elegans* para realizar a correlação *in vivo* - *in vitro* do perfil de sensibilidade de *C. albicans* e *C. krusei*. Foi realizado tratamento com fluconazol de larvas de *G. mellonella* infectadas com *C. krusei* nas concentrações de 4, 12, 32, 64, 128 mg/kg entretanto o tratamento não foi eficaz mesmo na concentração, 10 vezes maior do que a dose terapêutica 12 mg/kg, (Pappas, Kauffman, Andes, Benjamin, Calandra, Edwards, Filler, Fisher, Kullberg, Ostrosky-Zeichner, Reboli, Rex, Walsh, Sobel *et al.*, 2009). Entretanto, com anfotericina B 4 µg/mL ou caspofungina 4 µg/mL houve aumento na sobrevivência de 60% e 80%, respectivamente, no quarto dia do experimento. Realizamos os mesmos tratamentos com *C. albicans*, que é sensível ao fluconazol, além de apresentar valores mais baixos de concentração inibitória mínima a anfotericina B e a caspofungina. O tratamento com fluconazol foi eficaz mesmo na dose terapêutica, além disso, o tratamento com anfotericina B 2 µg/mL e caspofungina 2 µg/mL aumentou a sobrevivência de 50% e 80% das larvas no quarto dia de experimento. Visando alternativas de tratamento usaram-se ainda as combinações anfotericina B 1 mg/kg + fluconazol 4 mg/kg; anfotericina B 1 mg/kg + fluconazol 12 mg/kg; entretanto essas combinações não foram efetivas para o tratamento de *C. krusei*.

*Caenorhabditis elegans* também tem apresentado sucesso como modelo para testes de eficácia antifúngica contra vários fungos patogênicos, incluindo *Candida* spp e *Fusarium* spp (Breger, Fuchs *et al.*, 2007; Muhammed, Coleman *et al.*, 2012). Nesse estudo os resultados encontrados em *G. mellonella* foram muito semelhantes com os encontrados em *C. elegans*. Apesar das diferenças na resposta imune entre nematóides e insetos, *C. krusei* e *C. albicans* apresentaram virulência similar em ambos os hospedeiros. Estes resultados apoiam fortemente a utilização dos dois modelos para testes *in vivo* para estudo de virulência e eficácia a antifúngicos. No modelo de *C. elegans*, *C. albicans* e *C. krusei* apresentaram a mesma virulência. O que pode explicar a diferença entre o comportamento das diferentes espécies de leveduras em *G. melonella* e *C. elegans* é a temperatura na qual os testes de virulência são realizados, que para *C. elegans* é 25°C. Esses achados são relevantes, porque indicam que a virulência em mamíferos nem sempre se correlaciona com a virulência em temperaturas ambientais.

Ao ser infectado por um fungo se iniciam então eventos da resposta imune inata visando à eliminação do patógeno, como fagocitose, liberação de citocinas inflamatórias, degranulação de células fagocíticas, produção de espécies reativas de oxigênio (Ben-Ami, Lewis *et al.*, 2008; Ramage, Mowat *et al.*, 2009; Romani, 2011). Não sendo suficiente para a eliminação do invasor entra em ação a resposta imune adaptativa com a apresentação de antígenos para a produção de anticorpos Nessa etapa são liberadas citocinas inflamatórias via receptor Th1 -TNF- $\alpha$ , IFN-gama, IL-1,IL-6 e IL-12 e citocinas anti-inflamatórias via receptor Th2 - IL-10, IL-4, IL-5 (Romani 2011).

Recentemente, além do mecanismo de ação fungicida ou inibitória dos antifúngicos, a atenção de muitas pesquisas está no efeito indireto que essas substâncias causam no organismo (Ben-Ami *et al.*, 2008).

O padrão de liberação de citocinas para macrófagos primários infectados com *C. albicans* ou *C. krusei* foi diferente. Para todas as citocinas detectadas a presença de *C. krusei* causou maior indução do que de *C. albicans*. A diferente liberação de citocinas por *C. albicans* e *C. krusei* foi descrita também quando



monócitos foram estimulados com as duas leveduras, observou-se grande liberação de IL-10, IL-1-b, TNF- $\alpha$ , entretanto a liberação de IL-12 em altas concentrações foi dada apenas por *C. krusei* (Xiong, Kang *et al.*, 2000). Comparando o perfil de citocinas encontrados ao infectar macrófagos RAW 264.7 e macrófagos primários com *C. krusei* observou-se a liberação de TNF- $\alpha$  e IL-6 foi maior nos macrófagos primários (García-Rodas, González-Camacho *et al.*, 2011). Estudos recentes mostram que o fragmento C5a do sistema complemento é responsável pela liberação das citocinas inflamatórias IL-6 and IL-1 $\beta$ . O padrão de citocinas liberadas em modelos de camundongos imunocompetentes infectados com *C. albicans* e *C. glabrata* mostrou diferença entre os dois perfis de liberação de citocinas, *C. glabrata* (TNF- $\alpha$ , IL-12, IFN-gamma) entretanto *C. albicans* apresentou baixa indução de TNF- $\alpha$ , IL-12, IFN- $\gamma$  e alta de IL-10. Ensaio *in vivo* com camundongos com tumor o sucesso da eliminação da infecção está associado a alta liberação de IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  e baixa liberação de IL-10 (Camargo, Venturini *et al.*, 2009). A resposta Th17 (IL-17) é dada por uma linhagem diferente de células das Th1 e Th2 (Harrington, Hatton *et al.*, 2005), sua liberação é localizada em tecidos mucosos com papel de conter e impedir a disseminação da infecção (Liu 2009). O entendimento da imunologia das infecções fúngicas gera a possibilidade de desenvolvimento de novas técnicas diagnósticas assim como o desenvolvimento da terapêutica contra essas enfermidades.

Nesse estudo ainda utilizamos a técnica de agrotransformação com o objetivo de melhor estudar e caracterizar os mecanismos de virulência de *Candida* spp. Essa técnica foi utilizada com sucesso para a produção de transformantes de *Trichoderma reesei* (Zhong, Wang *et al.*, 2007), *Penicillium marneffeii* (Kummasook, Cooper *et al.*, 2010) *Paracoccidioides brasiliensis* (Leal, Montes *et al.*, 2004). *C. neoformans* e *C. gattii* (McClelland, Chang *et al.*, 2005). A técnica de agrotransformação foi eficiente para a produção de transformantes de *C. albicans*, entretanto os mutantes de *C. krusei* gerados eram em numero pequeno e, além disso, instáveis, perdendo a inserção provinda da bactéria após sucessivos cultivos.

Entre os mutantes de *C. albicans* foram selecionados 15 de maneira aleatória, para estudos fenotípicos de morfologia macroscópica e microscópica, produção de biofilme avaliação da atividade de fosfolipases, proteinase e hemolisina e testes de adesão e invasão. Diferentes fenótipos foram observados entre os mutantes para os testes selecionados. O transformante 1 C teve o local de inserção do T-DNA provido da agrotransformação identificado, e o gene afetado codifica a proteína hipotética CaO19.12730 (e-value 1e-87), a qual é uma proteína motora da classe das kinesinas similar a SMY1 em *S. cerevisiae*, sendo capaz de suprir a atividade da miosina Myo2p em cepas de *S. cerevisiae* mutantes desse gene, realizando esse papel sem depender de microtúbulos (Lillie e Brown, 1998). Além disso, faz parte de um mecanismo de realimentação negativo que detecta comprimento de filamentos de actina e impede o crescimento excessivo (Chesarone-Cataldo, Guérin *et al.*, 2011). Estudos futuros serão realizados com o objetivo de verificar a implicação que a mutação de smy1 tem no crescimento, formação e liberação dos brotos assim como a virulência nos modelos não convencionais aqui descritos.

Nesse estudo mostramos uma nova abordagem para avaliação da virulência de leveduras do gênero *Candida* assim como para avaliar antifúngicos, e novas moléculas com atividade antifúngica por meio dos modelos de *G. mellonella* e *C. elegans* os quais mostraram boa correlação com os dados encontrados *in vitro*. A interação fungo-sistema imunológico-droga é uma área com grande potencial para entendimento da imunofarmacologia bem como desenvolvimento de novas técnicas diagnósticas e terapêuticas.

## CONCLUSÃO

- Os modelos não convencionais como *G mellonella* e *C. elegans* são uma alternativa importante para estudos *in vivo* sendo viáveis para identificação de compostos antifúngicos para espécies resistentes como *C. krusei*.

- A melhor compreensão da imunofarmacologia das drogas antifúngicas é uma importante ferramenta para a melhoria na terapêutica e diagnóstico de micoses sistêmicas.

- A técnica de agrotransformação mostrou-se eficiente para a produção de transformantes de *C. albicans*, gerando mutante de uma proteína motora da classe das kinesinas similar a SMY1 em *S. cerevisiae*, o qual será posteriormente avaliada quanto à virulência nos modelos descritos nesse trabalho. Entretanto, a técnica de agro transformação não foi eficiente para *C. krusei*, por esse fato outras técnicas foram empregadas para caracterizar sua virulência e interação fungo-hospedeiro-antifúngico.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, J. et al. *Candida krusei* fungemia. An escalating serious infection in immunocompromised patients. **Arch Intern Med**, v. 160, n. 17, p. 2659-64, Sep 25 2000. ISSN 0003-9926. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10999981](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10999981) >.

AMEY, R. C. et al. Investigating the role of a *Verticillium fungicola* beta-1,6-glucanase during infection of *Agaricus bisporus* using targeted gene disruption. **Fungal Genet Biol**, v. 39, n. 3, p. 264-75, Aug 2003. ISSN 1087-1845. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12892639](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12892639) >.

ARORA, T. et al. Substitute of Animals in Drug Research: An Approach Towards Fulfillment of 4R's. **Indian J Pharm Sci**, v. 73, n. 1, p. 1-6, Jan 2011. ISSN 1998-3743. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=22131615](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22131615) >.

BEN-AMI, R.; LEWIS, R. E.; KONTOYIANNIS, D. P. Immunocompromised hosts: immunopharmacology of modern antifungals. **Clin Infect Dis**, v. 47, n. 2, p. 226-35, Jul 15 2008. ISSN 1537-6591. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18540822](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18540822) >.

BERGIN, D.; BRENNAN, M.; KAVANAGH, K. Fluctuations in haemocyte density and microbial load may be used as indicators of fungal pathogenicity in larvae of *Galleria mellonella*. **Microbes Infect**, v. 5, n. 15, p. 1389-95, Dec 2003. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14670452> >.

BEVAN, M.; BARNES, W. M.; CHILTON, M. D. Structure and transcription of the nopaline synthase gene region of T-DNA. **Nucleic Acids Res**, v. 11, n. 2, p. 369-85, Jan 25 1983. ISSN 0305-1048. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=6298724](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6298724) >.

BIDLA, G. et al. Activation of insect phenoloxidase after injury: endogenous versus foreign elicitors. **J Innate Immun**, v. 1, n. 4, p. 301-8, 2009. ISSN 1662-8128. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20375588> >.

BLUM, G. et al. Potential basis for amphotericin B resistance in *Aspergillus terreus*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, n. 4, p. 1553-5, Apr 2008. ISSN 0066-4804. Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18268082](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18268082) >.

BONFIETTI, L. X. et al. Prevalence, distribution and antifungal susceptibility profiles of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* bloodstream isolates. **J Med Microbiol**, v. 61, n. Pt 7, p. 1003-8, Jul 2012. ISSN 1473-5644. Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=22493277](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22493277) >.

BRAJTBURG, J. et al. Amphotericin B: current understanding of mechanisms of action. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 34, n. 2, p. 183-8, Feb 1990. ISSN 0066-4804. Disponível em:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2183713](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2183713) >.

BREGER, J. et al. Antifungal chemical compounds identified using a *C. elegans* pathogenicity assay. **PLoS Pathog**, v. 3, n. 2, p. e18, Feb 2007. ISSN 1553-7374. Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17274686](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17274686) >.

BRENNAN, M. et al. Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 34, n. 2, p. 153-7, Oct 2002. ISSN 0928-8244. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12381467> >.

BUNDOCK, P. et al. Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. **EMBO J**, v. 14, n. 13, p. 3206-14, Jul 1995. ISSN 0261-4189. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7621833> >.

CAMARGO, M. R. et al. Modulation of macrophage cytokine profiles during solid tumor progression: susceptibility to *Candida albicans* infection. **BMC Infect Dis**, v. 9, p. 98, 2009. ISSN 1471-2334. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19534779> >.

CHEN, S. C.; SLAVIN, M. A.; SORRELL, T. C. Echinocandin antifungal drugs in fungal infections: a comparison. **Drugs**, v. 71, n. 1, p. 11-41, Jan 1 2011. ISSN 0012-6667. Disponível em: <

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=21175238](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21175238) >.

CHESARONE-CATALDO, M. et al. The myosin passenger protein Smy1 controls actin cable structure and dynamics by acting as a formin damper. **Dev Cell**, v. 21, n. 2, p. 217-30, Aug 2011. ISSN 1878-1551. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21839918> >.

CHOW, J. K. et al. Risk factors for albicans and non-*albicans* candidemia in the intensive care unit. **Crit Care Med**, v. 36, n. 7, p. 1993-8, Jul 2008. ISSN 1530-0293 (Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18552702](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18552702) >.

CLSI. **Método de referência para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade a terapia antifúngica das leveduras** 2002.

COLEMAN, J. J. et al. Fusarium pathogenesis investigated using *Galleria mellonella* as a heterologous host. **Fungal Biol**, v. 115, n. 12, p. 1279-89, Dec 2011. ISSN 1878-6146. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22115447> >.

COLOMBO, A. L. et al. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **J Clin Microbiol**, v. 44, n. 8, p. 2816-23, Aug 2006. ISSN 0095-1137. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16891497](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16891497) >.

COTTER, G.; DOYLE, S.; KAVANAGH, K. Development of an insect model for the in vivo pathogenicity testing of yeasts. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 27, n. 2, p. 163-9, Feb 2000. ISSN 0928-8244. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10640612> >.

DE GROOT, M. J. et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. **Nat Biotechnol**, v. 16, n. 9, p. 839-42, Sep 1998. ISSN 1087-0156. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9743116](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9743116) >.

