



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

MARCELO TEMPESTA DE OLIVEIRA

**TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Candida* spp VIA  
*Agrobacterium tumefaciens***

---

Londrina  
2007

**MARCELO TEMPESTA DE OLIVEIRA**

**TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA DE *Candida* spp VIA  
*Agrobacterium tumefaciens***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito final para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Cristina Furlaneto

Londrina  
2007

*Dedico:*

*...À Minha mãe Sueli, meu maior orgulho, meu  
maior amor...*

*...Por me ver com os olhos de Deus,  
por me amar com o amor de Deus,  
por me abençoar, com a bênção de Deus...*

## AGRADECIMENTOS

No período de desenvolvimento deste projeto, muitos fatores me levaram a concluir que o laboratório, muito mais que um ambiente de trabalho, foi um lar. Nele, além de descobrir o ilimitado mundo do conhecimento, percebi mais uma vez o quanto sou iluminado pela convivência com pessoas maravilhosas, que além de contribuírem profissionalmente, me agradeceram com as suas amizades. Portanto, é com enorme carinho que expresso meus agradecimentos:

À professora Dra. Márcia Cristina Furlaneto, orientadora deste trabalho, pela confiança, paciência, dedicação e respeito para comigo, no decorrer desta orientação, ao transmitir seus conhecimentos e experiência. Acima de tudo, por ter me recebido no laboratório como um filho e pela amizade firmada neste período.

À professora Dra. Luciana Furlaneto Maia, minha primeira orientadora, sem a qual eu não teria decidido traçar o extraordinário caminho da investigação científica. Por todos os ensinamentos profissionais, lições de vida e principalmente pela peculiar implicação, que alimenta a chama da busca por sempre mais conhecimento para novas discussões. Obrigado pela luz de sua pessoa.

Aos amigos de laboratório da geração passada: Rubens Duarte, Cláudia de Paula, Ivan Lima, Ariane Donatti, Bruno Dias, Ângelo Laranjeira, Daniel Silva e Ariane Costa, por me receberem como uma família, com carinho, atenção e respeito. Pelos momentos agradáveis compartilhados, pelos ensinamentos, auxílios e sugestões críticas nos experimentos, assim como todas as viagens filosóficas em que nos perdíamos prazerosamente.

Aos amigos de laboratório da geração presente e dos laboratórios vizinhos: Ana Flávia, Daniel Favero, Juliana Rota, Leandro, Luis Gustavo, Manú, Viviane... ..Cadu, Carla, Daniele, Fram, Paty, Guga, Jaque, Juliana, Julie, Karen, Lara, Lígia, Luiz Rodrigo, Mateus, Marla, Mila, Thiago, Yuldi. Por toda a convivência em momentos de trabalho e lazer, assim como pelas reflexões científicas e de vida. Obrigado mais uma vez por me agüentarem... E me enriquecer com a amizade de vocês.

À amiga Claci, por toda ajuda no laboratório, proporcionando não só melhores e fundamentais condições de trabalho, mas também muita alegria e ritmo de festa a todos.

Às professoras Dra. Maria Angélica E. Watanabe e Dra. Maria Helena P. Fungaro, pela disponibilidade de equipamentos e materiais de seus laboratórios, assim como toda a amizade.

Aos amigos e companheiros de trabalho do laboratório de Microscopia: Juca, Maria Amália, Oswaldo, por todos os momentos, pela ajuda, atenção e carinho. E principalmente à admirável amiga e professora Célia Guadalupe Tardeli de Jesus Andrade, por ser esta pessoa extraordinária, a qual além de lições de vida me ensinou a visualizar que o mundo do conhecimento é bem maior do que eu pensava.

Aos amigos de turma do mestrado em Microbiologia, os quais eu nunca esquecerei.

Aos professores do curso de pós-graduação em Microbiologia, pela formação profissional e amizade.

Aos funcionários da secretaria de Pós-Graduação em Microbiologia, do Interlaboratório e do Hospital das Clínicas da UEL.

À todas as amizades estabelecidas no período deste trabalho

À todos que de alguma forma contribuíram para a concretização deste trabalho.

*Aos meus eternos amigos e familiares, pela compreensão dos momentos de ausência, pela segurança e felicidade que a existência de vocês me traz...*

***Obrigado por tudo!!!***

*“Todo grande progresso da ciência resultou de uma nova audácia da imaginação.”*

**John Dewey**

*“...Bom mesmo é ir a luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, porque o mundo pertence a quem se atreve, e a vida é muito para ser insignificante.”*

**Charles**

**Chaplin**

*“Ainda pior que a convicção do não e a incerteza do talvez é a  
desilusão de um quase. É o quase que me incomoda, que me entristece, que me mata  
trazendo tudo que poderia ter sido e não foi... ...Gaste mais horas realizando que sonhando,  
fazendo que planejando,  
vivendo que esperando porque, embora quem quase morre esteja vivo,  
quem quase vive já morreu.”*

**Luiz Fernando**

**Veríssimo**

*“Temos que aprender a nos desvincular do concreto e convencional, e começarmos uma  
relação mais íntima com o abstrato, sem timidez ou medo do desconhecido. Pois as grandes  
descobertas futuras serão oriundas da atitude profunda de realmente sentir.”*

**Marcelo Tempesta de Oliveira**

***“...seja feita a Vossa vontade...”***

OLIVEIRA, Marcelo Tempesta de. **Transformação genética de *Candida* spp via *Agrobacterium tumefaciens***. 2007. 94f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

## RESUMO

Este trabalho descreve o estabelecimento de um sistema de transformação eficiente para as espécies de leveduras oportunistas *Candida albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*, importantes patógenos humanos, pelo emprego da metodologia de transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. As células fúngicas foram transformadas em diferentes condições de co-cultivo utilizando o vetor binário pBTS-4, que contém o gene de resistência ao antibiótico Higromicina B (*hph*) como marcador de seleção. Nossos resultados indicam uma frequência de transformação para *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* de até 1471, 1612 e 83 transformantes obtidos por co-cultivo, respectivamente. Após quatro repiques em meio não seletivo, todos os transformantes analisados cresceram quando expostos novamente ao meio de seleção, sendo desta forma 100% estáveis mitoticamente. A PCR e o dot-blot confirmaram molecularmente a transformação das espécies de *Candida*, gerando o produto de amplificação esperado de 600pb, e hibridado positivamente com os transformantes quando o mesmo foi utilizado como sonda. A habilidade da linhagem AGL-1 em aderir às células fúngicas nas condições de co-cultivo foi observada através do emprego de microscopia eletrônica de varredura e transmissão. A reprodutibilidade do sistema de transformação descrito neste trabalho pode fornecer um método para a manipulação genética destes patógenos que irá facilitar a análise molecular detalhada destas espécies fúngicas.

**Palavras-chaves:** *Candida albicans*. *Candida tropicalis*. *Candida glabrata*. *Agrobacterium tumefaciens*. Transformação genética. Higromicina B.

OLIVEIRA, Marcelo Tempesta de. **Transformação genética de *Candida* spp via *Agrobacterium tumefaciens***. 2007. 94f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

### ABSTRACT

This paper describes the establishment of an efficient transformation system for the opportunistic yeasts species *C. albicans*, *C. tropicalis* and *C. glabrata*, by the employment the *Agrobacterium*-mediated transformation method (AMT). Yeast cells were transformed to hygromycin B resistance using the binary vector pBTS4 carrying a hygromycin B resistance gene (*hph*) as a selection marker under different co-cultivation conditions. Overall, our data indicate a transformation frequency of up to 1472, 1612 and 83 transformants/co-cultivation for *C. albicans*, *C. tropicalis* and *C. glabrata*, respectively. Following 4 serial passages of transformants on non-selective medium, 100% of the transformants were found to be mitotically stable for the selection mark. PCR and dot-blot targeted at a 600 bp fragment from *hph* gene confirmed the transformation of *Candida* species. The ability of *Agrobacterium* strain AGL-1 to attach to *Candida* cells under co-cultivation was analysed under scanning and transmission electron microscopy. The reproducible transformation system described in this work may provide a method for the genetic manipulation of these pathogens, which will facilitate detailed molecular analysis of these fungal species.

**Keywords:** *Candida albicans*. *Candida tropicalis*. *Candida glabrata*. *Agrobacterium tumefaciens*. Genetic transformation. Hygromycin B.