DENNING, D. W. Echinocandins: a new class of antifungal. **J Antimicrob Chemother**, v. 49, n. 6, p. 889-91, Jun 2002. ISSN 0305-7453. Disponível em: <

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12039879](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12039879) >.

DESALERMOS, A.; FUCHS, B. B.; MYLONAKIS, E. Selecting an invertebrate model host for the study of fungal pathogenesis. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 2, p. e1002451, Feb 2012. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22319439> >.

DRAGO, M.; SCALTRITO, M. M.; MORACE, G. In vitro activity of voriconazole and other antifungal agents against clinical isolates of *Candida glabrata* and *Candida krusei*. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 23, n. 8, p. 619-24, Aug 2004. ISSN 0934-9723. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15258831](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15258831) >.

ELLIS, D. Amphotericin B: spectrum and resistance. **J Antimicrob Chemother**, v. 49 Suppl 1, p. 7-10, Feb 2002. ISSN 0305-7453. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11801575](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11801575) >.

FINKELSTEIN, A.; HOLZ, R. Aqueous pores created in thin lipid membranes by the polyene antibiotics nystatin and amphotericin B. **Membranes**, v. 2, p. 377-408, 1973. ISSN 0076-6356 Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=4585230](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4585230) >.

FRANCA, J. C.; RIBEIRO, C. E.; QUEIROZ-TELLES, F. Candidemia in a Brazilian tertiary care hospital: incidence, frequency of different species, risk factors and antifungal susceptibility. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 41, n. 1, p. 23-8, Jan-Feb 2008. ISSN 0037-8682. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18368266](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18368266) >.

FUCHS, B. B. et al. *Galleria mellonella* are resistant to *Pneumocystis murina* infection. **Mycopathologia**, v. 171, n. 4, p. 273-7, Apr 2011. ISSN 1573-0832. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20922567> >.

FUCHS, B. B.; MYLONAKIS, E. Using non-mammalian hosts to study fungal virulence and host defense. **Curr Opin Microbiol**, v. 9, n. 4, p. 346-51, Aug 2006. ISSN 1369-5274. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16814595> >.

FUCHS, B. B. et al. Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. **Virulence**, v. 1, n. 6, p. 475-82, 2010 Nov-Dec 2010. ISSN 2150-5608. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21178491> >.

FUKUOKA, T. et al. Genetic basis for differential activities of fluconazole and voriconazole against *Candida krusei*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 47, n. 4, p. 1213-9, Apr 2003. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12654649> >.

GALLAGHER, L. A.; MANOIL, C. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 kills *Caenorhabditis elegans* by cyanide poisoning. **J Bacteriol**, v. 183, n. 21, p. 6207-14, Nov 2001. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11591663> >.

GARCÍA-RODAS, R. et al. *Cryptococcus neoformans* capsular enlargement and cellular gigantism during *Galleria mellonella* infection. **PLoS One**, v. 6, n. 9, p. e24485, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21915338> >.

GARCÍA-RODAS, R. et al. The interaction between *Candida krusei* and murine macrophages results in multiple outcomes, including intracellular survival and escape from killing. **Infect Immun**, v. 79, n. 6, p. 2136-44, Jun 2011. ISSN 1098-5522. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21422181> >.

GARSIN, D. A. et al. A simple model host for identifying Gram-positive virulence factors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 19, p. 10892-7, Sep 2001. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11535834> >.

GELVIN, S. B. Agrobacterium-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 67, n. 1, p. 16-37, table of contents, Mar 2003. ISSN 1092-2172. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12626681](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12626681) >.

GELVIN, S. B. Agrobacterium in the genomics age. **Plant Physiol**, v. 150, n. 4, p. 1665-76, Aug 2009. ISSN 0032-0889. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19439569](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19439569) >.

GRAVATO-NOBRE, M. J.; HODGKIN, J. *Caenorhabditis elegans* as a model for innate immunity to pathogens. **Cell Microbiol**, v. 7, n. 6, p. 741-51, Jun



2005. ISSN 1462-5814. Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15888078](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15888078)>.

HACHEM, R. et al. The changing epidemiology of invasive candidiasis: *Candida glabrata* and *Candida krusei* as the leading causes of candidemia in hematologic malignancy. **Cancer**, v. 112, n. 11, p. 2493-9, Jun 2008. ISSN 1097-0142. Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18412153](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18412153)>.

HAIDO, R. M.; BARRETO-BERGTER, E. Amphotericin B-induced damage of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Chem Biol Interact**, v. 71, n. 1, p. 91-103, 1989. ISSN 0009-2797. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2550153>>.

HAKKI, M.; STAAB, J. F.; MARR, K. A. Emergence of a *Candida krusei* isolate with reduced susceptibility to caspofungin during therapy. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 7, p. 2522-4, Jul 2006. ISSN 0066-4804. Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16801435](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16801435)>.

HARRINGTON, L. E. et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. **Nat Immunol**, v. 6, n. 11, p. 1123-32, Nov 2005. ISSN 1529-2908. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16200070>>.

HINRICHSEN, S. L. et al. Candidemia in a tertiary hospital in northeastern Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 41, n. 4, p. 394-8, Jul-Aug 2008. ISSN 1678-9849. Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18853014](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18853014)>.

HOLSTERS, M. et al. Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. **Mol Gen Genet**, v. 163, n. 2, p. 181-7, Jul 11 1978. ISSN 0026-8925. Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=355847](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=355847)>.

HOOYKAAS, P. J.; SCHILPEROORT, R. A. The molecular genetics of crown gall tumorigenesis. **Adv Genet**, v. 22, p. 209-83, 1984. ISSN 0065-2660. Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15633289](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15633289)>.

HORN, D. L. et al. Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. **Clin Infect Dis**, v. 48, n. 12, p. 1695-703, Jun 15 2009. ISSN 1537-6591. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19441981](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19441981) >.

HUBE, B. From commensal to pathogen: stage- and tissue-specific gene expression of *Candida albicans*. **Curr Opin Microbiol**, v. 7, n. 4, p. 336-41, Aug 2004. ISSN 1369-5274. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15288621](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15288621) >.

IDNURM, A. et al. *Cryptococcus neoformans* virulence gene discovery through insertional mutagenesis. **Eukaryot Cell**, v. 3, n. 2, p. 420-9, Apr 2004. ISSN 1535-9778. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15075272](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15075272) >.

JACKSON, J. C.; HIGGINS, L. A.; LIN, X. Conidiation color mutants of *Aspergillus fumigatus* are highly pathogenic to the heterologous insect host *Galleria mellonella*. **PLoS One**, v. 4, n. 1, p. e4224, 2009. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19156203> >.

JACOBSEN, I. D.; GROSSE, K.; HUBE, B. Embryonated chicken eggs as alternative infection model for pathogenic fungi. **Methods Mol Biol**, v. 845, p. 487-96, 2012. ISSN 1940-6029. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=22328397](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22328397) >.

KELLY, J.; KAVANAGH, K. Caspofungin primes the immune response of the larvae of *Galleria mellonella* and induces a non-specific antimicrobial response. **J Med Microbiol**, v. 60, n. Pt 2, p. 189-96, Feb 2011. ISSN 1473-5644. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20947665> >.

KULLBERG, B. J. et al. Voriconazole versus a regimen of amphotericin B followed by fluconazole for candidaemia in non-neutropenic patients: a randomised non-inferiority trial. **Lancet**, v. 366, n. 9495, p. 1435-42, Oct 22-28 2005. ISSN 1474-547X. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16243088](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16243088) >.

KUMMASOOK, A.; COOPER, C. R.; VANITTANAKOM, N. An improved Agrobacterium-mediated transformation system for the functional genetic

analysis of *Penicillium marneffei*. **Med Mycol**, v. 48, n. 8, p. 1066-74, Dec 2010. ISSN 1460-2709. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20465521> >.

KURZ, C. L.; EWBANK, J. J. *Caenorhabditis elegans* for the study of host-pathogen interactions. **Trends Microbiol**, v. 8, n. 3, p. 142-4, Mar 2000. ISSN 0966-842X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10707068> >.

LAI, C. C. et al. Association between incidence of candidaemia and consumption of antifungal agents at a medical centre in Taiwan. **Int J Antimicrob Agents**, Jul 20 2012. ISSN 1872-7913 Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=22819796](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22819796) >.

LEAL, C. V. et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med Mycol**, v. 42, n. 4, p. 391-5, Aug 2004. ISSN 1369-3786. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15473367> >.

LEE, K. et al. Mechanism of activation of *Agrobacterium* virulence genes: identification of phenol-binding proteins. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 89, n. 18, p. 8666-70, Sep 15 1992. ISSN 0027-8424. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1528878](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1528878) >.

LILLIE, S. H.; BROWN, S. S. Smy1p, a kinesin-related protein that does not require microtubules. **J Cell Biol**, v. 140, n. 4, p. 873-83, Feb 1998. ISSN 0021-9525. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9472039> >.

LUPETTI, A. et al. Molecular basis of resistance to azole antifungals. **Trends Mol Med**, v. 8, n. 2, p. 76-81, Feb 2002. ISSN 1471-4914. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11815273](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11815273) >.

MALLO, G. V. et al. Inducible antibacterial defense system in *C. elegans*. **Curr Biol**, v. 12, n. 14, p. 1209-14, Jul 23 2002. ISSN 0960-9822. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12176330](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12176330) >.

MCCLELLAND, C. M.; CHANG, Y. C.; KWON-CHUNG, K. J. High frequency transformation of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* by *Agrobacterium tumefaciens*. **Fungal Genet Biol**, v. 42, n. 11, p. 904-13, Nov 2005. ISSN 1087-1845. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16260158> >.

MEIJER, A. H.; SPAINK, H. P. Host-pathogen interactions made transparent with the zebrafish model. **Curr Drug Targets**, v. 12, n. 7, p. 1000-17, Jun 2011. ISSN 1873-5592. Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=21366518](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21366518) >.

MESA-ARANGO, A. C.; SCORZONI, L.; ZARAGOZA, O. It only takes one to do many jobs: Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug. **Front Microbiol**, v. 3, p. 286, 2012. ISSN 1664-302X. Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=23024638](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=23024638) >.

MICELI, M. H.; DIAZ, J. A.; LEE, S. A. Emerging opportunistic yeast infections. **Lancet Infect Dis**, v. 11, n. 2, p. 142-51, Feb 2011. ISSN 1474-4457. Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=21272794](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21272794) >.

MUHAMMED, M. et al. The challenge of managing fusariosis. **Virulence**, v. 2, n. 2, p. 91-6, Mar-Apr 2011. ISSN 2150-5608. Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=21304267](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21304267) >.

MUHAMMED, M.; COLEMAN, J. J.; MYLONAKIS, E. *Caenorhabditis elegans*: a nematode infection model for pathogenic fungi. **Methods Mol Biol**, v. 845, p. 447-54, 2012. ISSN 1940-6029. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22328394> >.

MULLINS, E. D. et al. Agrobacterium-Mediated Transformation of *Fusarium oxysporum*: An Efficient Tool for Insertional Mutagenesis and Gene Transfer. **Phytopathology**, v. 91, n. 2, p. 173-80, Feb 2001. ISSN 0031-949X. Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18944391](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18944391) >.

MUNOZ, P. et al. *Candida krusei* fungaemia: antifungal susceptibility and clinical presentation of an uncommon entity during 15 years in a single general hospital. **J Antimicrob Chemother**, v. 55, n. 2, p. 188-93, Feb 2005. ISSN 0305-7453. Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15650001](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15650001) >.

MYLONAKIS, E. et al. Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Cryptococcus neoformans* as a model of yeast pathogenesis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 24, p. 15675-80, Nov 2002. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12438649> >.

MYLONAKIS, E.; CASADEVALL, A.; AUSUBEL, F. M. Exploiting amoeboid and non-vertebrate animal model systems to study the virulence of human pathogenic fungi. **PLoS Pathog**, v. 3, n. 7, p. e101, Jul 2007. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17676994> >.

MYLONAKIS, E. et al. *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. **Infect Immun**, v. 73, n. 7, p. 3842-50, Jul 2005. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15972469> >.

MÖLLER, E. M. et al. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. **Nucleic Acids Res**, v. 20, n. 22, p. 6115-6, Nov 1992. ISSN 0305-1048. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1461751> >.

NAGLIK, J. et al. *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. **Cell Microbiol**, v. 6, n. 10, p. 915-26, Oct 2004. ISSN 1462-5814. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15339267](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15339267) >.

NOBLE, S. M.; JOHNSON, A. D. Strains and strategies for large-scale gene deletion studies of the diploid human fungal pathogen *Candida albicans*. **Eukaryot Cell**, v. 4, n. 2, p. 298-309, Feb 2005. ISSN 1535-9778. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15701792](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15701792) >.

NUCCI, M.; COLOMBO, A. L. Candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical, epidemiologic, and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 58, n. 1, p. 77-82, May 2007. ISSN 0732-8893. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17368800](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17368800) >.

NYILASI, I. et al. *Agrobacterium tumefaciens* -mediated transformation of the zygomycete fungus *Backusella lamprospora*. **J Basic Microbiol**, v. 48, n. 1, p. 59-64, Feb 2008. ISSN 0233-111X. Disponível em: <

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18247397](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18247397) >.

OKOLI, I. et al. Identification of antifungal compounds active against *Candida albicans* using an improved high-throughput *Caenorhabditis elegans* assay. **PLoS One**, v. 4, n. 9, p. e7025, 2009. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19750012> >.

OROZCO, A. S. et al. Mechanism of fluconazole resistance in *Candida krusei*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 42, n. 10, p. 2645-9, Oct 1998. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9756770> >.

PAILA, Y. D.; SAHA, B.; CHATTOPADHYAY, A. Amphotericin B inhibits entry of *Leishmania donovani* into primary macrophages. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 399, n. 3, p. 429-33, Aug 27 2010. ISSN 1090-2104. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=20678487](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20678487) >.

PALACIOS, D. S. et al. Synthesis-enabled functional group deletions reveal key underpinnings of amphotericin B ion channel and antifungal activities. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 17, p. 6733-8, Apr 26 2011. ISSN 1091-6490. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=21368185](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21368185) >.

PAPPAS, P. G. et al. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clin Infect Dis**, v. 48, n. 5, p. 503-35, Mar 2009. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19191635> >.

PAPPAS, P. G. et al. Guidelines for treatment of candidiasis. **Clin Infect Dis**, v. 38, n. 2, p. 161-89, Jan 15 2004. ISSN 1537-6591. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14699449](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14699449) >.

PARNG, C. et al. Zebrafish: a preclinical model for drug screening. **Assay Drug Dev Technol**, v. 1, n. 1 Pt 1, p. 41-8, Nov 2002. ISSN 1540-658X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15090155> >.

PEMAN, J. et al. Epidemiology, species distribution and in vitro antifungal susceptibility of fungaemia in a Spanish multicentre prospective survey. **J**



**Antimicrob Chemother**, v. 67, n. 5, p. 1181-7, May 2012. ISSN 1460-2091. Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=22351683](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22351683) >.

PEMAN, J.; SALAVERT, M. General epidemiology of invasive fungal disease. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, v. 30, n. 2, p. 90-8, Feb 2012. ISSN 1578-1852. Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=22079232](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22079232) >.

PERLIN, D. S. Current perspectives on echinocandin class drugs. **Future Microbiol**, v. 6, n. 4, p. 441-57, Apr 2011. ISSN 1746-0921. Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=21526945](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21526945) >.

PFALLER, M. A. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. **Am J Med**, v. 125, n. 1 Suppl, p. S3-13, Jan 2012. ISSN 1555-7162. Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=22196207](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=22196207) >.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clin Microbiol Rev**, v. 20, n. 1, p. 133-63, Jan 2007. ISSN 0893-8512. Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17223626](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17223626) >.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.. Epidemiology of invasive mycoses in North America. **Crit Rev Microbiol**, v. 36, n. 1, p. 1-53, 2010. ISSN 1549-7828. Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=20088682](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20088682) >.

PFALLER, M. A. et al. *Candida krusei*, a multidrug-resistant opportunistic fungal pathogen: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. **J Clin Microbiol**, v. 46, n. 2, p. 515-21, Feb 2008. ISSN 1098-660X. Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18077633](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18077633) >.

PRICE, M. F.; WILKINSON, I. D.; GENTRY, L. O. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. **Sabouraudia**, v. 20, n. 1, p. 7-14,

Mar 1982. ISSN 0036-2174. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7038928> >.

PUKKILA-WORLEY, R.; AUSUBEL, F. M.; MYLONAKIS, E. *Candida albicans* infection of *Caenorhabditis elegans* induces antifungal immune defenses. **PLoS Pathog**, v. 7, n. 6, p. e1002074, Jun 2011. ISSN 1553-7374. Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=21731485](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21731485) >.

RAMAGE, G. et al. Our current understanding of fungal biofilms. **Crit Rev Microbiol**, v. 35, n. 4, p. 340-55, 2009. ISSN 1549-7828. Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19863383](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19863383) >.

RANGEL-FRAUSTO, M. S. et al. National epidemiology of mycoses survey (NEMIS): variations in rates of bloodstream infections due to *Candida* species in seven surgical intensive care units and six neonatal intensive care units. **Clin Infect Dis**, v. 29, n. 2, p. 253-8, Aug 1999. ISSN 1058-4838. Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10476721](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10476721) >.

RICHET, H. et al. Candidemia in French hospitals: incidence rates and characteristics. **Clin Microbiol Infect**, v. 8, n. 7, p. 405-12, Jul 2002. ISSN 1198-743X. Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12199850](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12199850) >.

RODRIGUEZ-TUDELA, J. L. et al. Clinical relevance of resistance to antifungals. **Int J Antimicrob Agents**, v. 32 Suppl 2, p. S111-3, Nov 2008. ISSN 0924-8579. Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19013333](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19013333) >.

ROGERS, T. R. Antifungal drug resistance: limited data, dramatic impact? **Int J Antimicrob Agents**, v. 27 Suppl 1, p. 7-11, Jun 2006. ISSN 0924-8579. Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16701982](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16701982) >.

ROMANI, L. Immunity to fungal infections. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 4, p. 275-88, Apr 2011. ISSN 1474-1741. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21394104> >.



ROWAN, R. et al. Use of *Galleria mellonella* larvae to evaluate the in vivo anti-fungal activity of [Ag<sub>2</sub>(mal)(phen)<sub>3</sub>]. **Biometals**, v. 22, n. 3, p. 461-7, Jun 2009. ISSN 1572-8773. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19082779> >.

RUIZ-DIEZ, B. Strategies for the transformation of filamentous fungi. **J Appl Microbiol**, v. 92, n. 2, p. 189-95, 2002. ISSN 1364-5072. Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11849345](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11849345) >.

SAMBROOK, J. **Molecular cloning: a laboratory manual**, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 1989.

SANGALLI-LEITE, F. et al. Amphotericin B mediates killing in *Cryptococcus neoformans* through the induction of a strong oxidative burst. **Microbes Infect**, v. 13, n. 5, p. 457-67, May 2011. ISSN 1769-714X. Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=21310262](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=21310262) >.

SANGLARD, D. et al. *Candida albicans* mutations in the ergosterol biosynthetic pathway and resistance to several antifungal agents. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 47, n. 8, p. 2404-12, Aug 2003. ISSN 0066-4804. Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12878497](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12878497) >.

SHAO, P. L.; HUANG, L. M.; HSUEH, P. R. Recent advances and challenges in the treatment of invasive fungal infections. **Int J Antimicrob Agents**, v. 30, n. 6, p. 487-95, Dec 2007. ISSN 0924-8579. Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17961990](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17961990) >.

SOKOL-ANDERSON, M. L.; BRAJTBURG, J.; MEDOFF, G. Amphotericin B-induced oxidative damage and killing of *Candida albicans*. **J Infect Dis**, v. 154, n. 1, p. 76-83, Jul 1986. ISSN 0022-1899. Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=3519792](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3519792) >.

STAATS, C. C. et al. Gene inactivation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in the filamentous fungi *Metarhizium anisopliae*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 76, n. 4, p. 945-50, Sep 2007. ISSN 0175-7598. Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17607574](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17607574) >.

SUGUI, J. A.; CHANG, Y. C.; KWON-CHUNG, K. J. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Aspergillus fumigatus*: an efficient tool for insertional mutagenesis and targeted gene disruption. **Appl Environ Microbiol**, v. 71, n. 4, p. 1798-802, Apr 2005. ISSN 0099-2240. Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15812003](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15812003) >.

TAMPAKAKIS, E.; OKOLI, I.; MYLONAKIS, E. A *C. elegans*-based, whole animal, in vivo screen for the identification of antifungal compounds. **Nat Protoc**, v. 3, n. 12, p. 1925-31, 2008. ISSN 1750-2799. Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19180076](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19180076) >.

TOJO, S. et al. Involvement of both granular cells and plasmatocytes in phagocytic reactions in the greater wax moth, *Galleria mellonella*. **J Insect Physiol**, v. 46, n. 7, p. 1129-1135, Jul 2000. ISSN 1879-1611. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10817839> >.

TREJO, W. H.; BENNETT, R. E. *Streptomyces nodosus* sp. n., the amphotericin-producing organism. **J Bacteriol**, v. 85, p. 436-9, Feb 1963. ISSN 0021-9193. Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=13994057](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=13994057) >.

TRICK, W. E. et al. Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989-1999. **Clin Infect Dis**, v. 35, n. 5, p. 627-30, Sep 1 2002. ISSN 1537-6591. Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12173140](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12173140) >.

TSANG, C. S. et al. Phospholipase, proteinase and haemolytic activities of *Candida albicans* isolated from oral cavities of patients with type 2 diabetes mellitus. **J Med Microbiol**, v. 56, n. Pt 10, p. 1393-8, Oct 2007. ISSN 0022-2615. Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17893179> >.

VANDEPUTTE, P. et al. Reduced susceptibility to polyenes associated with a missense mutation in the ERG6 gene in a clinical isolate of *Candida glabrata* with pseudohyphal growth. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 51, n. 3, p. 982-90, Mar 2007. ISSN 0066-4804. Disponível em: <  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17158937](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17158937) >.

VASCOTTO, S. G.; BECKHAM, Y.; KELLY, G. M. The zebrafish's swim to fame as an experimental model in biology. **Biochem Cell Biol**, v. 75, n. 5, p. 479-85, 1997. ISSN 0829-8211. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9551173> >.

VILMOS, P.; KURUCZ, E. Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. **Immunol Lett**, v. 62, n. 2, p. 59-66, Jun 1998. ISSN 0165-2478. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9698099> >.

VISCOLI, C. et al. Candidemia in cancer patients: a prospective, multicenter surveillance study by the Invasive Fungal Infection Group (IFIG) of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). **Clin Infect Dis**, v. 28, n. 5, p. 1071-9, May 1999. ISSN 1058-4838. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10452637](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10452637) >.

WALTON, F. J.; IDNURM, A.; HEITMAN, J. Novel gene functions required for melanization of the human pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Mol Microbiol**, v. 57, n. 5, p. 1381-96, Sep 2005. ISSN 0950-382. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16102007](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16102007) >.

WANESS, A.; DAWSARI, G. A.; JAHDALI, H. A. The Rise of an Opportunistic Infection called "Invasive Zygomycosis". **J Glob Infect Dis**, v. 1, n. 2, p. 131-8, Jul 2009. ISSN 0974-8245. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=20300403](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20300403) >.

WOOD, W. B. Determination of pattern and fate in early embryos of *Caenorhabditis elegans*. **Dev Biol (N Y 1985)**, v. 5, p. 57-78, 1988. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=3077982](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3077982) >.

XIONG, J. et al. *Candida albicans* and *Candida krusei* differentially induce human blood mononuclear cell interleukin-12 and gamma interferon production. **Infect Immun**, v. 68, n. 5, p. 2464-9, May 2000. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10768932> >.

YAMADA, T. et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the dermatophyte, *Trichophyton mentagrophytes*: an efficient tool for gene transfer. **Med Mycol**, v. 47, n. 5, p. 485-94, 2009. ISSN 1460-2709. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18951290](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18951290) >.

YARDLEY, V.; CROFT, S. L. In vitro and in vivo activity of amphotericin B-lipid formulations against experimental *Trypanosoma cruzi* infections. **Am J Trop Med Hyg**, v. 61, n. 2, p. 193-7, Aug 1999. ISSN 0002-9637. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10463666](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10463666) >.

ZHONG, Y. H. et al. *Agrobacterium-mediated* transformation (AMT) of *Trichoderma reesei* as an efficient tool for random insertional mutagenesis. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 73, n. 6, p. 1348-54, Jan 2007. ISSN 0175-7598. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17021875> >.

ZHU, J. et al. The bases of crown gall tumorigenesis. **J Bacteriol**, v. 182, n. 14, p. 3885-95, Jul 2000. ISSN 0021-9193. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10869063](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10869063) >.

ZUPAN, J. et al. The transfer of DNA from *agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. **Plant J**, v. 23, n. 1, p. 11-28, Jul 2000. ISSN 0960-7412. Disponível em: < [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10929098](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10929098) >.

# Capítulo 2

## PLOS ONE

Antifungal efficacy during *Candida krusei* infection in non conventional models correlates with the yeast in vitro susceptibility profile

–Manuscript Draft–

Manuscript Number:	
Article Type:	Research Article
Full Title:	Antifungal efficacy during <i>Candida krusei</i> infection in non conventional models correlates with the yeast in vitro susceptibility profile
Short Title:	<i>Candida krusei</i> infection in non mammalian models
Corresponding Author:	Oscar Zaragoza Instituto de Salud Carlos III Majadahonda, Madrid SPAIN
Keywords:	<i>Galleria mellonella</i> , <i>Caenorhabditis elegans</i> , <i>Candida krusei</i> , "in vivo" resistance
Abstract:	The incidence of opportunistic fungal infections has increased in the last decades due to the growing proportion of immunocompromised patients in our society. <i>Candida krusei</i> has been described as a causative agent of disseminated fungal infections in susceptible patients. Although its prevalence remains low among yeast infections (2–5%), its intrinsic resistance to fluconazole makes this yeast important from epidemiologic aspects. Non mammalian organisms are feasible models to study fungal virulence and drug efficacy. In this work we have used the Lepidoptera <i>Galleria mellonella</i> and the nematode <i>Caenorhabditis elegans</i> as models to assess antifungal efficacy during infection by <i>C. krusei</i> . This yeast killed <i>G. mellonella</i> at 30 and 37°C and reduced the haemocytic density. Infected larvae melanized in a dose-dependant manner. Fluconazole did not protect against <i>C. krusei</i> infection, in contrast to Amphotericin B which showed efficacy at 4 mg/kg. Similar results were found in the model host <i>C. elegans</i> . Our work demonstrates that non mammalian models are useful tools to investigate in vivo antifungal efficacy.
Order of Authors:	Liliana Scorzoni Maria Pilar de Lucas Ana Cecilia Mesa-Arango Ana Marisa Fusco-Almeida Encarnación Lozano Manuel Cuenca-Estrella Oscar Zaragoza Maria Jose Mendes-Giannini
Suggested Reviewers:	Josh Nosanchuk Albert Einstein College of Medicine josh.nosanchuk@einstein.yu.edu Carlos Taborda Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil taborda@usp.br Attila Gacser Department of Microbiology, University of Szeged gacsera@gmail.com Expert in virulence of non-albicans <i>Candida</i> spp.
Opposed Reviewers:	



Academic Editor  
PLoS One

Madrid, October 4<sup>th</sup>, 2012

Dear Editor

Find enclosed the manuscript "Antifungal efficacy during *Candida krusei* infection in non conventional models correlates with the yeast in vitro susceptibility profile" that we would like to be considered for publication in PLoS One.

In this work we have studied the interaction of the pathogenic yeast *Candida krusei* with non mammalian models. This yeast is interesting for several reasons: it has intrinsic resistance to fluconazole, it is associated with a high mortality, and it shows reduced virulence in mammalian models. We have investigated the virulence of *C. krusei* in two non conventional systems, *Galleria mellonella* and *Caenorhabditis elegans*. Although the use of non conventional models to study fungal virulence has already been addressed in the literature, we believe that our work provides new insights about this pathogenic yeast. We provide a full characterization of the interaction of this yeast with *G. mellonella*, including larvae responses (such as phagocytosis, haemocyte density and melanization), fungal filamentation and burden and histopathology. We also demonstrated that the in vitro susceptibility profile correlates with the efficacy of the antifungal in vivo, especially in the case of fluconazole. The antifungal efficacy experiments have been confirmed with the nematode *C. elegans*. Our results indicate new approaches to study the virulence and resistant phenotype of *Candida krusei*.