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Transformação de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* via *A. tumefaciens* em co-cultivo realizado à 28°C..... 42
- Tabela 2** – Transformação de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* via *A. tumefaciens* em co-cultivo realizado à 24°C..... 42

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Esquema simplificado ilustrando algumas das etapas do mecanismo de transferência do T-DNA de *A. tumefaciens* para células vegetais..... 27
- Figura 2** – Ilustração da linhagem bacteriana e do sistema binário empregado na transformação de *Candida* spp. a) Linhagem AGL-1 de *A. tumefaciens* contendo o sistema binário. b) Componentes do sistema binário. c) Vetor binário pBTS-4 ..... 35
- Figura 3** – Confirmação da presença do produto de amplificação de 600 pb, correspondente à parte do gene *hph*, dos transformantes de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* por PCR. M) Padrão de peso molecular (100 pb). CP) Controle positivo. S) Linhagens selvagens (Ca5'; C<sub>3</sub> e C<sub>6</sub>). 1, 2 e 3) Transformantes de *C. albicans*. 4, 5 e 6) Transformantes de *C. tropicalis*. 7, 8 e 9) Transformantes de *C. glabrata* ..... 50
- Figura 4** – Análise de Dot-blot para a confirmação da presença do gene *hph*, hibridizado com a sonda correspondente a um fragmento do gene *hph* (produto de PCR), das linhagens selvagens e dos transformantes de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*. a) Linhagem selvagem (S) e transformantes de *C. albicans* (1 a 9). b) Linhagem selvagem (S) e transformantes de *C. tropicalis* (1 a 9). c) Linhagem selvagem (S) e transformantes de *C. glabrata* (1 a 9)..... 50
- Figura 5** – Eletromicrografia de varredura do par *Agrobacterium-Candida* em co-cultivo. a) Células de *C. albicans* e *Agrobacterium* em co-cultivo a 28°C envolvidas por rede de matriz extracelular (biofilme). b) Células de *C. tropicalis* e *Agrobacterium* em co-cultivo a 28°C envolvidas por rede de matriz extracelular (biofilme) ..... 51
- Figura 6** – Eletromicrografia de varredura do par *Agrobacterium-Candida* em co-cultivo a 28°C. a-b-e) Contato direto entre células de *C. glabrata* e *Agrobacterium*. c) Presença de filamentos irregulares e aglomerados amorfos de matriz extracelular entre *C. albicans* e *Agrobacterium*. d) Contato direto entre células de *C. tropicalis* e *Agrobacterium*. f) Presença de filamentos irregulares de matriz extracelular entre *C. glabrata* e *Agrobacterium*..... 52

**Figura 7** – Eletromicrografia de transmissão da interação do par *Agrobacterium-Candida* em co-cultivo a 28°C. a, b) Mesma eletromicrografia mostrando o contato direto entre células de *C. albicans* (*Ca*) e *A. tumefaciens* (*At*) em aumentos de 46.000X e 96.000X, respectivamente. c) Contato direto entre células de *C. tropicalis* e *A. tumefaciens* em aumento de 18.500X. d, e, f) Mesma eletromicrografia mostrando o contato direto entre células de *C. tropicalis* e *A. tumefaciens* em aumentos de 37.000X, 135.000X e 310.000X, respectivamente ..... 52

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	14
2.1 <i>CANDIDA SPP</i> – DE COMENSAL À PATÓGENO .....	14
2.2 EPIDEMIOLOGIA DAS ESPÉCIES DO GÊNERO <i>CANDIDA</i> .....	16
2.3 GÊNERO <i>CANDIDA</i> – SENSIBILIDADE, TOLERÂNCIA E RESISTÊNCIA A ANTIFÚNGICOS.....	18
2.4 GÊNERO <i>CANDIDA</i> – SENSIBILIDADE, TOLERÂNCIA E RESISTÊNCIA A ANTIFÚNGICOS.....	19
2.5 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA .....	21
2.5.1 Metodologias de transformação Genética para Leveduras.....	21
2.5.2 Transformação Genética de Espécies do Gênero <i>Candida</i> .....	25
2.5.3 Transformação Genética mediada por <i>Agrobacterium Tumefaciens</i> .....	26
2.5.3.1 Mecanismo de transferência do T-DNA a partir de modelos vegetais.....	27
2.5.3.2 Expressão e função dos genes <i>vir</i> baseado em modelos vegetais.....	29
2.5.4 <i>Agrobacterium Tumefaciens</i> como Ferramenta de transformação Genética.....	32
2.5.5 Transformação Genética de Leveduras via <i>Agrobacterium Tumefaciens</i> .....	33
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	35
3.1 AMOSTRAS DE <i>CANDIDA SPP</i> , LINHAGEM BACTERIANA E VETOR BINÁRIO.....	35
3.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DE HIGROMICINA PARA O CRESCIMENTO DE ESPÉCIES DO GÊNERO <i>CANDIDA</i> .....	36
3.3 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA MEDIADA POR <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i> : PROCESSAMENTO DAS CÉLULAS FÚNGICAS, BACTERIANA E CO-CULTIVO .....	36
3.4 CONFIRMAÇÃO FENOTÍPICA, ANÁLISE DA ESTABILIDADE MITÓTICA E NÍVEL DE RESISTÊNCIA À HIGROMICINA B DOS TRANSFORMANTES DE ESPÉCIES DO GÊNERO <i>CANDIDA</i> .....	37
3.5 ANÁLISE MOLECULAR DOS TRANSFORMANTES DE <i>C. ALBICANS</i> , <i>C. TROPICALIS</i> E <i>C.</i> <i>GLABRATA</i> .....	38
3.6 ANÁLISE DOS CO-CULTIVOS EMPREGANDO MICROSCOPIA ELETRÔNICA .....	39
3.6.1 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	39
3.6.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	40

<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	41
4.1 TRANSFORMAÇÃO DE ESPÉCIES DO GÊNERO <i>CANDIDA</i> MEDIADA POR <i>AGROBACTERIUM</i> <i>TUMEFACIENS</i> .....	41
4.2 ANÁLISE MOLECULAR DOS TRANSFORMANTES .....	49
4.3 ANÁLISE DO CO-CULTIVO ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA .....	50
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	53
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	54
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	55
<b>ARTIGO:</b> Establishment of <i>Agrobacterium tumefaciens</i> -mediated transformation system for <i>Candida</i> species using a dominant selection marker .....	71

## 1 INTRODUÇÃO

A incidência de infecções oportunistas causadas por espécies de leveduras do gênero *Candida* tem aumentado significativamente nas últimas décadas, gerando altos índices de morbidade, longos períodos de permanência em hospitais, dificuldade e alto custo do tratamento, assim como altas taxas de mortalidade, o que faz com que espécies deste gênero sejam consideradas microrganismos de grande importância clínica. A expressão diferencial de genes entre espécies de *Candida*, principalmente de genes relacionados a determinantes de virulência, assim como diferenças no perfil de suscetibilidade aos antifúngicos empregados na rotina médica, torna necessário o estudo de cada espécie individualmente. Descobrir e compreender a biologia referente a cada espécie de *Candida*, em todos os seus estados morfológicos, bioquímicos e genéticos, se faz necessário para o desenvolvimento de terapias de prevenção e tratamento mais eficazes e apropriadas para o combate de infecções causadas por esses patógenos oportunistas.

O sequenciamento do genoma de *C. albicans* e a disponibilidade de seqüências genômicas de outras espécies marcam o início de uma nova era para a elucidação dos mecanismos de patogenicidade do gênero *Candida* e desenvolvimento de novas drogas. Entretanto, há uma busca por metodologias que atendam de maneira mais eficiente o estudo da função gênica nestes microrganismos, e novas técnicas são necessárias para que as seqüências disponíveis sejam convertidas em informações com significado biológico.

Recentemente, a metodologia de transformação genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, baseada na capacidade natural desta bactéria em transferir parte de seu plasmídeo para células hospedeiras, vem sendo empregada para diversos fungos filamentosos e algumas leveduras. Estes estudos demonstram a praticidade de execução desta metodologia de transformação, assim como sua aplicabilidade como ferramenta para o estudo de expressão e interrupção gênicas.

Desta forma, este trabalho teve como objetivo descrever pela primeira vez a metodologia de transformação genética de espécies do gênero *Candida*, particularmente *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*, mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, ou seja, o desenvolvimento de uma nova metodologia para o estudo de genes de interesse do gênero *Candida*.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *CANDIDA SPP* – DE COMENSAL À PATÓGENO

Espécies de leveduras do gênero *Candida* são comumente encontradas como comensais na cavidade bucal, nos tratos gastro-intestinal e vaginal de indivíduos saudáveis, estando desta forma em equilíbrio com a microbiota normal e o sistema imune do hospedeiro. Entretanto, determinados fatores predisponentes podem favorecer a mudança do estado comensal destes fungos para um estado de patogenia, tornando-os capazes de causar infecções superficiais, de mucosas e sistêmicas.

O número de indivíduos predispostos a sofrer infecções por microrganismos oportunistas, como é o caso de espécies do gênero *Candida*, tem aumentado significativamente nas últimas décadas, seja pela emergência de doenças que causam diretamente ou indiretamente imunossupressão, ou por outros fatores predisponentes que desencadeiem desequilíbrios fisiológicos favoráveis à proliferação deste fungo (BANERJEE et al., 1991; BECK-SAGUE et al., 1993; PFALLER et al., 2005; PFALLER et al., 2006).

Consequentemente, a ocorrência destas infecções tem aumentado dramaticamente, gerando altos índices de morbidade, longos períodos de permanência em hospitais, dificuldade e alto custo do tratamento, assim como altas taxas de mortalidade, o que faz com que espécies do gênero *Candida* sejam consideradas microrganismos de grande importância clínica (WEY et al., 1988; PITTET e WENZEL, 1995; DIEKEMA et al., 2003; GUDLAUGSSON et al., 2003; PAPPAS et al., 2003; KOJIC et al., 2004; ALMIRANTE et al., 2005; MORRELL et al., 2005; COLOMBO et al., 2006).

Os fatores que geram um estado de predisposição ao desencadeamento de infecções oportunistas por este gênero compreendem tanto aqueles considerados amenos, que causam desequilíbrios fisiológicos leves, quanto os que debilitam mais severamente o organismo do hospedeiro, ambos proporcionando condições favoráveis à proliferação do fungo. Dentre estes destacam-se doenças como AIDS, o imunocomprometimento de pacientes provocado pela quimioterapia ao combate do câncer, terapias imunossupressoras devido a transplantes de órgãos, o uso de antibióticos de amplo espectro de ação, diabetes mellitus, nutrição parenteral, entre muitos outros casos. A má higiene e alimentação (dieta rica em açúcares e carboidratos), consumo excessivo de bebidas alcoólicas, deficiência de ferro e

vitaminas, o uso de contraceptivos orais, fumo e estresse, apesar de não comprometer de forma mais grave o organismo, também são considerados importantes fatores predisponentes (SAMARANAYAKE e SAMARANAYAKE, 2001; AKPAN e MORGAN, 2002; DE LEON et al., 2002; DIEKEMA et al., 2002; NAGLIK et al., 2003; HAJJEH et al., 2004; KOJIC et al., 2004; ALMIRANTE et al., 2005; CHENG et al., 2005; ALMIRANTE et al., 2006).