We hope that our article reaches the standards for publication in PLoS One.

Best regards

Oscar Zaragoza  
Maria Jose Soares Mendes-Giannini

## **Antifungal efficacy during *Candida krusei* infection in non conventional models correlates with the yeast in vitro susceptibility profile**

Liliana Scorzoni<sup>1,2</sup>, Maria Pilar de Lucas<sup>3</sup>, Ana C. Mesa-Arango<sup>1,4</sup>, Ana Marisa Fusco-Almeida<sup>2</sup>, Encarnación Lozano<sup>3</sup>, Manuel Cuenca-Estrella<sup>1</sup>, Oscar Zaragoza<sup>1\*</sup> and Maria Jose Soares Mendes-Gianinni<sup>2\*</sup>

1 Mycology Reference Laboratory, National Centre for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain.

2 Laboratório de Micologia Clínica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista UNESP, Araraquara, Brazil.

3 Department of Cellular Biology, National Centre for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain.

4 Group of Investigative Dermatology, University of Antioquia, Medellín, Colombia.

\* Oscar Zaragoza and Maria Jose Soares Mendes Giannini share the corresponding authorship of the article. Oscar Zaragoza, Mycology Reference Laboratory, National Centre for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III, Carretera Majadahonda-Pozuelo, Km2, Majadahonda, 28220 Madrid, Spain. e-mail: [ozaragoza@isciii.es](mailto:ozaragoza@isciii.es). Phone: +34-91-8223584. Fax: +34-91-5097966. Maria Jose Soares Mendes-Giannini. Laboratório de Micologia Clínica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista UNESP. Rua Expedicionários do Brasil, 1621 Araraquara 14801-902, Brazil. E-mail: [giannini@cfar.unesp.br](mailto:giannini@cfar.unesp.br). Phone: +55 16-3301-5714. Fax: +55 16 3301-0073.

Keywords: *Galleria mellonella*, *Caenorhabditis elegans*, *Candida krusei*, “in vivo” resistance.

Short title: *Candida krusei* infection in non mammalian models



## ABSTRACT

The incidence of opportunistic fungal infections has increased in the last decades due to the growing proportion of immunocompromised patients in our society. *Candida krusei* has been described as a causative agent of disseminated fungal infections in susceptible patients. Although its prevalence remains low among yeast infections (2-5%), its intrinsic resistance to fluconazole makes this yeast important from epidemiologic aspects. Non mammalian organisms are feasible models to study fungal virulence and drug efficacy. In this work we have used the Lepidoptera *Galleria mellonella* and the nematode *Caenorhabditis elegans* as models to assess antifungal efficacy during infection by *C. krusei*. This yeast killed *G. mellonella* at 30 and 37°C and reduced the haemocytic density. Infected larvae melanized in a dose-dependent manner. Fluconazole did not protect against *C. krusei* infection, in contrast to Amphotericin B which showed efficacy at 4 mg/kg. Similar results were found in the model host *C. elegans*. Our work demonstrates that non mammalian models are useful tools to investigate *in vivo* antifungal efficacy.

## INTRODUCTION

Fungal infections have emerged worldwide due to a growing population of immunosuppressed patients, including patients with cancer, AIDS, solid-organ and hematopoietic stem cell transplant recipients, premature neonates, and patients recovering from major surgery [1-5]. These infections have significant morbidity and mortality rates and are difficult to prevent, diagnose and treat [6-8].

*Candida* spp are commensal yeasts responsible for different clinical manifestations, from mucocutaneous overgrowth to blood stream infections [1,9-12]. *Candida albicans* is still the major cause of invasive fungal disease. However a growing number of infections produced by non-*albicans* *Candida* spp has been reported in the last years [1,13-15]. Among them, there are some species that are intrinsically resistant or have reduced susceptibility to antifungals. The massive use of antifungals in prophylaxis, such as fluconazole, has facilitated the selection of pathogenic fungi resistant to these agents [16-19].

*Candida krusei* is an opportunistic pathogen which presents intrinsic resistance to fluconazole. The infection is associated with the prophylactic or therapeutic use of this antifungal agent [20-23]. Two mechanisms of azole resistance in *C. krusei* have been described: the overexpression of drug efflux pumps [24] and the diminished sensitivity of the target enzyme, the cytochrome P450 sterol 14-demethylase (encoded by the *CYP51* gene) [25]. Diseases caused by *C. krusei* have high associated mortality (30-60%) [26,27]. Despite the intrinsic resistance to fluconazole, *C. krusei* is usually susceptible to voriconazole *in vitro*, which correlates with the binding of this last drug to the target enzyme [21].

Antifungal resistance *in vitro* does not always correlate with clinical resistance. The best correlation between *in vitro* and clinical efficacy is found in HIV-positive

patients with oropharyngeal candidiasis [22,28,29]. In contrast, although *C. parapsilosis* shows reduced *in vitro* susceptibility to echinocandins, these antifungals have been shown to be effective in the treatment of invasive candidiasis caused by this species [30].

The use of invertebrate hosts has recently emerged and facilitated the study of fungal pathogenesis. Among these non-mammalian hosts, amoebae (*Acanthamoeba castellanii*, *Dictyostellium discoideum*), nematodes (*Caenorhabditis elegans*) and insects (*Drosophila melanogaster*, *Galleria mellonella*) have been successfully used to study the virulence of some fungi [31-35]. Moreover, some aspects of the innate response are conserved between these hosts and mammals [36]. *Galleria mellonella* is a Lepidoptera (Pyralidae) that provides important advantages as host model. The larvae can be incubated in a range of temperature between 25 to 37°C, so it is possible to simulate the natural fungal habitat and the infection conditions in mammals. In addition, it is possible to administrate exact doses of pathogens to the larvae, which poses a technical improvement over other non-conventional hosts. *Galleria mellonella* has six types of phagocytic cells that play important role in the defense system [37,38]. The density of these cells in the haemolymph is not constant, and changes during infection can be easily measured and used as a parameter of the response of the larva after exposure to pathogens [39]. The viability of the larvae can be easily recorded by the lack of movement and the massive melanization induced by *G. mellonella* in response to infection [40-42]. Another organism that is used as model host is the soil nematode *Caenorhabditis elegans* which feeds on microorganisms, but is susceptible to bacterial and fungal pathogens [33,43-45]. *Caenorhabditis elegans* has been used to study virulence, filamentation and antifungal efficacy of antifungal drugs [44,46].

In this study we initially aimed to characterize the interaction between *G. mellonella* and *C. krusei* with two purposes: 1) Get insights about virulence traits of this

pathogenic yeast, and 2) Investigate if antifungal efficacy *in vivo* correlates with the susceptibility profile shown by *C. krusei in vitro*. Furthermore, we have complemented our studies with *C. elegans*, and observed similar behaviors, indicating that non conventional models can be used to investigate *C. krusei* virulence and antifungal efficacy *in vivo*.

## **MATERIAL AND METHODS:**

**Strains and media:** *Candida albicans* SC5314 [47], *Candida krusei* ATCC 6258, two clinical isolates (CL8053 and CL80317) from the Yeast Collection of the Mycology Reference Laboratory of the Spanish National Centre for Microbiology and *Cryptococcus neoformans* variety *grubii* (H99 strain, ATCC 20882) were used in this study. The yeasts were grown overnight in liquid Sabouraud medium (Difco, BD, USA) at 30°C with shaking. *Escherichia coli* OP50 strain was obtained from the *Caenorhabditis* Genetics Center (University of Minnesota) and was maintained on LB agar plates at 37°C.

**Insect larvae manipulation and incubation conditions:** *Galleria mellonella* larvae (R.J. Mous Livebait, The Netherlands) in the larval stage (0.3 - 0.5 g) were placed in Petri dishes and incubated at 37°C in the dark the night before the experiments. Larvae with color alterations (i.e. dark spots or with apparent melanization) were excluded. Antifungals and yeast suspensions were injected in the haemocoel through the last left pro-leg of the larvae using a 10 µL Hamilton syringe (Hamilton, USA). The pro-leg was previously cleaned with 70% ethanol. A total of 10 µL were injected in each larva. Larvae death was monitored by visual inspection of the color (brown-dark brown) or by lack of movement after touching them with forceps. For each condition, a total of 20

larvae were used, and each experiment was repeated at least twice. After infection, larvae were incubated at 30 or 37°C.

**Survival assay:** Yeasts were grown overnight in liquid Sabouraud, washed with PBS, and suspended in the same buffer. Cell density was estimated with an Automatic Cell Counter TC10 (Bio Rad). For survival assays,  $10^7$ ,  $5 \times 10^6$  and  $2.5 \times 10^6$  cells/larvae of *C. krusei* and  $10^6$ ,  $5 \times 10^5$  and  $10^5$  cells/larvae of *C. albicans* were inoculated. The inocula were prepared in PBS plus 20 mg/L of Ampicillin to prevent bacterial contamination. The infected larvae were incubated at 37°C and the death was daily monitored during 7 days.

**Growth curve at different temperatures:** Yeast strains were grown overnight and diluted in fresh Sabouraud liquid medium at  $10^3$  cells/mL. Two hundred microliters of this suspension were placed in 96-wells microdilution plates, and incubated at 30 or 37°C in a Labsystems IEMS Reader MF spectrophotometer. The optical density was determined every hour during 72 hrs at (405 nm).

**In vivo phagocytosis assay:** Yeast cells were stained with 10 µg/mL Calcofluor white (Sigma, St. Louis, MO) for 30 min at 37°C. Then, these cells were infected in *G. mellonella* larvae ( $10^7$  cells/larvae, 5 per group) and phagocytosis was analyzed after 3 hrs of incubation at 37°C. Haemolymph was collected in Eppendorf tubes and diluted 1:1 in IPS buffer (Insect Physiological Saline: 150 mM sodium chloride, 5 mM potassium chloride, 10 mM Tris-HCl pH 6.9, 10 mM EDTA and 30 mM sodium citrate) to avoid coagulation and melanization of the haemolymph. Haemocytes were placed on a slide and phagocytosis was visually quantified using a Leica DMI 3000B microscope. *Cryptococcus neoformans* H99 strain was used as control. Phagocytosis was also analyzed in larvae infected in the same way, but treated with 64 mg/kg fluconazole and 4 mg/kg amphotericin B.

**Determination of haemocyte density:** Groups of five *G. mellonella* were infected with  $10^7$  yeast cells/larvae and incubated at 37°C for 3 hrs. The haemolymph of each larva was collected in eppendorf tubes and diluted 1:2 and 1:10 in IPS buffer. The cells were counted using a haemocytometer.

**Measurement of in vivo filament formation:** *Galleria mellonella* was infected with  $10^7$  cells/larvae of *Candida albicans* and *Candida krusei* strains. The larvae were incubated at 37°C for 24 hours. Larvae were macerated on 100 µm nylon cell strainers (Falcon, BD, USA) with 1 ml of IPS. The liquid was then collected, centrifuged and suspended in 1 mL of the same buffer. Samples were stained with Calcofluor white (Sigma, St. Louis, MO), as described above, and yeast morphology was observed with a Leica DMI 3000B fluorescence microscope.

**Melanization quantification:** Larvae were infected with PBS,  $5 \times 10^5$ ,  $10^6$  and  $5 \times 10^6$  cells/larvae. Then, the haemolymph of each larva was collected after 3 and 24 hrs in eppendorf tubes and diluted 1:10 with IPS buffer. The samples were placed in 96 wells microdilution plates, and the optical density (O.D.) was determined at 405 nm using a Labsystems IEMS Reader MF spectrophotometer. The melanization of larvae infected with *C. albicans* ( $5 \times 10^5$  cells/larvae) and *C. krusei* ( $5 \times 10^6$  cells/larvae) and treated with 64 mg/kg fluconazole and 4 mg/kg amphotericin B was also determined.

**Treatment with antifungal drugs:** Infected larvae were treated with amphotericin B (1, 2 and 4 mg/kg), fluconazole (128, 64, 32, 12, 4 mg/kg) or caspofungin (1, 2 and 4 mg/kg). In some experiments, a combination of fluconazole and amphotericin B was also used. Groups of 10 larvae were treated with the antifungals alone to test for toxicity.

**Fungal burden determination:** Infected larvae were selected at different times of infection, washed with 70% ethanol and cut into small pieces with a scalpel. Two mL of

PBS-ampicillin were added and the mix was homogenized gently with a vortex and glass beads for 10 seconds. The mix was finally suspended in 9 mL of PBS-ampicillin. Different dilutions were made for each sample and 50 µl from these dilutions were placed on Sabouraud-cloramphenicol agar plates (Oxoid). The plates were incubated during 48 h at 37°C, and CFUs were determined.

**Histology:** Three larvae from different groups (uninfected, infected and/or treated with antifungals) were collected at day 1 to 4 after infection. The larvae were conserved in 70% ethanol and longitudinal incisions were made with a scalpel in the dorsal part of the insect. The samples were fixed with 10% buffered formaline for 24 hrs. Then, the samples were dehydrated with increasing concentrations of ethanol, rinsed with xylol, and embedded in paraffin. Tissue sections (5 microns) were stained with periodic acid Schiff (PAS) solution and observed with a Leica DMI3000 microscope.

***Caenorhabditis elegans* strain and infection conditions:**

The following *C. elegans* mutant strain, obtained from CGC, was used in all experiments: AU37 *glp-4(bn2)* I; *sek-1(km4)* X. This strain was grown on agar plates seeded with *E. coli* OP50 and incubated at 15°C according to standard procedures [48]. AU37 (*bn2*) I; *sek-1(km4)* X. This strain is usually chosen for virulence and antifungal efficacy assays because *glp-4* mutants are sterile at 25°C. This allows to follow up easily the survival of the individual animals from the beginning to the end of the experiment and avoids mixing with their progeny [33,44]. The *sek-1* gene encodes a mitogen-activated protein kinase important for the defense of *C. elegans* against microbial infections [33,44]. Therefore worms defective for *sek-1* are more susceptible to infection and die earlier than wild-type *C. elegans* animals. *Candida* strains were cultivated in liquid Sabouraud medium (Difco, BD, USA) at 35°C with shaking. One hundred µL from this culture were inoculated in solid BHI media (Difco) containing kanamycin (90 µg/mL) and ampicillin (200 µg/mL) and incubated for 24 hours at 30°C.