Considerada como uma das infecções fúngicas mais comum em humanos, a candidíase bucal afeta não somente indivíduos cuja saúde está debilitada, mas também pessoas saudias, onde o crescimento excessivo do fungo (colonização) provocado por certos fatores predisponentes, apesar de não estabelecer uma infecção propriamente dita, causa desconforto local e alteração do paladar. Em níveis mais intensos de colonização ou se estabelecendo a infecção, observa-se disfagia (dificuldade de deglutir alimentos) e odinofagia (sensação de dor deflagrada pela passagem dos alimentos pelo esôfago), que pode levar a perda de peso, desnutrição e recuperação lenta da normalidade (AKPAN e MORGAN, 2002).

O índice de isolamento da espécie *C. albicans* em pacientes saudáveis é alto, e faixas percentuais de 20% a 75% têm sido reportadas sem a constatação de qualquer sintomatologia. A incidência de isolamento desta espécie a partir da cavidade bucal de recém nascidos é de 45%, em crianças saudáveis este índice varia de 45 % a 65%, enquanto em adultos saudios está entre 30% e 45%. Em indivíduos que fazem o uso de próteses dentárias móveis esta incidência varia de 50% a 65%, e taxas de 65% a 88% tem sido relatadas naqueles que apresentam fatores predisponentes relacionados, por exemplo, a períodos de tratamentos hormonais e ao uso de antibióticos (SAMARANAYAKE e SAMARANAYAKE, 2001; AKPAN e MORGAN, 2002).

Espécies do gênero *Candida* são os patógenos oportunistas que mais acometem pacientes com AIDS, ocorrendo em cerca de 95% dos indivíduos no decorrer da doença, se manifestando principalmente em infecções orais, que também é muito comum em pacientes com câncer, atingindo em média 90% dos casos. Além disso, aproximadamente 75% de todas as mulheres saudias apresentam pelo menos uma infecção vaginal provocada por *Candida* spp ao longo da vida, e destas, 5% a 10% sofrem infecções recorrentes da doença (FIDEL e SOBEL, 1996; REDDING et al., 1999; LEUNG et al., 2000; SAFDAR et al., 2001; AKPAN e MORGAN, 2002; VARGAS e JOLY, 2002; DE REPENTIGNY et al., 2004; RICHTER et al., 2005).

Aliado aos dados citados anteriormente, entra em questão as infecções sistêmicas causadas por espécies do gênero *Candida*, ressaltando-se a importância clínica desses microrganismos. Espécies deste gênero, entre todos os microrganismos patógenos, é a

quarta principal causa de infecções nosocomiais na Europa, EUA e Brasil, não sendo muito diferente para as demais regiões demográficas (WEY et al., 1988; PITTET e WENZEL, 1995; FRIDKIN e JARVIS, 1996; HAZEN et al., 2003; PFALLER et al., 2005; COLOMBO et al., 2006; PFALLER et al., 2006).

Candidemia tem se tornado um problema crescente em quase todas as regiões demográficas, apresentando índices e implicações relevantes no que diz respeito a custo e dificuldades de tratamento, e principalmente mortalidade. Infecções deste tipo não somente estão relacionadas aos fatores predisponentes que acometem cada paciente, mas também aos procedimentos e materiais médicos utilizados na rotina hospitalar, que são responsáveis por pelo menos metade dos casos nosocomiais de candidemia (DIEKEMA et al., 2003; GUDLAUGSSON et al., 2003; PAPPAS et al., 2003; HAJJEH et al., 2004; KOJIC et al., 2004; ALMIRANTE et al., 2005; CHENG et al., 2005; MORRELL et al., 2005; BASSETTI et al., 2006; COLOMBO et al., 2006).

## **2.2 EPIDEMIOLOGIA DAS ESPÉCIES DO GÊNERO *CANDIDA***

O perfil epidemiológico de espécies do gênero *Candida* referente até certo tempo atrás demonstrava a prevalência de *C. albicans*, chegando a índices superiores a 80% do total, sendo as demais espécies apenas designadas como *Candida* não-*albicans* (BANERJEE et al., 1991; BECK-SAGUE et al., 1993). Porém, o desenvolvimento de novas metodologias de identificação e diagnóstico microbiológico e a emergência de infecções causadas pelas demais espécies do gênero *Candida*, tem revelado mudança neste perfil.

Estudos recentes confirmam a prevalência de *C. albicans* como a espécie mais encontrada entre os isolados clínicos do gênero, mas também indicam um aumento significativo na incidência de outras espécies. Em alguns casos, observa-se a igualdade dos índices de isolamento e até a prevalência de espécies não-*albicans* sobre *C. albicans*. No geral, a ordem das cinco espécies mais isoladas tem sido a mesma no decorrer dos últimos anos, compreendendo *C. albicans* seguido de *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (HAZEN et al., 2003; PFALLER et al., 2005; PFALLER et al., 2006; SANDVEN et al., 2006).

A epidemiologia de espécies do gênero *Candida* é uma questão multifatorial, e varia de acordo com as características da região demográfica e do grupo de

indivíduos estudado, assim como características particulares referentes a cada espécie. Por exemplo, apesar do índice de isolamento de *C. albicans* ser alto na maioria dos casos independente de qualquer variável, candidemia causada por *C. parapsilosis* está associada com cateteres vasculares e nutrição parenteral, já infecções sistêmicas por *C. tropicalis* está associada com câncer e neutropenia, e a prévia exposição a antifúngicos da classe dos azoles está relacionada a casos de *C. krusei* e *C. glabrata*. A faixa etária dos pacientes também é um dos muitos outros exemplos que influenciam a distribuição das espécies deste gênero, onde se observa altas taxas de incidência de *C. parapsilosis* em neonatos e principalmente de *C. glabrata* e *C. tropicalis* em pacientes adultos e de idades mais avançadas (DIEKEMA et al., 2003; GUDLAUGSSON et al., 2003; PAPPAS et al., 2003; HAJJEH et al., 2004; KOJIC et al., 2004; ALMIRANTE et al., 2005; CHENG et al., 2005; MORRELL et al., 2005; BASSETTI et al., 2006; COLOMBO et al., 2006).

Estudos demonstram um aumento notável na frequência de isolamento de *C. glabrata*, principalmente nos EUA e regiões como França, Suíça, Noruega, Dinamarca, Islândia e Reino Unido (ÁSMUNDSÓTTIR et al., 2002; DIEKEMA et al., 2002; OSTROSKY-ZEICHNER et al., 2003; HAJJEH et al., 2004; MARCHETTI et al., 2004; ARENDRUP et al., 2005; PFALLER et al., 2005; PFALLER et al., 2006; SANDVEN et al., 2006; SENDID et al., 2006). No Canadá, América Latina, regiões da Ásia e Pacífico, Espanha, Portugal e Itália, as espécies *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* tem sido as mais frequentemente isoladas após *C. albicans* (CUENCA-ESTRELLA et al., 2001; ALMIRANTE et al., 2005; CHENG et al., 2005; PFALLER et al., 2005; BASSETTI et al., 2006; COLOMBO et al., 2006; CUENCA-ESTRELLA et al., 2006; MESSER et al., 2006; PFALLER et al., 2006).

Esses mesmos estudos constataam um aumento notável na frequência de isolamento de *C. glabrata*, que vem aumentando gradativamente mesmo em regiões onde esta espécie não corresponde a segunda mais comumente isolada. Este fato indica a possibilidade de *C. glabrata* vir a prevalecer sobre as espécies não-*albicans* em quase todas regiões demográficas e até mesmo prevalecer futuramente sobre *C. albicans*.

No Brasil, é de particular interesse a espécie *C. tropicalis*, segunda mais comumente isolada após *C. albicans*, como demonstrado por Colombo e colaboradores em 2006, no maior estudo do gênero realizado no país até o momento. Observa-se neste mesmo trabalho que o número de casos de candidemia, a cada 1000 pacientes, é de 2 a 15 vezes maior do que os relatados pelos principais estudos epidemiológicos das demais regiões demográficas, o que torna a situação clínica deste tipo de infecção no Brasil mais problemática.

### 2.3 GÊNERO *CANDIDA* – SENSIBILIDADE, TOLERÂNCIA E RESISTÊNCIA A ANTIFÚNGICOS

Estudos que abordam a sensibilidade das espécies de *Candida* aos principais antifúngicos demonstram que *C. glabrata*, seguida por *C. krusei* e *C. tropicalis* são as espécies menos suscetíveis e as que apresentam uma maior propensão à resistência, particularmente quanto aos azoles (Fluconazol e Itraconazol). Estas análises revelaram que a sensibilidade aos antifúngicos pode variar com a espécie de *Candida* considerada, com a região demográfica, assim como características da população estudada (HAZEN et al., 2003; OSTROSKY-ZEICHNER et al., 2003; PFALLER et al., 2005; RICHTER et al., 2005; PFALLER et al., 2006).

Segundo os dados obtidos por esses autores, observa-se que para o controle de *C. krusei* faz-se necessário o emprego de maiores concentrações das drogas antifúngicas quando comparada às demais espécies analisadas. No entanto, *C. glabrata* tem desenvolvido mais resistência, enfatizando seu potencial como patógeno.

Existem diversos mecanismos responsáveis pela tolerância e desenvolvimento de resistência aos antifúngicos por parte das espécies do gênero *Candida*. Dentre os principais estão alterações nas enzimas-alvo das drogas, assim como a super-expressão de genes relacionados à produção dessas enzimas e á bombas de efluxo. Rotas alternativas para a via de biossíntese afetada pelo antifúngico e alterações na composição da parede celular e membrana plasmática também são importantes. Esses mecanismos são bem descritos em revisões realizadas por WHITE e colaboradores em 1998, e por GHANNOUM e RICE em 1999.

A tolerância e desenvolvimento de resistência às várias classes de antifúngicos utilizados na rotina médica para o controle de candidíases, também é considerada uma questão multifatorial, onde vários mecanismos podem atuar em conjunto, dependendo principalmente do antifúngico utilizado e da espécie de *Candida* estudada (WHITE et al., 1998; GHANNOUM e RICE, 1999; SANGLARD et al., 2003; PFALLER et al., 2005; SANGUINETTI et al., 2005; PFALLER et al., 2006).

## 2.4 FATORES DE VIRULÊNCIA EM ESPÉCIES DO GÊNERO *CANDIDA*

O estado fisiológico do hospedeiro é o primeiro fator que influencia a etiologia de infecções causadas por espécies do gênero *Candida*, contribuindo para o desencadeamento de um extenso repertório de determinantes de virulência seletivamente expressados de acordo com o tipo, estágio e sítio anatômico da infecção, com a resposta natural do organismo, assim como os fatores de predisposição pelos quais o indivíduo está sendo afetado (STAIB et al., 2000; HAYNES, 2001; HUBE e NAGLIK, 2001; KANTARCIOGLU e YÜCEL, 2002; NAGLIK et al., 2003; TAVANTI et al., 2004).

Os principais determinantes de virulência atribuídos a espécies de *Candida* são a de morfologia celular (capacidade de formar de hifas e pseudo-hifas, formação de biofilme e variação fenotípica), fatores de adesão como moléculas reconhecedoras de superfícies, habilidade de responder rapidamente às mudanças do meio, produção de enzimas hidrolíticas extracelulares como proteases e fosfolipases, entre outros (CALDERONE e BRAUN, 1991; SOLL, 1992; CHAFFIN et al., 1998; GHANNOUM, 2000; HAYNES, 2001; HUBE e NAGLIK, 2001; NAGLIK et al., 2003).

A maior parte dos estudos de caracterização de fatores de virulência em espécies do gênero *Candida* foi realizada empregando-se *C. albicans* como modelo. Entretanto, observa-se diferenças significativas quanto a presença de genes relacionados a esses determinantes de virulência entre as demais espécies, bem como a expressão dos mesmos, a qual é dependente da interação fungo-hospedeiro, assim como da necessidade nutricional e fisiológica do fungo no curso da infecção, deixando clara a necessidade de estudos mais detalhados referentes a cada espécie. (MONOD et al., 1994; GILFILLAN et al., 1998; FIDEL et al., 1999; STAIB et al., 2000; BRIELAND et al., 2001; HAYNES et al., 2001; ZAUGG et al., 2001; KANTARCIOGLU et al., 2002; FOTEDAR e AL-HEDAITHY, 2003; NAGLIK et al., 2003; TAVANTI et al., 2004; DAGDEVIREN et al., 2005; TAYLOR et al., 2005).

Dentre os principais determinantes de virulência, as enzimas hidrolíticas extracelulares desempenham um papel importante na virulência, sendo fundamentais na instalação e desenvolvimento da infecção. Dentre estas, destaca-se as aspartil proteases (Saps), que vem sendo alvo de muitos estudos. Várias espécies de *Candida* possuem genes *SAP* (Secreted Aspartyl Proteases), que variam numericamente e qualitativamente entre as espécies (TOGNI et al., 1991; DE VIRAGH et al., 1993; MONOD et al., 1994; GILFILLAN

et al., 1998; STAIB et al., 2000; ZAUGG et al., 2001; KANTARCIOGLU et al., 2002; FOTEDAR et al., 2003; TAVANTI et al., 2004; DAGDEVIREN et al., 2005).

Estudos referentes à *C. albicans* constataram a existência de 10 genes *SAP* (*SAP1-SAP10*), que estão associados com outros determinantes de virulência como fatores de adesão, formação de hifas e alteração fenotípica. Estudos empregando mutantes *SAP*-deficientes demonstram que *SAP1*, *SAP2* e *SAP3* estão relacionados a infecções de mucosas e, *SAP4*, *SAP5* e *SAP6* a infecções sistêmicas. Dependendo da combinação de genes mutados pode-se observar uma diminuição significativa da virulência e dos danos causados aos tecidos, assim como uma resposta imunológica mais eficiente por parte do hospedeiro, tanto em infecções sistêmicas como de mucosas. No entanto, a disrupção de genes *SAP* pode ser compensada pela expressão dos outros genes desta família que permanecem inalterados (HUBE e NAGLIK, 2001; NAGLIK et al., 2003).

A expressão gênica em espécies do gênero *Candida*, principalmente de genes relacionados à determinantes de virulência, é um campo de estudo complexo devido aos diversos fatores que influenciam esta expressão, de acordo com cada espécie. Muito ainda precisa ser elucidado, deixando clara a necessidade de estudos visando à caracterização dos fatores de virulência referente a cada espécie. Neste contexto, destaca-se *C. glabrata*, visto sua acentuada emergência e existência de poucos estudos relacionados a esses fatores, assim como ao fato desta espécie ser filogeneticamente distante de *C. albicans*, possuindo, por exemplo, mais similaridade com *Saccharomyces cerevisiae*, fato que dificulta a comparação de genes funcionais de *C. glabrata* baseados em informações obtidas no estudo das demais espécies (BARNS et al., 1991; WONG et al., 2003).

Devido ao alto índice de isolamento de *C. tropicalis* em várias regiões, inclusive no Brasil, e ao fato desta espécie, junto com *C. albicans* e *C. glabrata*, estar relacionada às maiores taxas de mortalidade, se faz importante à caracterização de genes de interesse e diferenciação da expressão dos mesmos referente a cada uma delas (GUDLAUGSSON et al., 2003; PAPPAS et al., 2003; HAJJEH et al., 2004; ALMIRANTE et al., 2005; COLOMBO et al., 2006).

Descobrir e compreender a biologia de espécies do gênero *Candida*, em todos os seus estados morfológicos, bioquímicos e genéticos, se faz necessário para o desenvolvimento de terapias de prevenção e tratamento mais eficazes e apropriadas para o combate de infecções causadas por esses microrganismos, visto a toda problemática mencionada anteriormente.

## 2.5 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA

A transformação genética, como uma das técnicas da biotecnologia moderna, é definida como um processo de introdução controlada de DNA exógeno (genes) em células hospedeiras, com o propósito de alterar o genótipo do organismo receptor e/ou expressar este DNA exógeno, possibilitando através da manipulação do genoma de microrganismos correlacionar o estudo de DNA *in vitro* com suas conseqüências biológicas *in vivo* (RUIZ-DIEZ, 2002).

Metodologias de transformação genética representam uma ferramenta importante para o estudo de espécies de leveduras do gênero *Candida*, pois permitem através da expressão e/ou disrupção de genes específicos, como determinantes de virulência, caracterizar a função dos mesmos e desta forma elucidar a biologia e mecanismos de patogenicidade destes microrganismos. (DE BACKER et al., 2000; BERMAN e SUDBERY, 2002; MAGEE et al., 2003; BRUNO e MITCHELL, 2004; NOBLE e JOHNSON, 2005).

### 2.5.1 Metodologias de Transformação Genética para Leveduras

O primeiro sistema de transformação genética para fungos leveduriformes foi estabelecido em 1978 por Hinnen e colaboradores, utilizando *Saccharomyces cerevisiae* como modelo biológico. No decorrer dos anos seguintes, precisamente até o início de 1990, foram desenvolvidos os métodos que até hoje servem de base e são os mais empregados para transformação genética de leveduras. Apesar da proposta de outras metodologias, as mais utilizadas continuam sendo as estabelecidas neste período, e consistem no emprego de esferoplastos (células desprovidas de parede celular) ou células intactas competentes (artificialmente induzidas), seguida por tratamento químico ou eletroporação, assim como técnicas de biobalística e conjugação (WANG et al., 2001).

A geração de esferoplastos consiste na remoção da parede celular, que representa uma barreira à entrada do DNA exógeno. Para tal é realizada uma digestão enzimática em presença de um estabilizador osmótico em solução tampão, sendo necessário a otimização deste processo quanto a escolha do composto lítico, do estabilizador osmótico e da solução tampão a serem empregados, de acordo com o modelo biológico em questão.

Após a obtenção dos esferoplastos, é promovida a entrada do DNA exógeno por tratamento químico com íons cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) e polietilenoglicol (PEG), que neutralizam a carga negativa da membrana e promove a interação das moléculas de DNA com os esferoplastos, respectivamente. Esta etapa também requer otimizações no que diz respeito a concentração dos reagentes utilizados, tempo de exposição aos mesmos e temperatura do sistema.

Uma variação desta metodologia é a integração mediada por endonuclease de restrição (*Restriction Enzyme-Mediated Integration* - REMI), descrita pela primeira vez por Schiestl e Peter para *S. cerevisiae* em 1991. Esta técnica compreende a adição de enzimas de restrição ao sistema de transformação, que ao cortar sítios específicos tanto do genoma da célula alvo quanto do vetor contendo o DNA exógeno a ser inserido, torna possível a integração deste vetor em vários locais do genoma da célula fúngica pela exposição de seqüências de nucleotídeos compatíveis (complementares) entre ambos.

Na metodologia de eletroporação, o sistema de transformação empregando-se esferoplastos, ao invés de sofrer um tratamento químico como mencionado anteriormente, é submetido a uma corrente elétrica de alta voltagem que facilita a entrada do DNA exógeno na célula. Quando o pulso de voltagem é aplicado ao esferoplasto, os componentes da membrana ficam polarizados, gerando uma diferença de potencial. Quando este potencial ultrapassa um certo limiar de voltagem, ocorrem microrupturas na membrana celular, tornando-a permeável a compostos exógenos como o DNA transformante. Este é um processo reversível, cuja remoção do campo elétrico resulta no fechamento espontâneo dos poros formados permitindo o restabelecimento da integridade da membrana plasmática (WATTS e STACEY, 1990).