Synchronized worms in the L4 stage were added to the center of the agar plates inoculated with the yeast strains lawns and incubated for three hours at 25°C. In parallel, L4 worms were placed on agar plates containing lawns of *E. coli* OP50 strain. After the three hours incubation, worms were washed with M9 and 20-30 of them were transferred per well to 12-well plates with 1 mL 60% M9 buffer [45], 40% BHI, 10 µg/mL cholesterol in ethanol, 200 µg/mL ampicilin and 90 µg/mL kanamycin. For antifungal efficacy, amphotericin B (1 and 2 µg/mL), fluconazole (12 µg/ml), caspofungin (2, 4 and 6 µg/ml), or a combination of amphotericin B (1 µg/ml) plus fluconazole (12 µg/ml) were added to the media. Plates were incubated at 25°C and individual worm survival was monitored daily. Nematodes were considered dead when they did not respond to touching. A minimum of two independent experiments was carried out for each treatment. Images were captured with a video camera (JVC KY-F550) attached to a dissecting microscope (Leica MZ7.5)

**Statistics:** Graphs and Statistics analyzes were performed with Graph Pad Prisma 5 (La Jolla CA, USA). Survival curves were analyzed by Log-rank (Mantel-Cox) Test and phagocytosis assay, haemocyte density, melanization quantification and fungal burden were analyzed using t-Test.

## RESULTS

### ***Candida krusei* killed *Galleria mellonella* in a dose dependant manner**

We first investigated if *C. krusei* killed *G. mellonella*. Our results show that *G. mellonella* is susceptible to *C. krusei* infection (Figure 1A). The death rate of the larvae depended on the yeast dose injected. Most reproducible results were found when larvae were infected with  $5 \times 10^6$  *C. krusei* cells. However, *C. krusei* was less virulent than other fungi, such as *C. albicans*, which killed *G. mellonella* at lower doses ( $5 \times 10^5$ ,



Fig 1B). To confirm that the death was not consequence of a shock due to big amounts of yeast injected in the larvae, we infected a group of larvae with yeast inactivated by incubation in 4% paraformaldehyde. As shown in figure 1C, inactivated yeast did not significantly kill *G. mellonella*, confirming that larvae death was dependent on living yeast.

To verify if *C. krusei* virulence in *G. mellonella* depended on the temperature at which the larvae are incubated, we compared virulence of *C. krusei* and *C. albicans* at both temperatures (30 and 37°C). In contrast to *Candida albicans*, no statistical significant difference was observed in the survival of *G. mellonella* incubated at the different temperatures, indicating *C. krusei* virulence does not depend on the temperature (figure 1D). Similar findings were obtained with *C. krusei* clinical isolates (result not shown). To confirm these results, we investigated if *C. krusei* growth was affected by temperature in a similar manner as *Candida albicans*. So we performed growth curves of both species at 30°C and 37°C. As shown in figure 1E and F, *C. albicans* grew better at 37°C compared to 30°C (reduction of two fold in the generation time). In contrast, *C. krusei* grew similarly at both temperatures (0.85 fold decrease in the generation time when the cells were grown at 37°C compared to 30°C). Also, the final OD reached at the stationary phase at different temperatures was different with both species. *Candida albicans* reached higher OD at 37°C, which differed with the situation found in *C. krusei*, where the final OD at the stationary phase was almost identical at 30 and 37°C. Latency period was longer at 30°C, but the same trend was observed in both species (figures 1E and 1F).

### **Yeast inoculation caused early melanization of the larvae**

*Galleria mellonella* larvae appeared melanized after a few minutes of *Candida krusei* injection (figure 2A). To quantify this phenomenon, we isolated the haemolymph and measured its optical density at 405 nm. When larvae were infected with  $5 \times 10^6$  C.

*krusei* cells, there was a significant accumulation of melanin in the haemolymph (4.3 times comparing to the non infected larvae) and this melanization increased over time (5 times at 24 hrs, Figure 2B). Clinical isolates showed a similar behavior (Figure 2C and D).

### **Phagocytosis and effect of *C. krusei* on haemocyte density**

We examined if different *C. krusei* strains had any effect on the haemocyte density. As shown in figure 3A, *C. krusei* produced a decreased in haemocyte density in a similar manner to *C. albicans*.

We then investigated if *C. krusei* cells were phagocytosed by *G. mellonella* haemocytes. We compared the phagocytosis of this pathogen to the one measured with *C. albicans* and *C. neoformans*. The phagocytosis for all the *Candida* strains (*albicans* and *krusei*) was significantly lower to the phagocytosis observed with *C. neoformans* (figure 3B).

*Candida krusei* can form hyphae and pseudohyphae *in vitro*, so we investigated if these changes also took place during infection in *G. mellonella*. We included *C. albicans* in these experiments as control, since it has been reported that this last yeast can form hyphae in this model host [49]. As expected, *Candida albicans* efficiently produced filaments in the larvae. *Candida krusei* also produced filaments, and in *G. mellonella* crude extracts they were frequently found in clumps of fat body of dark color, which we believe that are composed mainly of insect melanin. This fact may explain the fast melanization of *G. mellonella* when infected with *C. krusei*.

### **Antifungal efficacy during *C. krusei* infection in *G. mellonella***

One of the main features of *C. krusei* is its intrinsic resistance to fluconazole *in vitro*. So we studied if this phenotype correlated with a lack of response to the antifungal during infection in *G. mellonella*. For this purpose, we performed survival

experiments of *G. mellonella* infected with *C. krusei* and *C. albicans* and treated the larvae with different doses of different antifungals (fluconazole, amphotericin B and caspofungin). In the case of larvae infected with *C. krusei*, treatment with fluconazole, even a very high doses (32 and 64 mg/kg) did not increase the survival (figure 4A and B). At higher concentrations (128 mg/kg), there was a decrease in the survival, which is explained by the toxicity of the antifungal at this high concentration, which induced 25% of death after 7 days of treatment (data not shown). When the same experiments were performed with *C. albicans*, treatment with all the fluconazole concentrations produced significant larvae survival (figure 4C and D). Amphotericin B (4 mg/kg) prolonged survival of larvae infected with *C. albicans* at all the concentrations tested (figure 5A). In contrast, in larvae infected with *C. krusei*, AmB only protected at the higher dose (4 mg/kg), which produced a 60% survival at the fourth day (figure 5B). In a similar way, caspofungin was effective during *C. albicans* infection at all the doses tested (figure 5C), while it only protected at the higher dose (4 mg/kg) in larvae inoculated with *C. krusei* (figure 5D). We also used antifungal combination with fluconazole (12 or 4 mg/kg) and Amphotericin B at a sub-therapeutic dose in *G. mellonella* (1 mg/kg), but we found no synergic effect between the antifungals (data not shown).

### **Fungal burden determination and histopathology**

The fungal burden was determined by recovering the yeast cells from the larvae infected with *C. albicans* or *C. krusei* and treated with fluconazole (12 mg/kg) or amphotericin B (4 mg/kg). The number of CFUs increased in larvae infected with both pathogens with the time of infection (figure 6). Treatment of larvae infected with *C. albicans* with fluconazole or amphotericin B almost cleared the infection (figure 6A). In larvae infected with *C. krusei*, amphotericin B reduced the fungal burden by 10-fold. Curiously, Fluconazole also reduced the initial fungal burden, although it did not have an effect after longer times (5 days, figure 6B).

To complement these studies, we performed histopathology of infected and treated larvae. *Candida albicans* (figure 7C and D) and *C. krusei* (figure 7K and L), were abundantly found both in yeast and filament forms. The antifungal treatment with fluconazole (12 mg/kg) in larvae infected with *C. albicans* or *C. krusei* decreased the number of yeasts. Moreover, the fungi were mainly found in defined structures surrounded by *G. mellonella* cells (figure E, F, M, N). Amphotericin B (4 mg/kg) had the same effect as fluconazole, although fewer yeast cells were found with this treatment (figure G, H, O, P). The antifungals did not have a different effect on larvae infected with *C. albicans* or *C. krusei*. Treatment with the antifungals alone did not have any effect on the histopathology of the larvae (result not shown).

**Effects of Amphotericin B and Fluconazol on the physiology of *G. mellonella* during *C. albicans* and *C. krusei* infection.**

Antifungals have immunomodulatory properties in mammals and in *G. mellonella* [50-52]. We studied the effects of Amphotericin B (4 mg/kg) and fluconazole (12 and 64 mg/kg) on haemocyte density, melanization and phagocytosis during *C. krusei* and *C. albicans* infection in *G. mellonella*. None of the antifungal treatments influenced the haemocyte density of *C. krusei* infected larvae. However Fluconazole (64 mg/kg) reduced the haemocyte density in larvae infected with *C. albicans* by two fold ( $p=0.017$ , figure 8A).

None of the antifungals had a significant effect on the melanization of larvae infected with *C. krusei*. In contrast, antifungal treatment of larvae infected with *C. albicans* reduced melanization after 24 hours of infection. Fluconazole (64 mg/kg) and amphotericin B (4 mg/kg) reduced the melanization of these larvae in 1.8 ( $p=0.0139$ ) and 1.5 times respectively ( $p=0.003$ , figure 8B). No differences were observed in melanization or phagocytosis after 3 hours of infection with *C. albicans* or *C. krusei*.

The antifungal drugs alone did not cause any effect in *G. mellonella* in the parameters analyzed.

### **Virulence and antifungal efficacy in *C. elegans* model**

The nematode *C. elegans* is another non mammalian model that has been used as host to study microbial virulence in this study. We also used this model to evaluate the *in vivo* protection of antifungals during *C. krusei* infection such as amphotericin B, fluconazole, caspofungin, and a combination of amphotericin B plus fluconazole. *Candida albicans* and *C. krusei* both killed *C. elegans* worms. In both *Candida* strains, worm death was associated with filamentation of the yeast in the worms (figure 9A). When we investigated the protection of the different antifungal treatment, we found that all the antifungals protected during *C. albicans* infection at all the concentrations tested (figure 9B). In contrast, in nematodes infected with *C. krusei*, the behavior of the antifungals was different: amphotericin B only protected at concentrations  $\geq 2$   $\mu\text{g/mL}$  and fluconazole was not protective at any of the concentrations used (figure 9C). Caspofungin showed a similar protection as the one observed when the worms were infected with *C. albicans* (figure 9C). The antifungal combination of fluconazole (12  $\mu\text{g/ml}$ ) and amphotericin B (1  $\mu\text{g/mL}$ ) did not show synergic effect in this model (figure 9D).

## **DISCUSSION**

The use of invertebrate hosts to study virulence of microbial pathogens presents advantages over conventional mammals. Amoebae, nematodes and insect hosts are good models to study virulence and to elucidate host–pathogen interaction. Ethical issues, cost and faster results are other benefits of these models [41,42,53]. During the evolution non vertebrate animals have developed immunity against

microbial pathogens [42], and for this reason there are functional and structural similarities between innate immune system of mammals and insects. So these models can be used to study immune responses [53].

In this work, we have used two different hosts, *G. mellonella* and *C. elegans*, to investigate virulence of *Candida krusei* and antifungal efficacy. *Galleria mellonella* allows the use of precise pathogen doses, low cost and evaluation of survival at different temperatures. The virulence of five *C. albicans* strains with mutations in genes related to filamentation was evaluated *in G. mellonella* and it was demonstrated that this model is useful as filamentation assay [49]. In the case of *C. neoformans*, the virulence of different isolates, morphogenesis and antifungal treatments in *G. mellonella* showed good correlation with mammalian system [53,54]. Previous work demonstrated that *C. elegans* is susceptible to different *Candida* species infection. For that reason, this animal host has been used for searching new chemical compounds with antifungal activity [44,46]. Besides, the available *C. elegans* mutant animals defective in signaling pathways involved in the immune system allows the study of the molecular mechanisms of host-pathogen interaction [55]. However, there are also some cases in which there are not a correlation between virulence in mammals and *G. mellonella* [56], so further studies are required to validate the use of these models. For these reasons, *C. krusei* offers a good model to validate the use of invertebrate models. This yeast shows reduced virulence in mammalian systems, so it is possible to compare its virulence with other highly virulent yeasts, such as *C. albicans*. Moreover, *C. krusei* is intrinsically resistant to fluconazole, so it offers an excellent model to correlate antifungal efficacy *in vitro* and *in vivo*.

Previous work showed that *G. mellonella* infected with  $2 \times 10^6$  cells/larva of *C. krusei* killed 20% of the larvae after 72 hrs [57]. In our work, we have reproduced the model and observed that larvae killing can be faster by increasing the pathogen

concentration. However, *C. krusei* was less than *C. albicans* virulent because the amount of yeast required to cause 100% death on the fourth day is 10 times higher. This is also in agreement with the reduced virulence of *C. krusei* in mammalian models [58,59], but also indicates that *G. mellonella* offers a simple method to study virulence traits of *C. krusei*. This finding is of particular interest, since not every microorganism (i.e., *Pneumocystis murina*) can cause disease in *G. mellonella* [60] .

The possibility to incubate *G. mellonella* at different temperatures is one of the best advantages of this model because it permits to study virulence at both environment and mammalian temperature. Virulence of some pathogenic microorganism (such as *Cryptococcus neoformans*, *Fusarium spp* and *Acinetobacter baumannii*) in *G. mellonella* is affected by the incubation temperature of the larvae after inoculation [61,62]. In contrast, no statistical difference in the virulence of *C. krusei* was observed between the two temperatures. This correlates with the growth rate of *C. krusei* at both temperatures. In contrast to *C. albicans*, *C. krusei* growth was less affected by the temperature. Interestingly, *G. mellonella* seems to better tolerate environmental temperature than physiological temperature, and it would be expected that immunity is impaired at high temperature. However, our data indicates that in the case of fungi with reduced virulence, immunity at high temperature can control infection, and virulence of the fungus is more dependent of virulence traits of the yeast. *Candida krusei* and *C. albicans* produced filaments in *G. mellonella*, although the morphology was different. *Candida krusei* tended to form cell aggregates with melanization, characteristic of encapsulation. This result indicates that *G. mellonella* differentially recognizes pathogenic yeasts, which can be related to the different virulence exhibited by these two *Candida* species.