O sucesso da técnica de eletroporação, além das otimizações necessárias para obtenção dos esferoplastos como mencionado anteriormente, exige ainda a otimização de parâmetros como tempo e intensidade da voltagem utilizada na transformação, assim como o tamanho da célula alvo, a condutividade do meio de eletroporação e a viabilidade após o choque elétrico. Em adição, os eletroporadores são equipamentos caros e nem sempre viáveis para todos os laboratórios.

Tanto o método de esferoplastos / $\text{Ca Cl}_2$ / PEG quanto esferoplastos/eletroporação requer a regeneração dos esferoplastos á condição de células viáveis normais (com parede celular), que é a etapa mais delicada para estes sistemas de transformação. Por isso, todos os cuidados de otimização mencionados anteriormente são válidos não só para obtenção de esferoplastos e entrada do DNA exógeno em seu interior, mas

também para regeneração dos mesmos e conseqüente relação com a eficiência de transformação.

O emprego de células intactas competentes para transformação de leveduras, induzidas por íons metálicos alcalinos ( $\text{Li}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Rb}^+$ ,  $\text{Ca}^+$  e  $\text{Na}^+$ ), foi primeiramente descrito por Ito e colaboradores em 1983. A partir de então, este protocolo foi amplamente explorado e modificado por muitos autores, e atualmente é uma das metodologias de transformação genética mais comumente empregada para fungos leveduriformes. A técnica baseia-se nas propriedades do composto acetato de lítio (LiAc), que aumenta a permeabilidade celular, permitindo assim a entrada do DNA exógeno. Esta metodologia também requer otimizações no que diz respeito à concentração dos reagentes utilizados, tempo de exposição aos mesmos e temperatura do sistema.

Em 1987, Sanford e colaboradores propuseram uma metodologia, posteriormente denominada biobalística ou “gene gun”. Seu fundamento baseia-se na aceleração de partículas de alta densidade (microprojétils constituídos de ouro ou tungstênio) recobertas por DNA exógeno contra as células hospedeiras. Este sistema dispensa a utilização de corrente elétrica, visto que o microprojétil pode ultrapassar tanto a parede celular, quanto a membrana citoplasmática e nuclear. Além disso, o projétil é capaz de atingir diretamente o núcleo, evitando dessa forma a degradação do DNA exógeno pela ação de nucleases citoplasmáticas. O emprego da biobalística como método de transformação em fungos foi primeiramente descrito para *S. cerevisiae* em 1990 por Armaleo e colaboradores.

Os fatores físicos envolvidos na eficiência da biobalística estão relacionados ao aparelho e microprojéteis a serem utilizados no experimento. Entre os principais estão variações de pressão do gás, nível de vácuo gerado e posição do material alvo, assim como constituição, tamanho e concentração das micropartículas, e o procedimento utilizado para ligar o DNA a elas. Já os parâmetros biológicos que afetam esta eficiência incluem o modelo biológico e genótipo da célula alvo, a fase de crescimento em que se encontram as células na cultura, densidade e composição osmótica do meio durante o bombardeamento (ARMALEO et al., 1990).

O método de transformação genética denominado conjugação entre reinos (*Trans-kingdom transformation*) foi primeiramente evidenciado por Heinemann e Sprague em 1989. Como o próprio nome diz, o método é baseado na transferência de material genético (plasmídeo) da bactéria *Escherichia coli* pelo processo natural de conjugação, para células hospedeiras pertencentes a reinos distintos.

Variações destas metodologias vêm sendo elaboradas e otimizadas de

acordo com cada microrganismo, visando o aumento da eficiência de transformação, redução de gastos e tempo, assim como o desenvolvimento de técnicas menos trabalhosas. A incorporação de substâncias aos sistemas de transformação já estabelecidos é a principal modificação realizada, assim como a fusão de protocolos e otimizações referentes à construção gênica (tipo e composição do vetor) empregada na transformação genética, temperatura e períodos de incubação do sistema (MEILHOC et al., 1990; ISHIGURO e KOBAYASHI, 1995; THOMPSON et al., 1998; DE BACKER et al., 2000; WANG et al., 2001; WALTHER e WENDLAND, 2003; DOHMEN et al., 2004; GIETZ e SCHIESTL, 2007a; GIETZ e SCHIESTL, 2007b).

Os métodos mencionados anteriormente já foram aplicados com sucesso na transformação genética de muitos gêneros de leveduras. No entanto, ao contrário do que ocorre para *S. cerevisiae*, a qual já foi transformada por todos os sistemas, nenhum outro fungo leveduriforme possui todos estes métodos de transformação estabelecidos. Também não há uma metodologia que prevaleça entre os diferentes organismos, visto que a metodologia a ser utilizada para a introdução do DNA exógeno está diretamente ligada às características particulares da célula hospedeira (WANG et al., 2001).

Dentre as principais metodologias descritas para leveduras, a esferoplastização/CaCl<sub>2</sub>/PEG, células intactas/LiAc/PEG e a eletroporação são as rotineiramente empregadas. Já as técnicas de biobalística e conjugação não são comumente utilizadas quando comparadas as anteriores (DE BACKER et al., 2000; GIETZ e WOODS, 2001; e WANG et al., 2001).

No ano de 1995, foi demonstrada por Bundock e colaboradores a capacidade da bactéria *Agrobacterium tumefaciens* de transferir DNA para *S. cerevisiae*, metodologia de transformação genética primeiramente desenvolvida e comumente utilizada para plantas (ZHU et al., 2000 e ZUPAN et al., 2000). A partir de então, esta técnica foi amplamente difundida e utilizada para transformação de muitos gêneros fúngicos, principalmente filamentosos, onde se observa vantagens significativas em relação às demais metodologias existentes, que serão mencionadas mais adiante, tornando o seu emprego interessante e diferencial (MICHIELSE et al., 2005).

### 2.5.2 Transformação Genética de Espécies do Gênero *Candida*

As metodologias de esferoplastização/CaCl<sub>2</sub>/PEG, células intactas/LiAc/PEG e a eletroporação são as rotineiramente empregadas na transformação genética de espécies de *Candida*, sendo que modificações das mesmas e/ou fusão entre protocolos é comumente observado. Muitas espécies deste gênero foram transformadas e diversos estudos desenvolvidos, tendo por objetivo à análise de genes de interesse relacionados a diversas funções. A eficiência de transformação varia de acordo com a espécie de *Candida* em questão e com a construção gênica empregada no experimento. A metodologia de transformação empregada e suas possíveis modificações também são fatores importantes (DE BACKER et al., 1999; DE BACKER et al., 2000; GIETZ e WOODS, 2001; WANG et al., 2001; BERMAN e SUDBERY, 2002; WALTHER et al., 2003; BRUNO e MITCHELL, 2004; GÁCSEK et al., 2005; DMYTRUK et al., 2006).

Porém, o grande desafio à realização de transformação genética para o estudo da função gênica em leveduras do gênero *Candida*, está no fato de serem microrganismos diplóides (salvo raras exceções como *C. glabrata*) e da ausência de um ciclo sexual, além de características particulares da genética deste gênero. Dessa forma, várias construções gênicas e transformações sequenciais geralmente são necessárias para a obtenção de mutantes nulos homozigóticos, e várias são as técnicas de construção de vetores e transformação para atingir tal objetivo, justificando o quão trabalhoso e complexo pode ser o processo (DE BACKER et al., 2000; WANG et al., 2001; BERMAN e SUDBERY, 2002; MAGEE et al., 2003; NOBLE e JOHNSON, 2005).

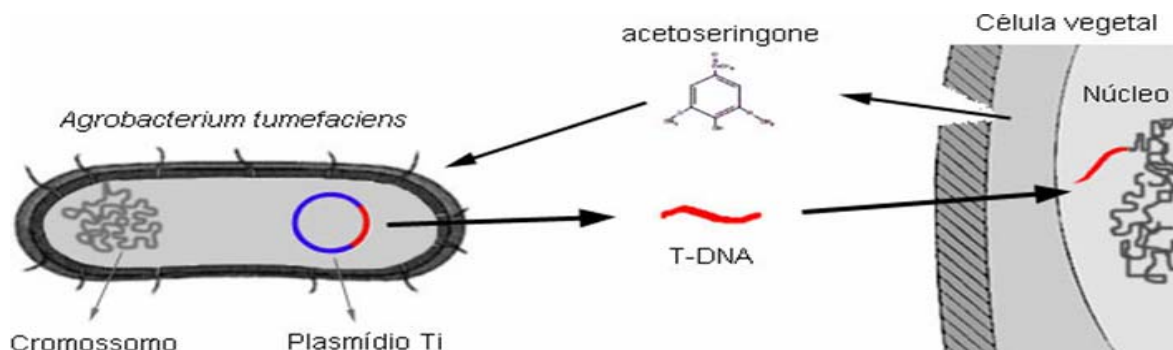
As metodologias de esferoplastização/CaCl<sub>2</sub>/PEG, células intactas/LiAc/PEG e eletroporação, apesar de serem extensivamente empregadas, apresentam algumas limitações. A eficiência de transformação de forma integrativa no genoma é geralmente baixa ( $\leq 300$  transformantes/ $\mu\text{g}$  DNA) e dependendo da metodologia observam-se altos índices de transformantes abortivos. Essas integrações nem sempre ocorrem de forma randômica, e em muitos casos é constatado a presença de mais de uma cópia inserida no genoma. Quando vetores não integrativos são usados, observa-se aumento na eficiência de transformação, mas problemas relacionados à estabilidade entram em questão, assim como limitações quanto à aplicação destes para o desenvolvimento de estratégias de disrupção gênica (DE BACKER et al., 1999; DE BACKER et al., 2000; WANG et al., 2001; BERMAN e SUDBERY, 2002; MAGEE et al., 2003; NOBLE e JOHNSON, 2005). Informações mais

detalhadas das principais estratégias e dificuldades para a análise da função gênica em espécies de leveduras do gênero *Candida* são descritas por esses mesmos estudos, que ainda deixam clara a necessidade do desenvolvimento de ferramentas que atendam de maneira mais eficaz os requisitos para este tipo de análise genômica.

### 2.5.3 Transformação Genética mediada por *Agrobacterium Tumefaciens*

*A. tumefaciens* é um bacilo aeróbico Gram negativo encontrado no solo e responsável por causar tumores em várias espécies vegetais. Em condições naturais, a bactéria transfere parte de seu plasmídeo Ti (*tumor inducing*) para a célula hospedeira. Esta seqüência de DNA que é transferida (T-DNA) é capaz de se integrar eficientemente em seu genoma, e genes que codificam enzimas envolvidas na biossíntese de reguladores de crescimento vegetal (auxinas e citocininas) são expressos, resultando em uma multiplicação descontrolada das células. Genes relacionados à sobrevivência da bactéria também são expressos, codificando enzimas para a síntese de opinas, utilizadas como fonte de nutrientes (ZHU et al., 2000; ZUPAN et al., 2000; GELVIN, 2003). Desta forma, pela modificação genética das células da planta, a bactéria cria para si um nicho favorável, sendo este processo denominado “colonização genética” (HOOYKAAS & BEIJERSBERGEN, 1994).

O plasmídeo Ti também contém um outro segmento (cluster gênico) denominado de região de virulência, que é constituída por vários genes denominados *vir*. Estes genes codificam proteínas envolvidas na cópia do T-DNA, assim como no transporte, proteção e integração do T-DNA na célula hospedeira. Compostos fenólicos liberados quando a planta sofre algum tipo de injúria, como o acetoseringona, são necessários para a indução dos genes *vir* e conseqüente desencadeamento da maquinaria de transferência da *A. tumefaciens* (ZHU et al., 2000; ZUPAN et al., 2000; GELVIN, 2003) (Figura 1).



**Figura 1** – Esquema simplificado ilustrando algumas das etapas do mecanismo de transferência do T-DNA de *A.tumefaciens* para células vegetais.

Para o emprego desta bactéria como ferramenta de transformação genética fez-se modificações no plasmídeo Ti, com a finalidade de remover genes responsáveis por causar tumor, deixando somente os necessários para o processo de transferência. Modificações no T-DNA também são realizadas para inserir genes a serem expressos, como marcadores de seleção e demais genes de interesse. Além disso, é empregado o sistema de vetor binário, onde o T-DNA e a região de virulência (*vir*) estão presentes em plasmídeos distintos, facilitando assim a manipulação genética e adequando o seu uso como ferramenta de biologia molecular (GELVIN, 2003; MICHIELSE et al., 2005).

### 2.5.3.1 Mecanismo de transferência do T-DNA a partir de modelos vegetais

Várias etapas são necessárias para que ocorra o processo de infecção da planta e transferência do T-DNA por *A. tumefaciens*. Estas etapas compreendem a quimiotaxia e adesão da bactéria ao vegetal, indução da expressão dos genes *vir*, e conseqüente processamento, transferência, direcionamento do T-DNA até o núcleo e integração do mesmo no genoma hospedeiro (SHENG & CITOVSKY, 1996; ZIEMIENOWICZ, 2001; GELVIN, 2003).

O primeiro evento do processo de transferência ocorre quando um tecido da planta sofre injúria, liberando diferentes moléculas para o ambiente. Algumas destas moléculas são capazes de atuar como sinalizadoras, promovendo quimiotaxia positiva para o *Agrobacterium*. Estes sinalizadores foram identificados principalmente como compostos fenólicos tais como acetoseringona, ácido p-hidroxibenzóico e vanilina, embora existam

relatos de que alguns açúcares e aminoácidos também possam atuar como quimiotáticos (HAWES et al., 1988). Independente da molécula sinalizadora, o processo de reconhecimento e quimiotaxia do *Agrobacterium* é dependente dos genes *virA* e *virG*, presentes no plasmídio Ti (SHAW et al., 1988). Acetoseringona é um dos compostos fenólicos que participam ativamente na indução dos genes de virulência (BOLTRON et al., 1986).

O processo de adesão envolve moléculas receptoras tanto na planta como na superfície do *Agrobacterium*. O receptor bacteriano é um polissacarídeo rico em  $\beta$ -glucanas ancorado no lipopolissacarídeo da parede celular, enquanto os receptores de superfície na planta foram caracterizados como pectinas, proteínas tipo-vitronectina e tipo-germina (MATTHYSSE & KIJNE, 1998). É provável que as proteínas tipo-vitronectina das plantas estejam envolvidas na adesão celular entre *Agrobacterium* e planta, uma vez que a adesão entre estas células foi inibida em presença de anticorpos anti-vitronectina (WAGNER & MATTHYSSE, 1992). A vitronectina é um componente da matriz extra-celular de células animais e é utilizada como receptor de superfície por várias linhagens de bactérias patogênicas (PAULSSON & WADSTROM, 1990).

Os genes envolvidos na adesão de *A. tumefaciens* à planta estão localizados no cromossomo circular bacteriano, e incluem *chvA*, *chvB*, *pscA*, *attA-Z* e *celABCDE* (ZIEMIENOWICZ, 2001; MATTHYSSE et al., 2000). Os produtos dos genes *chvA* e *chvB* promovem a síntese de  $\beta$ -1,2 glucanas e o gene *pscA* (*exoC*) codifica enzimas responsáveis pela síntese de exopolissacarídeos. A função exata do produto dos genes *attA-Z* ainda não é conhecida, mas a presença de um grande número de genes envolvidos no processo de adesão sugere que a habilidade de *A. tumefaciens* em ligar-se às células hospedeiras seja importante para a transferência do T-DNA (MATTHYSSE et al., 2000).

Após a indução dos genes de virulência, a proteína VirD reconhece as bordas do T-DNA, promovendo a formação de fita simples e linear de DNA, que se associam às proteínas Vir E que conferem estabilidade ao processo, e a proteína Vir D2 que se une covalentemente à extremidade 5' do T-DNA. Esse complexo, proteínas-DNA, é transferido para o citoplasma da célula vegetal, onde regiões de sinalização de direcionamento nuclear das proteínas VirE2 e VirD2 orientam o complexo aos poros nucleares (GELVIN et al., 2000). Uma vez que o complexo encontra-se no núcleo, a integração do T-DNA, no genoma, envolve proteínas que participam do processo de reparo, recombinação e síntese de DNA (OHBA et al., 1995). O sistema de integração do T-DNA não é conhecido, entretanto a inserção parece ser ao acaso, havendo uma preferência por regiões transcricionalmente ativas (KONCZ et al., 1992).

### 2.5.3.2 Expressão e função dos genes *vir* baseado em modelos vegetais

As proteínas Vir são codificadas pela região *vir*, contendo 20 genes essenciais e expressos em operons: *vir A, B, C, D, E* e *G*. A regulação da expressão dos genes *vir* é induzida em resposta a presença de compostos fenólicos em combinação com monossacarídeos e acidez extracelular (pH 5,0 a 5,5). Esta acidez pode ser necessária para promover a protonação dos compostos fenólicos, aumentando sua permeabilidade através da membrana citoplasmática bacteriana. Este estímulo químico é detectado por dois componentes sensores transmembrana, proteínas VirA e VirG, resultando em auto-regulação positiva de todos os promotores *vir* (JUN et al., 2000). Essas proteínas estão presentes em níveis basais no interior celular.

O locus *virA* é constitutivamente expresso e o seu produto (VirA), localizado na membrana interna das células de *Agrobacterium*, funciona como um quimiorreceptor para as moléculas sinalizadoras da planta. Após a aproximação da bactéria até a região onde ocorreu a injúria no tecido vegetal, dá-se início a adesão entre as células. A proteína VirA contém 4 domínios funcionais, designados de periplasmático, *linker*, quinase e domínio receptor, apresentando dímeros tanto na presença quanto na ausência de moléculas indutoras (GELVIN, 2003).

Ao se ligar à molécula indutora, a proteína VirA inicialmente se autofosforila e modifica a proteína VirG (que também é expressa constitutivamente, mas em menor escala) através da fosforilação da mesma. A proteína VirG fosforilada atua como ativador transcricional dos genes *vir*, através da ligação no *vir-box*, uma seqüência de 12 pb presente na região promotora desses genes (GELVIN, 2003). Recentemente foi investigada a função do plasmídeo pAtC58 sobre a virulência de *A. tumefaciens* C58. A participação deste plasmídeo na virulência de *A. tumefaciens* era supostamente nula, mas ficou comprovado que genes do pAtC58 estão envolvidos na regulação da expressão dos genes *vir* de pTiC58 (NAIR et al., 2003).