Decrease in the amount of haemocytes has been associated with increased susceptibility to fungal infections. *Candida krusei* induced a reduction in the proportion

of haemocytes in a similar way as *C. albicans*. This result suggests a mechanism by which *Candida* species induce killing of *G. mellonella* (phagocytosis avoidance), but does not explain the difference in virulence shown by the different *Candida* spp. In agreement with our findings, in a study that compared the virulence of *C. albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*, it was observed that *C. albicans* induced a reduction in the concentration of haemocytes. In contrast, larvae infected with *S. cerevisiae* showed higher survival and haemocytic concentration [39]. Moreover, the compound [Ag2 (mal) (phen3)] increased the survival of larvae infected with *C. albicans*, and also increased the haemocytic concentration [63]. *Cryptococcus neoformans* produces an increase in the number of hemocytes in the first two hours post-infection but the concentration decreases over time [54,61]. Melanization is a humoral response manifested in the insect catalyzed by the enzyme phenoloxidase and the reaction occurs contact with microbes also during the process of formation of capsules that surround foreign particles [64]. We observed fast melanization process post infection with *C. krusei*. The degree of melanization depended on the inoculum concentration and dead *C. krusei* with 4% paraformaldehyde also induces the process but the survival was similar to PBS injected larvae, indicating that melanization is an unspecific process that depends on the presence of foreign particles.

One of the main findings of our work is the correlation between the *in vivo* efficacy of antifungals during *C. albicans* and *C. krusei* infection and their *in vitro* susceptibility profiles. Fluconazole did not have any protective effect during *C. krusei* infection in both *G. mellonella* and *C. elegans* models. Similar findings have been obtained with protection in immunosuppressed mice [58,65], which validates the use of non mammalian models to study antifungal activity. Due to the simplicity of these models, we believe that these hosts offer suitable and reliable systems to evaluate antifungal efficacy *in vivo*. In this sense, *C. elegans* has been successfully used to perform high-throughput assays to evaluate fungal susceptibility to different types of



compounds [46,66-68]. However, more information with resistant strains is required to fully validate their use. We also noticed differences in the protection between *C. albicans* and *C. krusei in vivo* after treatment with amphotericin B and caspofungin. During *C. krusei* infection, caspofungin and amphotericin B concentrations required for protection were always higher than during *C. albicans* infection. Although *C. krusei* is considered susceptible to amphotericin B and caspofungin, it has reduced susceptibility to these antifungals when compared to *C. albicans* [20,69,70], so our data is again in agreement with the different susceptibility profile shown by these species *in vitro*. While several articles suggest molecular mechanisms for the resistance to fluconazole exhibited by *C. krusei*, it is not known why this species is less susceptible to amphotericin B and caspofungin than *C. albicans*.

*Caenorhabditis elegans* model was also useful to test antifungal efficacy against several pathogenic fungi, including *Candida* spp and *Fusarium* spp [44,71]. We found very similar results with *C. elegans* model and these results are comparable with the ones found for *G. mellonella*. Despite the differences in the immune responses between nematodes and insects, *C. krusei* and *C. albicans* had similar virulence in both hosts. These results strongly support the use of these hosts as screening models. We believe that this difference between the behavior of the different yeast species in *G. mellonella* and *C. elegans* is the temperature at which the virulence experiments are performed, which is significantly lower in *C. elegans*. These findings are relevant, because indicate that virulence in mammals does not always correlate with virulence at environmental temperatures.

Understanding fungal pathogenesis and the antifungal discovery are key aspects in medical mycology. Non conventional models represent an important alternative for *in vivo* studies, even in the case of organisms that present low virulence in mammalian systems, such as *C. krusei*. Our results also demonstrate the feasibility

of non mammalian models to identify new antifungal compounds against resistant species.

**Acknowledgements:** We thank Raquel Pérez Tavárez for the histology experiments. O.Z. is funded by grant SAF2011-25140 from the Spanish Ministry for Economics and Competitiveness. Liliana Scorzoni is funded by a fellowship from the Agencia Española para la Cooperación Internacional y Desarrollo. *C. elegans* strain AU37 was provided by the CGC (Caenorhabditis Genetics Center), which is funded by NIH Office of Research Infrastructure Programs (P40 OD010440).

**Competing Interest.** In the past 5 years, M.C.-E. has received grant support from Astellas Pharma, bioMérieux, Gilead Sciences, Merck Sharp and Dohme, Pfizer, Schering Plough, Soria Melguizo SA, the European Union, the ALBAN program, the Spanish Agency for International Cooperation, the Spanish Ministry of Culture and Education, the Spanish Health Research Fund, the Instituto de Salud Carlos III, the Ramon Areces Foundation, the Mutua Madrileña Foundation. He has been an advisor/consultant to the Panamerican Health Organization, Gilead Sciences, Merck Sharp and Dohme, Pfizer, and Schering Plough. He has been paid for talks on behalf of Gilead Sciences, Merck Sharp and Dohme, Pfizer, and Schering Plough. The other authors have no conflicts of interest.

## REFERENCES

1. Pfaller MA, Diekema DJ (2007) Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* 20: 133-163.
2. Almirante B, Rodriguez D, Park BJ, Cuenca-Estrella M, Planes AM, et al. (2005) Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: results from population-based surveillance, barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol* 43: 1829-1835.
3. Chen S, Slavin M, Nguyen Q, Marriott D, Playford EG, et al. (2006) Active surveillance for candidemia, Australia. *Emerg Infect Dis* 12: 1508-1516.
4. Labelle AJ, Micek ST, Roubinian N, Kollef MH (2008) Treatment-related risk factors for hospital mortality in *Candida* bloodstream infections. *Crit Care Med* 36: 2967-2972.
5. Pfaller MA, Diekema DJ (2010) Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Crit Rev Microbiol* 36: 1-53.
6. Colombo AL, Tobón A, Restrepo A, Queiroz-Telles F, Nucci M (2011) Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. *Med Mycol* 49: 785-798.
7. Warnock DW (2006) Fungal diseases: an evolving public health challenge. *Med Mycol* 44: 697-705.
8. Shorr AF, Gupta V, Sun X, Johannes RS, Spalding J, et al. (2009) Burden of early-onset candidemia: analysis of culture-positive bloodstream infections from a large U.S. database. *Crit Care Med* 37: 2519-2526; quiz 2535.
9. Eggimann P, Garbino J, Pittet D (2003) Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infect Dis* 3: 685-702.
10. Colombo AL, Nucci M, Park BJ, Nouer SA, Arthington-Skaggs B, et al. (2006) Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *J Clin Microbiol* 44: 2816-2823.

11. Shao PL, Huang LM, Hsueh PR (2007) Recent advances and challenges in the treatment of invasive fungal infections. *Int J Antimicrob Agents* 30: 487-495.
12. Pemán J, Salavert M (2012) General epidemiology of invasive fungal disease. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 30: 90-98.
13. Arendrup MC (2010) Epidemiology of invasive candidiasis. *Curr Opin Crit Care* 16: 445-452.
14. Peman J, Canton E, Quindos G, Eraso E, Alcoba J, et al. (2012) Epidemiology, species distribution and in vitro antifungal susceptibility of fungaemia in a Spanish multicentre prospective survey. *J Antimicrob Chemother* 67: 1181-1187.
15. Trick WE, Fridkin SK, Edwards JR, Hajjeh RA, Gaynes RP (2002) Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989-1999. *Clin Infect Dis* 35: 627-630.
16. Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, Newell VA, Nagy E, et al. (2008) *Candida krusei*, a multidrug-resistant opportunistic fungal pathogen: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, 2001 to 2005. *J Clin Microbiol* 46: 515-521.
17. Horn DL, Neofytos D, Anaissie EJ, Fishman JA, Steinbach WJ, et al. (2009) Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. *Clin Infect Dis* 48: 1695-1703.
18. Miceli MH, Díaz JA, Lee SA (2011) Emerging opportunistic yeast infections. *Lancet Infect Dis* 11: 142-151.
19. Rodríguez-Tudela JL, Arendrup MC, Cuenca-Estrella M, Donnelly JP, Lass-Flörl C (2010) EUCAST breakpoints for antifungals. *Drug News Perspect* 23: 93-97.
20. Abbas J, Bodey GP, Hanna HA, Mardani M, Girgawy E, et al. (2000) *Candida krusei* fungemia. An escalating serious infection in immunocompromised patients. *Arch Intern Med* 160: 2659-2664.

21. Fukuoka T, Johnston DA, Winslow CA, de Groot MJ, Burt C, et al. (2003) Genetic basis for differential activities of fluconazole and voriconazole against *Candida krusei*. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 1213-1219.
22. Pappas PG, Rex JH, Sobel JD, Filler SG, Dismukes WE, et al. (2004) Guidelines for treatment of candidiasis. *Clin Infect Dis* 38: 161-189.
23. Spanakis EK, Aperis G, Mylonakis E (2006) New agents for the treatment of fungal infections: clinical efficacy and gaps in coverage. *Clin Infect Dis* 43: 1060-1068.
24. Venkateswarlu K, Denning DW, Manning NJ, Kelly SL (1996) Reduced accumulation of drug in *Candida krusei* accounts for itraconazole resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 40: 2443-2446.
25. Orozco AS, Higginbotham LM, Hitchcock CA, Parkinson T, Falconer D, et al. (1998) Mechanism of fluconazole resistance in *Candida krusei*. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 2645-2649.
26. Pemán J, Cantón E, Orero A, Viudes A, Frasquet J, et al. (2002) Epidemiology of candidemia in Spain - Multicenter study. *Rev Iberoam Micol* 19: 30-35.
27. Muñoz P, Sánchez-Somolinos M, Alcalá L, Rodríguez-Créixems M, Peláez T, et al. (2005) *Candida krusei* fungaemia: antifungal susceptibility and clinical presentation of an uncommon entity during 15 years in a single general hospital. *J Antimicrob Chemother* 55: 188-193.
28. Rogers TR (2006) Antifungal drug resistance: limited data, dramatic impact? *Int J Antimicrob Agents* 27 Suppl 1: 7-11.
29. Rodriguez-Tudela JL, Alcazar-Fuoli L, Cuesta I, Alastruey-Izquierdo A, Monzon A, et al. (2008) Clinical relevance of resistance to antifungals. *Int J Antimicrob Agents* 32 Suppl 2: S111-113.
30. Colombo AL, Ngai AL, Bourque M, Bradshaw SK, Strohmaier KM, et al. (2010) Caspofungin use in patients with invasive candidiasis caused by common non-

- albicans *Candida* species: review of the caspofungin database. *Antimicrob Agents Chemother* 54: 1864-1871.
31. Steenbergen JN, Shuman HA, Casadevall A (2001) *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 15245-15250.
  32. Steenbergen JN, Nosanchuk JD, Malliaris SD, Casadevall A (2003) *Cryptococcus neoformans* virulence is enhanced after growth in the genetically malleable host *Dictyostelium discoideum*. *Infect Immun* 71: 4862-4872.
  33. Mylonakis E, Ausubel FM, Perfect JR, Heitman J, Calderwood SB (2002) Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Cryptococcus neoformans* as a model of yeast pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 15675-15680.
  34. Glavis-Bloom J, Muhammed M, Mylonakis E (2012) Of model hosts and man: using *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* and *Galleria mellonella* as model hosts for infectious disease research. *Adv Exp Med Biol* 710: 11-17.
  35. Alarco AM, Marcil A, Chen J, Suter B, Thomas D, et al. (2004) Immune-deficient *Drosophila melanogaster*: a model for the innate immune response to human fungal pathogens. *J Immunol* 172: 5622-5628.
  36. Fallon AM, Sun D (2001) Exploration of mosquito immunity using cells in culture. *Insect Biochem Mol Biol* 31: 263-278.
  37. Boman HG, Hultmark D (1987) Cell-free immunity in insects. *Annu Rev Microbiol* 41: 103-126.
  38. Kavanagh K, Reeves EP (2004) Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens. *FEMS Microbiol Rev* 28: 101-112.
  39. Bergin D, Brennan M, Kavanagh K (2003) Fluctuations in haemocyte density and microbial load may be used as indicators of fungal pathogenicity in larvae of *Galleria mellonella*. *Microbes Infect* 5: 1389-1395.

40. Fuchs BB, O'Brien E, Khoury JB, Mylonakis E (2010) Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. *Virulence* 1: 475-482.
41. Desalermos A, Fuchs BB, Mylonakis E (2012) Selecting an invertebrate model host for the study of fungal pathogenesis. *PLoS Pathog* 8: e1002451.
42. Fuchs BB, Mylonakis E (2006) Using non-mammalian hosts to study fungal virulence and host defense. *Curr Opin Microbiol* 9: 346-351.
43. Mahajan-Miklos S, Tan MW, Rahme LG, Ausubel FM (1999) Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa*-*Caenorhabditis elegans* pathogenesis model. *Cell* 96: 47-56.
44. Breger J, Fuchs BB, Aperis G, Moy TI, Ausubel FM, et al. (2007) Antifungal chemical compounds identified using a *C. elegans* pathogenicity assay. *PLoS Pathog* 3: e18.
45. Tampakakis E, Okoli I, Mylonakis E (2008) A *C. elegans*-based, whole animal, in vivo screen for the identification of antifungal compounds. *Nat Protoc* 3: 1925-1931.
46. Okoli I, Coleman JJ, Tampakakis E, Tampakakis E, An WF, et al. (2009) Identification of antifungal compounds active against *Candida albicans* using an improved high-throughput *Caenorhabditis elegans* assay. *PLoS One* 4: e7025.
47. Gillum AM, Tsay EY, Kirsch DR (1984) Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations. *Mol Gen Genet* 198: 179-182.
48. Sulston J, Hodgkin J (1988) The Nematode *Caenorhabditis elegans*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
49. Fuchs BB, Eby J, Nobile CJ, El Khoury JB, Mitchell AP, et al. (2010) Role of filamentation in *Galleria mellonella* killing by *Candida albicans*. *Microbes Infect* 12: 488-496.