Com a indução da expressão dos genes *vir*, dá-se início a montagem do “complexo-T” (a molécula final de T-DNA associada a diversas proteínas), a partir da síntese de uma cópia fita simples do T-DNA. Este processo é dependente das proteínas VirD1 e VirD2, duas proteínas do operon *virD*. Estas proteínas são capazes de reconhecer as bordas esquerda e direita do T-DNA. A proteína VirD2 hidrolisa a ligação fosfodiéster da fita inferior, entre o 3° e 4° nucleotídeo de cada borda, e conseqüentemente gera um segmento fita

simples do T-DNA. Este fragmento de T-DNA fita simples é removido do plasmídeo Ti, que por sua vez é reparado através da incorporação de novos nucleotídeos. Em seguida, a proteína VirD2 permanece covalentemente ligada à extremidade 5' do T-DNA. A presença desta proteína está relacionada com a polarização do complexo-T. A função exata da proteína VirD1 ainda é desconhecida, mas é sugerido que tenha atividade semelhante a topoisomerase I (GHAI & DAS, 1989). A etapa final no processamento do T-DNA envolve as proteínas VirC1 e VirC2. VirC1 é capaz de ligar-se ao sítio *overdrive*, localizado adjacente à borda direita, aumentando a atividade enzimática de VirD1/VirD2 (GELVIN, 2003).

A montagem do complexo-T é finalizada com a associação de proteínas VirE2 ao conjunto T-DNA/VirD2. Várias cópias desta proteína ligam-se ao longo da molécula de T-DNA, sem especificidade de seqüências (ZUPAN & ZAMBRYSKI, 1995). Diversas funções foram associadas a esta proteína, incluindo proteção da fita de T-DNA contra nucleases do hospedeiro e formação do canal de transporte de T-DNA (GELVIN, 2003). Análises do complexo-T através de microscopia eletrônica revelaram que esta molécula exibe uma estrutura helicoidal semelhante a um solenóide (CITOVSKY et al., 1997; ABU-ARISH et al., 2004).

A transferência do complexo-T até a planta é mediada por um *pillus* do *Agrobacterium*, semelhante ao encontrado no sistema de conjugação bacteriana (FULLNER et al., 1996). Esse *pillus* é formado por proteínas VirB, sendo VirB2 a subunidade maior. O *pillus* é ancorado à membrana externa da célula bacteriana através da proteína VirB7. O complexo-T é acoplado ao *pillus* através da proteína VirD4, localizada na membrana interna da bactéria, e é transferido até o citoplasma da célula hospedeira. No citoplasma do hospedeiro, o complexo-T é direcionado para o núcleo através de sinais de localização nuclear (SLN). Estes sinais, presentes nas proteínas VirD2 e VirE2, são reconhecidos por proteínas da membrana nuclear, como a importina e proteínas Ran. Uma vez reconhecido, o complexo-T é incorporado para o interior do núcleo da célula hospedeira (ZIEMIENOWICZ, 2001).

A internalização do complexo-T é um evento ainda não esclarecido. A proteína VirD2 supostamente confere polarização para o complexo-T interagir com as importinas. O papel de VirE2 no transporte nuclear do T-DNA ainda é bastante controverso. No interior das células de *Agrobacterium*, VirE2 provavelmente interage com a chaperonina VirE1, tornando-se incapaz de se ligar à fita simples de T-DNA. Contudo, quando VirE2 está ligada ao T-DNA, este assume a forma estrutural de um solenóide-helicoidal. Suspeita-se que esta conformação possa ser necessária para a internalização do complexo-T no núcleo do hospedeiro. A molécula do complexo-T é um conjunto nucleoprotéico extremamente grande,

uma vez que o T-DNA pode conter até 150 kb de extensão (HAMILTON, 1996). Além disso, aproximadamente 600 moléculas de VirE2 ligam-se ao longo do T-DNA, conferindo a este um comprimento de aproximadamente 3600 nm. A molécula final do complexo-T possui cerca de  $5 \times 10^7$  Da de massa e 60 vezes a espessura da membrana nuclear. No contexto de toda a estrutura desta molécula, é possível que a proteína VirE2 seja fundamental para a internalização do complexo-T. Além de estabelecer a ultraestrutura helicoidal ao T-DNA, a presença de VirE2 ao longo de todo o seu comprimento permite que os poros da membrana nuclear estejam abertos em ambos os meios, núcleo e citoplasma (ZUPAN & ZAMBRYSKI, 1995).

No núcleo da célula vegetal, o T-DNA é integrado ao genoma por recombinação ilegítima (GHEYSEN et al., 1991; ZIEMIENOWICZ, 2001) ou, menos freqüentemente, por recombinação homóloga (LEE et al., 1990). De acordo com o modelo atual (TINLAND & HOHN, 1995), a integração tem início quando a região 3' do T-DNA encontra homologia e forma um pareamento em algum sítio do DNA vegetal. Os nucleotídeos pareados sofrem restrição por nuclease(s). Em seguida, a extremidade 5'-VirD2 também pareia com o DNA vegetal e é ligado na terminação 3'-OH deste. A fita superior do DNA vegetal é degradada e a maquinaria de reparo do DNA sintetiza a fita complementar do T-DNA, finalizando o processo de integração. As proteínas envolvidas na integração do T-DNA ainda não são conhecidas, mas há evidências de que VirD2 atue como integrase ou ligase (ZIEMIENOWICZ, 2001). Fatores da célula hospedeira também participam do evento integração, a exemplo da histona H2A (MYSORE et al., 2000).

Diferentemente do que ocorre para modelos vegetais, a expressão e função dos genes *vir* em fungos é pouco estudada. Até o momento, existe somente um relato do papel das proteínas Vir na transformação de fungos por *A. tumefaciens* (MICHIELSE et al., 2004). Segundo estes autores, a inativação de genes que codificam as proteínas VirA, VirB, VirC, VirD, VirG e VirE resulta na ausência ou redução significativa de geração de transformantes de *Aspergillus awamori*. Estes resultados sugerem que a transformação desta espécie fúngica é dependente do complexo-T intacto.

#### 2.5.4 *Agrobacterium Tumefaciens* como Ferramenta de transformação Genética

O principal avanço que permitiu a utilização de *Agrobacterium* como mediador de transformação genética foi a descoberta que a substituição dos oncogenes do T-DNA por genes de interesse não inibe o mecanismo natural de transferência. Desta forma, a primeira demonstração real de que a interação *Agrobacterium*-planta poderia resultar em sistemas eficientes de transformação foi a introdução do gene que confere resistência ao antibiótico canamicina em plantas de fumo (HERRERA-ESTRELLA et al., 1983), confirmando a possibilidade de manipulação do plasmídeo de *Agrobacterium*. Desde então, esta metodologia foi aplicada com sucesso para inúmeras espécies vegetais (GELVIN, 2003).

Os plasmídeos utilizados para sistemas de transformação via *Agrobacterium* são chamados de vetores desarmados, isto é, não possuem os oncogenes do T-DNA, mas conservam os genes de virulência (região *vir*). Os vetores podem ser divididos em dois sistemas: sistema cointegrado (sistema *in cis*) no qual os genes *vir* e o T-DNA modificado estão no mesmo replicon (ZAMBRYSKI et al., 1983) e sistema binário (sistema *in trans*), onde o T-DNA modificado é mantido em um plasmídeo distinto do Ti (HOEKMA et al., 1983). O sistema de vetores binários tem sido a estratégia mais utilizada na transformação via *Agrobacterium*. Estes vetores apresentam tamanho muito reduzido quando comparado ao plasmídeo Ti desarmado, facilitando sua manipulação *in vitro*. Além disto, possuem seqüências *ori* (origem de replicação bacteriana), marcadores de resistência a antibióticos e sítios únicos para endonucleases de restrição dentro da seqüência de T-DNA. Estas características permitem a manipulação do vetor binário em *Escherichia coli* contendo praticamente qualquer seqüência clonada entre as bordas esquerda e direita. Atualmente existem várias construções de vetores binários, os quais variam em tamanho, sítios de restrição, marcador de seleção, origem de replicação e outras propriedades (KLEE, 2000).

A escolha do vetor binário adequado, assim como da linhagem bacteriana, pode ser decisiva para uma transformação genética eficiente. A eficiência das linhagens de *Agrobacterium* está diretamente associada ao *background* cromossômico e ao plasmídeo Ti desarmado. As linhagens C58 são as mais utilizadas na transformação de plantas e atualmente existem muitas variantes com plasmídeos Ti selvagem e desarmado (KLEE, 2000).

A gama de hospedeiros que o *Agrobacterium* pode infectar pode variar de acordo com a linhagem bacteriana. A base molecular que envolve a especificidade de hospedeiros ainda não foi completamente determinada, entretanto existem trabalhos indicando

que genes do plasmídeo Ti tenham papel relevante no reconhecimento de hospedeiros (LOPER & KADO, 1979; THOMASHOW et al., 1980). Os genes *virC*, *virF* e *virH* foram fundamentais para determinar as espécies vegetais susceptíveis à infecção e formação do tumor. Outros genes *vir*, incluindo *virG*, contribuem para a hipervirulência de algumas linhagens bacterianas. Entretanto, o processo de especificidade de hospedeiros é controlado por múltiplos fatores genéticos, tanto da bactéria quanto da planta (GELVIN, 2003).

Algumas linhagens de *Agrobacterium* foram modificadas para aumentar a eficiência de transformação. A principal alteração pode ser relacionada à expressão do gene *virG*, que é responsável pelo controle de todos os outros genes *vir*. Outra modificação importante foi o aumento na expressão de *virEI*, cujo produto é capaz de ligar-se ao T-DNA, protegendo-o da ação de endonucleases do hospedeiro (KLEE, 2000).

### **2.5.5 Transformação genética de leveduras via *Agrobacterium tumefaciens***

Em meados de 1995, Bundock e colaboradores descreveram o primeiro relato de transformação genética de fungos via *A. tumefaciens* (AMT- *Agrobacterium mediated transformation*). Simulando *in vitro* o sistema natural de transformação vegetal, estes pesquisadores conseguiram transformar eficientemente a levedura *S. cerevisiae* com o gene *ura3* (biossíntese da uracila). Posteriormente, De Groot e colaboradores (1998) estenderam a AMT para várias espécies de fungos filamentosos. Desde então o número de espécies fúngicas transformadas via *Agrobacterium* vem crescendo progressivamente (MICHIELSE et al., 2005).