50. Ben-Ami R, Lewis RE, Kontoyiannis DP (2008) Immunocompromised hosts: immunopharmacology of modern antifungals. *Clin Infect Dis* 47: 226-235.
51. Kelly J, Kavanagh K (2011) Caspofungin primes the immune response of the larvae of *Galleria mellonella* and induces a non-specific antimicrobial response. *J Med Microbiol* 60: 189-196.
52. Mesa-Arango AC, Scorzoni L, Zaragoza O (2012) It only takes one to do many jobs: Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug. *Frontiers in Microbiology* 3: 286.
53. Mylonakis E, Casadevall A, Ausubel FM (2007) Exploiting amoeboid and non-vertebrate animal model systems to study the virulence of human pathogenic fungi. *PLoS Pathog* 3: e101.
54. García-Rodas R, Casadevall A, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M, Zaragoza O (2011) *Cryptococcus neoformans* capsular enlargement and cellular gigantism during *Galleria mellonella* infection. *PLoS One* 6: e24485.
55. Pukkila-Worley R, Ausubel FM, Mylonakis E (2011) *Candida albicans* infection of *Caenorhabditis elegans* induces antifungal immune defenses. *PLoS Pathog* 7: e1002074.
56. Jackson JC, Higgins LA, Lin X (2009) Conidiation color mutants of *Aspergillus fumigatus* are highly pathogenic to the heterologous insect host *Galleria mellonella*. *PLoS One* 4: e4224.
57. Cotter G, Doyle S, Kavanagh K (2000) Development of an insect model for the in vivo pathogenicity testing of yeasts. *FEMS Immunol Med Microbiol* 27: 163-169.
58. Karyotakis NC, Anaissie EJ, Hachem R, Dignani MC, Samonis G (1993) Comparison of the efficacy of polyenes and triazoles against hematogenous *Candida krusei* infection in neutropenic mice. *J Infect Dis* 168: 1311-1313.
59. Majithiya J, Sharp A, Parmar A, Denning DW, Warn PA (2009) Efficacy of isavuconazole, voriconazole and fluconazole in temporarily neutropenic murine



- models of disseminated *Candida tropicalis* and *Candida krusei*. J Antimicrob Chemother 63: 161-166.
60. Fuchs BB, Bishop LR, Kovacs JA, Mylonakis E (2011) *Galleria mellonella* are resistant to *Pneumocystis murina* infection. Mycopathologia 171: 273-277.
61. Mylonakis E, Moreno R, El Khoury JB, Idnurm A, Heitman J, et al. (2005) *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. Infect Immun 73: 3842-3850.
62. Coleman JJ, Muhammed M, Kasperkovitz PV, Vyas JM, Mylonakis E (2011) *Fusarium* pathogenesis investigated using *Galleria mellonella* as a heterologous host. Fungal Biol 115: 1279-1289.
63. Rowan R, Moran C, McCann M, Kavanagh K (2009) Use of *Galleria mellonella* larvae to evaluate the in vivo anti-fungal activity of [Ag<sub>2</sub>(mal)(phen)<sub>3</sub>]. Biometals 22: 461-467.
64. Bidla G, Hauling T, Dushay MS, Theopold U (2009) Activation of insect phenoloxidase after injury: endogenous versus foreign elicitors. J Innate Immun 1: 301-308.
65. Anaissie EJ, Karyotakis NC, Hachem R, Dignani MC, Rex JH, et al. (1994) Correlation between in vitro and in vivo activity of antifungal agents against *Candida* species. J Infect Dis 170: 384-389.
66. Coleman JJ, Ghosh S, Okoli I, Mylonakis E (2011) Antifungal activity of microbial secondary metabolites. PLoS One 6: e25321.
67. Desalermos A, Muhammed M, Glavis-Bloom J, Mylonakis E (2011) Using *C. elegans* for antimicrobial drug discovery. Expert Opin Drug Discov 6: 645-652.
68. Coleman JJ, Okoli I, Tegos GP, Holson EB, Wagner FF, et al. (2010) Characterization of plant-derived saponin natural products against *Candida albicans*. ACS Chem Biol 5: 321-332.

69. Drago M, Scaltrito MM, Morace G (2004) In vitro activity of voriconazole and other antifungal agents against clinical isolates of *Candida glabrata* and *Candida krusei*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 23: 619-624.
70. Munoz P, Sanchez-Somolinos M, Alcalá L, Rodríguez-Creixems M, Peláez T, et al. (2005) *Candida krusei* fungaemia: antifungal susceptibility and clinical presentation of an uncommon entity during 15 years in a single general hospital. J Antimicrob Chemother 55: 188-193.
71. Muhammed M, Fuchs BB, Wu MP, Breger J, Coleman JJ, et al. (2012) The role of mycelium production and a MAPK-mediated immune response in the *C. elegans-Fusarium* model system. Med Mycol 50: 488-496.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1:** Comparison of the virulence of *C. krusei* and *C. albicans* in *G. mellonella*. **(A)** Survival curve of *G. mellonella* infected with different inocula of *C. krusei* ATCC 6258 • PBS; ■  $10^7$  cells/larvae; ▲  $5 \times 10^6$  cells/larvae; ▼  $2.5 \times 10^6$  cells/larvae incubated at  $37^\circ\text{C}$  **(B)**. Survival curve of *G. mellonella* infected with different inocula of *C. albicans* SC5314 • PBS; ■  $10^6$  cells/larvae; ▲  $5 \times 10^5$  cells/larvae; ▼  $10^5$  cells/larvae **(C)** Survival of *G. mellonella* infected with inactivated yeast. Control dead cells • PBS; ■ *C. krusei* ATCC 6258  $5 \times 10^6$  cells/larvae; ▲ *C. krusei* ATCC 6258  $5 \times 10^6$  cells/larvae(dead); ▼ *C. albicans* SC5314  $10^6$  cells/larvae; ◆ *C. albicans* SC5314  $10^6$  cells/larvae(dead) **(D)**; Effect of the incubation temperature on the virulence of *C. albicans* and *C. krusei*. PBS; ▲ *C. krusei* ATCC 6258 ( $37^\circ\text{C}$ ); ▼ *C. krusei* ATCC 6258 ( $30^\circ\text{C}$ ); ◆ *C. albicans* SC5314 ( $37^\circ\text{C}$ ); ■ *C. albicans* SC5314 ( $30^\circ\text{C}$ ); **(E and F)**. Growth curves of *C. albicans* (E) and *C. krusei* (F) at different temperatures. ○  $37^\circ\text{C}$ ; ▲  $30^\circ\text{C}$

**Figure 2:** Melanization of *G. mellonella* infected with *C. krusei* ATCC 6258. **(A)** Visual appearance of *G. mellonella* larvae infected with different *C. krusei* doses. (B, C and D) Optical Density (O.D) of the haemolymph of *G. mellonella* infected with *C. krusei* ATCC 6258 **(B)**, CL8053 **(C)** and CL80317 **(D)** clinical isolated with  $5 \times 10^5$ ,  $10^6$ ,  $5 \times 10^6$  cells/larvae. The different size inoculum reveals dose-response melanization (\*  $p < 0.05$ ).

**Figure 3:** Interaction between *C. krusei* and haemocytes. **(A)** Changes in haemocyte density during *C. krusei* infection. The haemolymph of infected larvae with *C. neoformans*, *C. albicans* SC5314, *C. krusei* ATCC 6258, CL8053 and CL80317 clinical isolates and PBS was collected and the concentration of haemocytes was estimated using a haemocytometer **(B)**. Phagocytosis percentage of *C. neoformans*, *C. albicans* SC5314, *C. krusei* ATCC 6258, CL8053 and CL80317 clinical isolates.

**Figure 4:** Effect of fluconazole during infection of  $5 \times 10^6$  cells/larvae of *C. krusei* (**A and B**) and  $5 \times 10^5$  cells/larvae of *C. albicans* (**C and D**) in *G. mellonella*. Fluconazole treatment with 4, 12 mg/kg, (**A and C**); 32, 64, 128 mg/kg (**B and D**).

**Figure 5: Efficacy of AmB and Caspofungin during *C. krusei* infection in *G. mellonella*.** Amphotericin B treatment efficacy (1, 2, 4 mg/kg) in *G. mellonella* infected with *C. albicans* SC5314 (**A**) or *Candida krusei* ATCC 6258 (**B**). Caspofungin treatment efficacy (1, 2, 4 mg/kg) in *G. mellonella* infected with *C. albicans* SC5314 (**C**) or *Candida krusei* ATCC 6258 (**D**).

**Figure 6:** Effect of antifungal treatment on fungal burden in *G. mellonella* during *C. krusei* ( $5 \times 10^6$  cells/larvae) and *C. albicans* ( $5 \times 10^5$  cells/larvae) infection CFU recovered from *G. mellonella* infected with *C. albicans* (**A**) or *C. krusei* (**B**). Black bars, no treatment, white bars, Fluconazole (12 mg/kg), grey bars, Amphotericin B (4 mg/kg).

**Figure 7:** Histopathology of *G. mellonella* infected with *C. krusei* and *C. albicans* and treated with different antifungals. *G. mellonella* was infected with  $5 \times 10^6$  cells/larvae of *C. albicans* (**C-H**), or with  $5 \times 10^6$  cells/larvae of *C. krusei* (**K-P**). After 96 of infection, larvae were processed for histopathology as described in Material and Methods. (**A, B, I, J**), uninfected controls; (**C, D, K and L**), untreated controls; (**E, F, M and N**), larvae treated with fluconazole (12 mg/kg); (**G, H, O and P**), larvae treated with AmB (4 mg/kg). (**A, C, E, G, I, K, M, O**), low magnification; (**B, D, F, H, J, L, N and P**), high magnification.

**Figure 8: (A)** Hemocytic density of *G. mellonella* infected with *C. albicans* or *C. krusei* treated with Amphotericin B (4 mg/kg) with or Fluconazole (64 mg/kg). **(B)** Optical Density (O.D) of the haemolymph of *G. mellonella* infected with *C. albicans* or *C. krusei*; treated with Amphotericin B (4 mg/kg) or with Fluconazole (64 mg/kg). Black bars, no treatment, grey bars, Fluconazole, white bars, Amphotericin B. \*  $p < 0.05$ .

**Figure 9:** Virulence of *C. krusei* and *C. albicans* in *C. elegans* and antifungal efficacy. *Caenorhabditis elegans* was infected as described in material and methods with *C. krusei*, *C. albicans* and *E.coli* OP50. A) Visual appearance of infected worms (50x magnification). B) Antifungal efficacy in *C. elegans* infected with *C. albicans* ♦ OP50, ● *C. albicans*, ■ *C. albicans* treated with Amphotericin B 2 µg/mL ( $p < 0.0001$ ) ▲ Fluconazole 12µg/mL ( $p < 0.0001$ ); ▼ Caspofungin 2 µg/mL ( $p < 0.0001$ ). C) Antifungal efficacy during *C. krusei* infection ♦ OP50, ● *C. krusei* ■ *C. krusei* treated with Amphotericin B 2 µg/mL; ( $p < 0.0001$ ) ▲ Fluconazole 12µg/mL ( $p = 0.1207$ ); ▼ Caspofungin 2 µg/mL ( $p < 0.0001$ ). D) Efficacy of antifungal combination in survival of *C. elegans* worms infected with *C. krusei* ● *C. krusei*; ■ Fluconazole 12µg/mL ( $p = 0.5585$ ) and ▲ Fluconazole 12µg/mL plus Amphotericin B 1 µg/mL ( $p = 0.1147$ ).

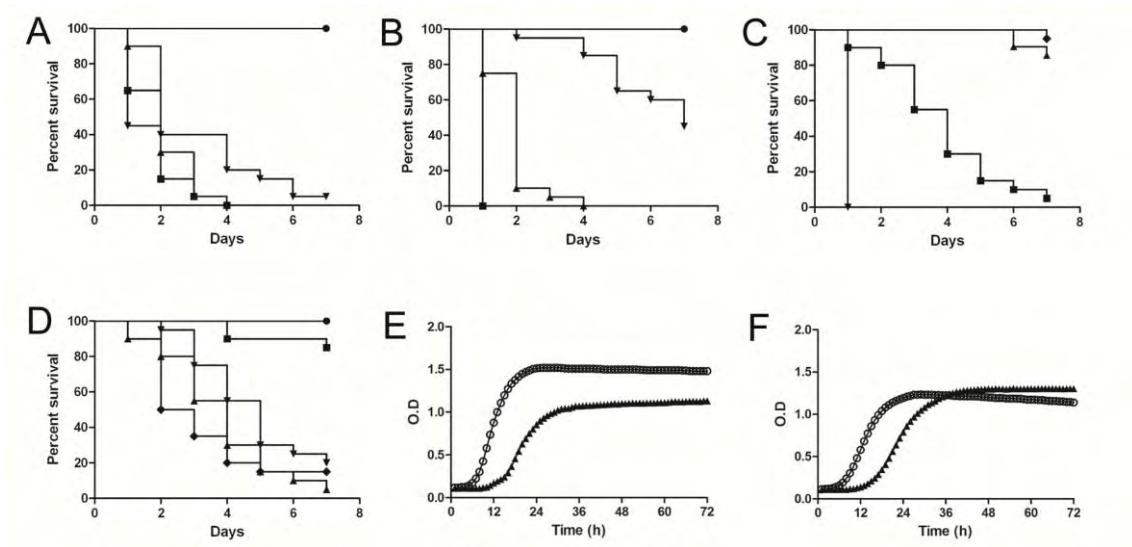


Figure 1.

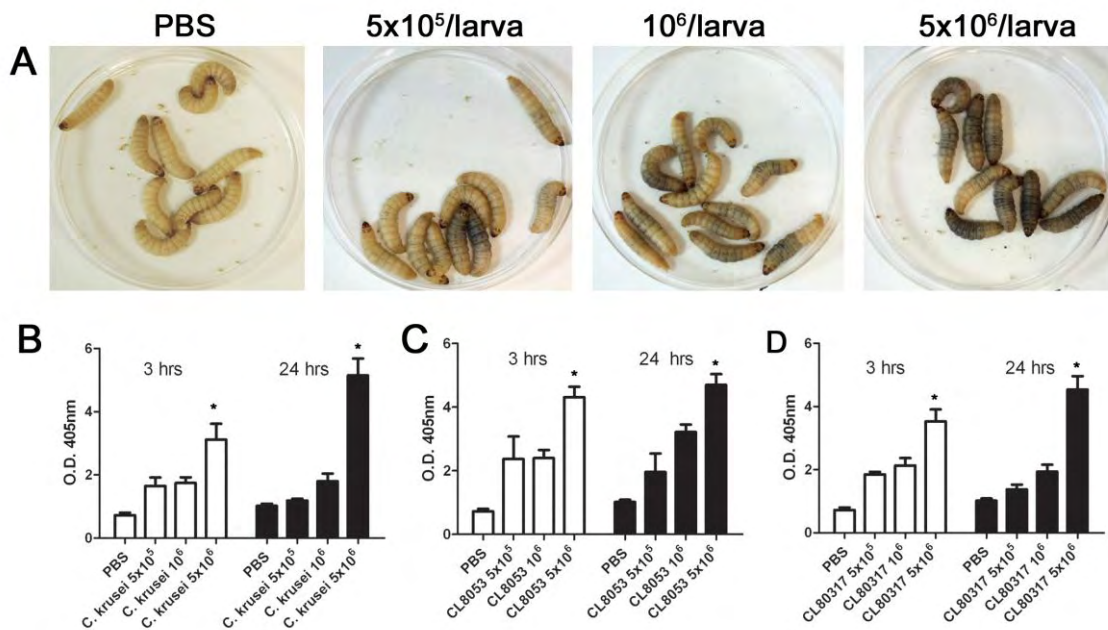


Figure 2.

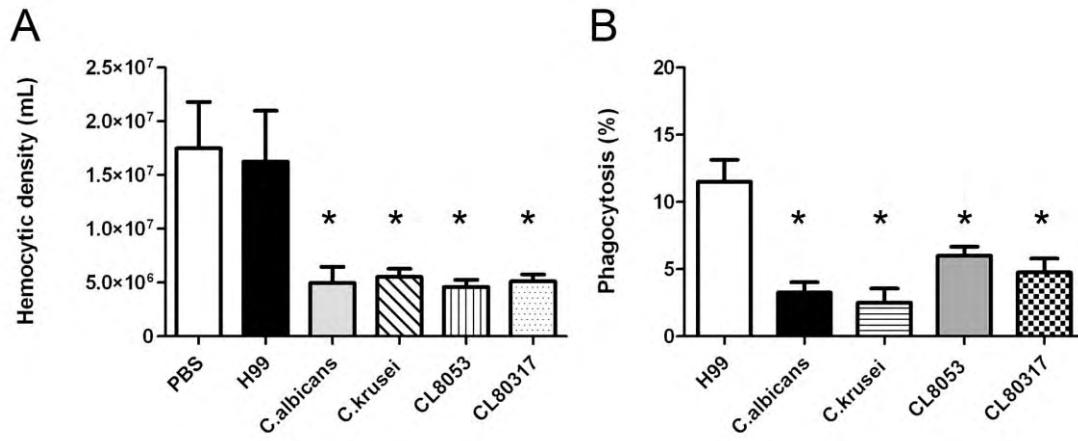


Figure 3.

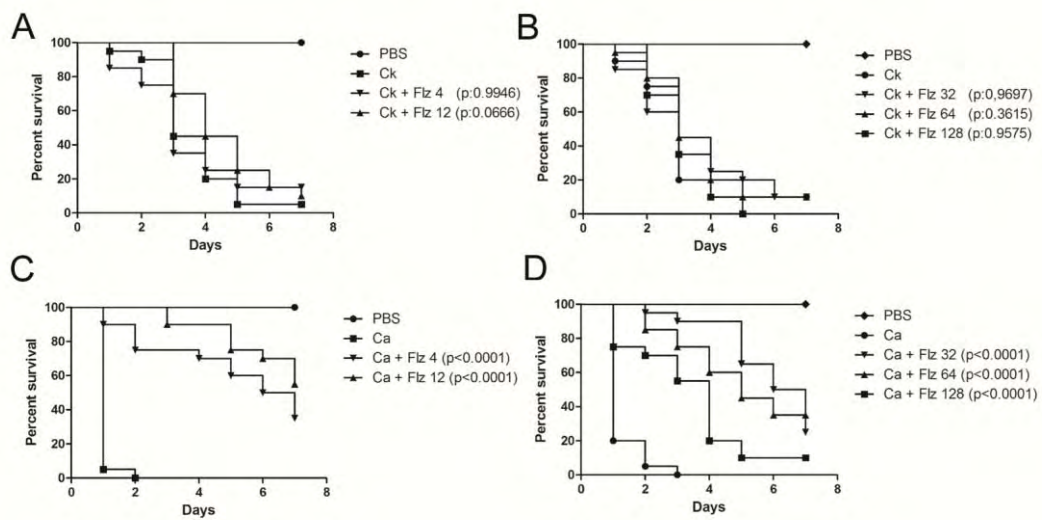


Figure 4.

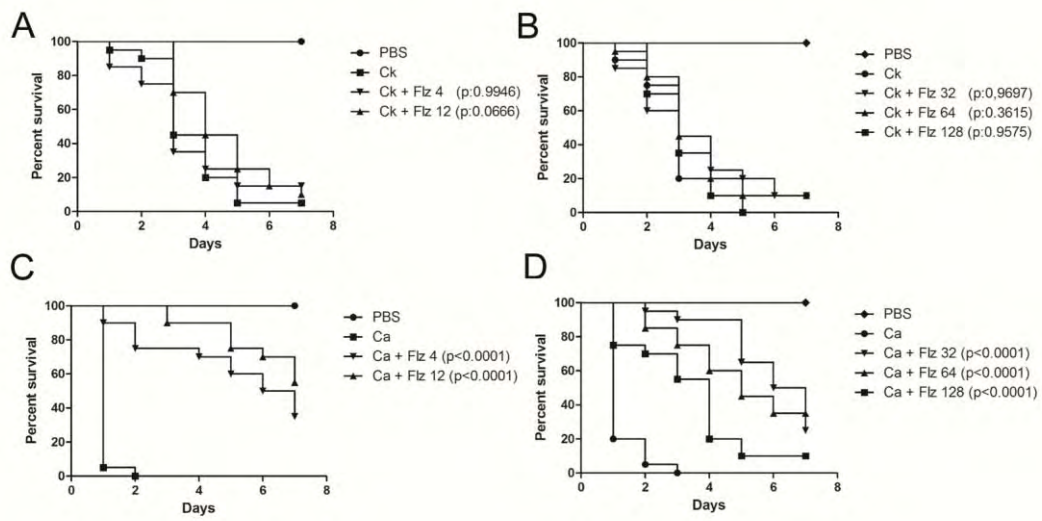


Figure 5.

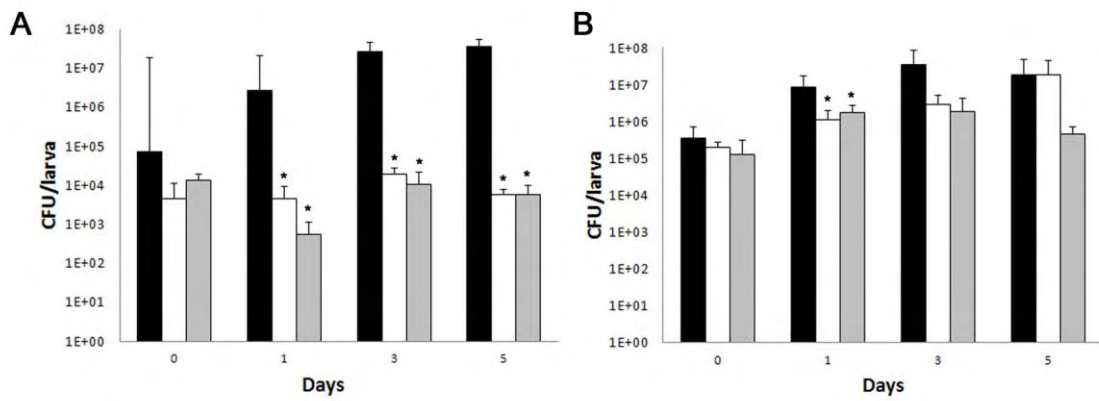


Figure 6.



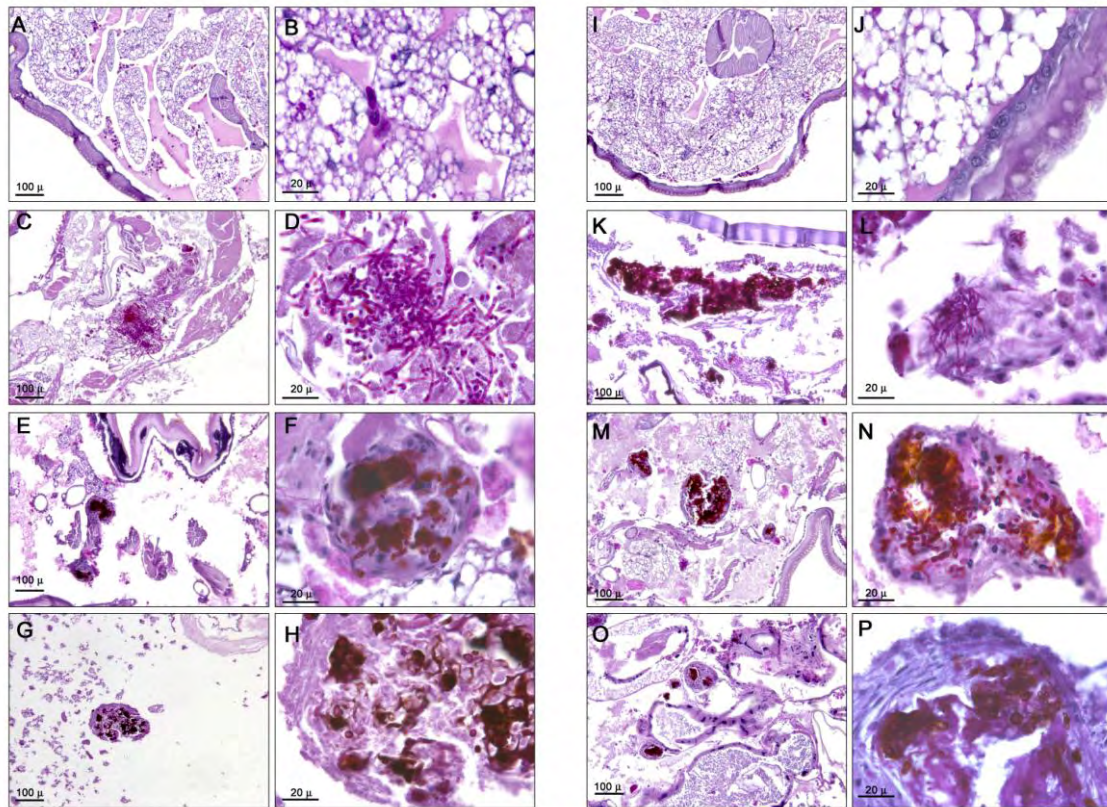


Figure 7.

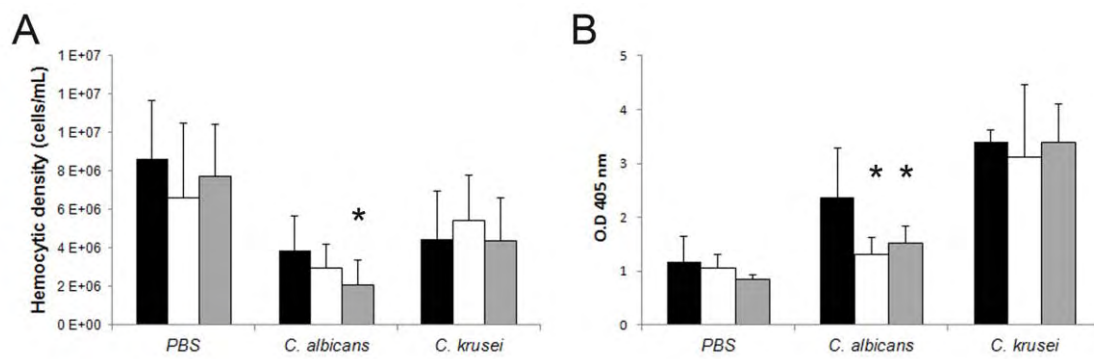


Figure 8.

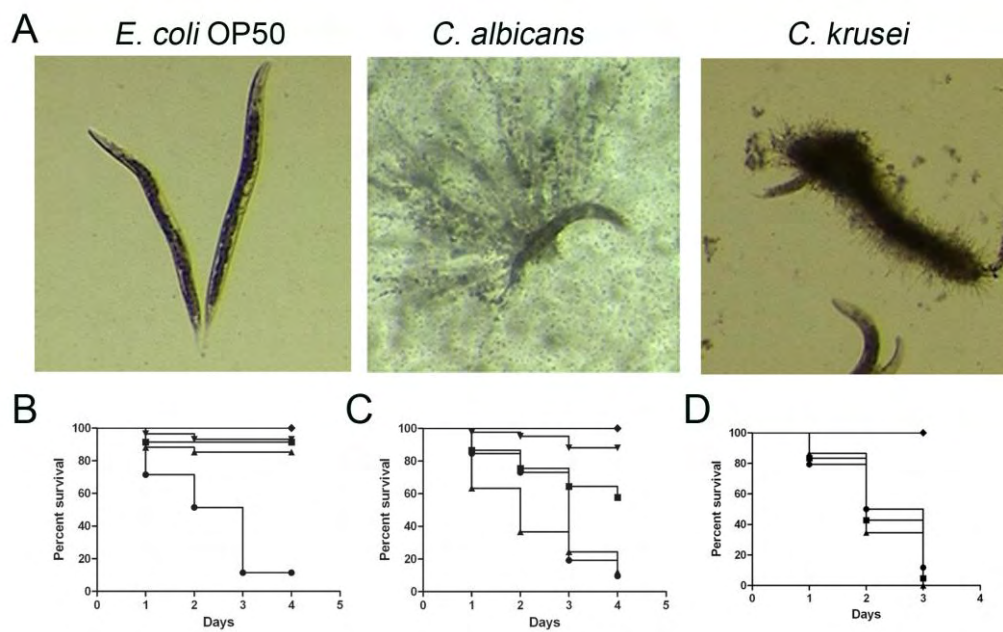


Figure 9.