Até o momento, *S. cerevisiae* (BUNDOCK et al., 1995) e *Kluyveromyces lactis* (BUNDOCK et al., 1999) são as únicas leveduras transformadas por esta metodologia. No entanto, a fase leveduriforme de alguns fungos dimórficos como *Histoplasma capsulatum* e *Blastomyces dermatitidis* (SULLIVAN et al., 2002), *Paracoccidioides brasiliensis* (LEAL et al., 2004), *Cryptococcus neoformans* (IDNURM et al., 2004) e *Cryptococcus gattii* (McCLELLAND et al., 2005) também foram transformadas via *A. tumefaciens*. Estes estudos demonstraram não somente a praticidade desta metodologia quando comparada às demais técnicas, como também a obtenção de altas frequências de transformação de forma integrativa, aleatória e única no genoma da célula hospedeira.

A praticidade de execução desta metodologia de transformação, que permite

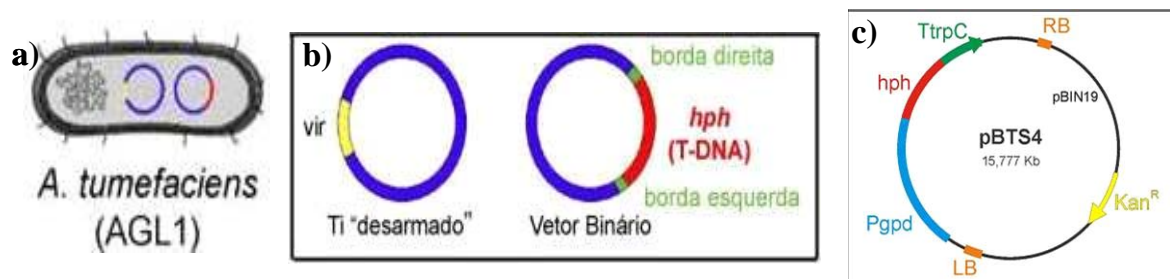
o emprego de células intactas tornando assim desnecessária a laboriosa obtenção de protoplastos, nem a necessidade de equipamentos caros como o acelerador de microprojéteis ou eletroporador é um dos atrativos que justificam seu emprego, assim como o fato de que qualquer segmento de DNA inserido entre as bordas esquerda e direita do T-DNA poder ser integrado no genoma do hospedeiro. Além disso, quando do emprego de vetores contendo seqüências que não apresentam homologia com o genoma da célula alvo, observa-se a ocorrência de integração aleatória do T-DNA em sítios únicos no genoma da célula hospedeira, o que tem estimulado o emprego desta metodologia para obtenção de mutantes, tornando esta técnica uma poderosa ferramenta em estudos de mutagênese insercional (MICHELSE et al., 2005).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 AMOSTRAS DE *CANDIDA* SPP, LINHAGEM BACTERIANA E VETOR BINÁRIO

As linhagens de *C. albicans* (Ca5'), *C. tropicalis* (C<sub>3</sub>) e *C. glabrata* (C<sub>6</sub>) foram isoladas da mucosa bucal de pacientes sadios da Clínica de Nutrição e Odontologia da Universidade Norte do Paraná (UNOPAR), submetidas a uma identificação preliminar em meio cromogênico diferencial Chromagar-*Candida* e posteriormente identificadas molecularmente pela técnica semi-nested PCR com o emprego de oligonucleotídeos iniciadores gênero- específico e espécie-específica.

A linhagem bacteriana empregada nos experimentos de transformação genética foi AGL-1::pBTS-4 (AGL-1 de *A. tumefaciens* - ATCC BAA-101 contendo o vetor binário pBTS-4) (dos REIS et al., 2001) (Figura 2a). O vetor binário apresenta clonado, entre as bordas direita e esquerda do plasmídio pBIN19, um cassete de expressão de resistência ao antibiótico higromicina-B (ROONEY et al., 2001) (Figura 2b). Este cassete de resistência é constituído pelo gene *hph* de *Escherichia coli*, sob o controle do promotor *Pgpd* de *Aspergillus nidulans* (Figura 2c).



**Figura 2** – Ilustração da linhagem bacteriana e do sistema binário empregado na transformação de *Candida* spp. a) Linhagem AGL-1 de *A. tumefaciens* contendo o sistema binário. b) Componentes do sistema binário. c) Vetor binário pBTS-4.

### **3.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DE HIGROMICINA PARA O CRESCIMENTO DE ESPÉCIES DO GÊNERO *CANDIDA***

Células de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* foram cultivadas por 18 horas em meio Sabouraud líquido (1% peptona; 4% glicose; 0,25% extrato de levedura) a 28°C sob agitação de 180 rpm. Após este período, as células foram submetidas a uma centrifugação inicial de 2000 rpm por 5 minutos, e posteriormente centrifugadas nas mesmas condições com a adição de água destilada esterilizada para retirada total do meio de cultura. O sedimento celular foi ressuscitado com água destilada esterilizada e a concentração ajustada para 10<sup>8</sup> células/mL.

A partir das suspensões obtidas, quantidades de 100 µL correspondentes a cada espécie de *Candida* foram plaqueadas (placas de Petri de 90 mm de diâmetro) em meio Sabouraud solidificado contendo diferentes concentrações de higromicina (50, 100, 150, 200, 250 e 300 µg/mL). As placas foram incubadas a 28°C por um período de 30 dias com finalidade de excluir a possibilidade do desenvolvimento de resistência por tempo de exposição por parte de alguma das amostras, ou perda da atividade do antibiótico.

A concentração na qual houve total inibição do crescimento fúngico foi utilizada na seleção de transformantes.

### **3.3 TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA MEDIADA POR *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*: PROCESSAMENTO DAS CÉLULAS FÚNGICAS, BACTERIANA E CO-CULTIVO**

As linhagens fúngicas foram inoculadas individualmente em 5 mL do meio Sabouraud líquido e incubadas por 18 horas a 28°C sob agitação de 180 rpm. Esta etapa foi repetida três vezes utilizando-se 100 µL de cada cultura para o inóculo da nova suspensão a ser cultivada, com o objetivo de se estabelecer um maior sincronismo de divisão e viabilidade celular. Após este período, as culturas foram centrifugadas a 2000 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento celular submetido a uma nova centrifugação (lavagem) com meio de indução (MI) (COVERT et al., 2001) nas mesmas condições. O sedimento celular resultante foi ressuscitado em 1 mL de MI acrescido de acetoseringona 200 mM/mL (MIAS). O número de células foi estimado através da câmara de Neubauer e a

concentração ajustada para  $10^7$ ,  $10^6$  e  $10^5$  células/mL.

A linhagem AGL-1::pBTS-4 de *A. tumefaciens* foi inoculada em 7 mL do meio Luria-Bertani (1% tripton; 0,5% extrato de levedura; 0,5% NaCl [pH= 7.2]) contendo os antibióticos estreptomicina e canamicina na concentração final de 50 µg/mL para manutenção dos vetores. A cultura foi incubada por 18 horas a 28°C sob agitação de 180 rpm. Após este período, foi determinada a densidade ótica (DO) da cultura no comprimento de onda de 660nm, a partir da qual se realizou uma diluição para a obtenção de uma densidade ótica final correspondente a 0,15 em 20 mL de meio MIAS. A nova cultura foi então incubada nas mesmas condições de cultivo mencionadas anteriormente até atingir uma DO de 0,6. A concentração foi então ajustada para  $10^9$  e  $10^8$  células da qual foi retirada uma alíquota para determinação da unidade formadora de colônia (UFC) e o restante da cultura foi utilizado no experimento de transformação.

Os co-cultivos foram realizados em microtubos de 1,5 mL, utilizando-se 100 µL das culturas ( $10^7$ ,  $10^6$  e  $10^5$  células/mL) de cada espécie de *Candida*, seguido da adição de 100 µL da cultura de *A. tumefaciens* ( $10^8$  células/mL) em cada um deles. Os microtubos contendo os referentes co-cultivos (bactéria e fungo) foram incubados a 28°C por 48 horas. Após este período fez-se o plaqueamento das amostras em meio seletivo solidificado (Sabouraud acrescido de higromicina 250 µg/mL e mefoxina 150 µg/mL), o qual foi submetido à incubação por 7 dias à temperatura de 28°C.

O mesmo protocolo descrito anteriormente foi realizado, utilizando-se porém 100 µL de uma cultura de *A. tumefaciens* na concentração de  $10^9$  células/mL, e temperatura de co-cultivo de 24°C. Ambos os protocolos de transformação genética mediada por *A. tumefaciens*, tanto em temperatura de co-cultivo de 28°C quanto em temperatura de 24°C, foram realizados em três experimentos distintos.

#### **3.4 CONFIRMAÇÃO FENOTÍPICA, ANÁLISE DA ESTABILIDADE MITÓTICA E NÍVEL DE RESISTÊNCIA À HIGROMICINA B DOS TRANSFORMANTES DE ESPÉCIES DO GÊNERO *CANDIDA***

As colônias resultantes, após plaqueamento do co-cultivo em meio seletivo, foram transferidas a um novo meio seletivo para confirmação fenotípica de resistência à higromicina. Dos transformantes confirmados, 100 colônias de cada espécie de *Candida* foram selecionadas aleatoriamente e submetidas a quatro repiques em meio Sabouraud

solidificado, e um último repique em meio seletivo, todos realizados em condições de incubação de 28°C por 18 horas, para a análise da estabilidade mitótica.

Uma nova seleção aleatória foi realizada, e 100 transformantes de cada espécie foram submetidos ao crescimento em meio Sabouraud solidificado acrescido de concentrações de 500 µg/mL e 750 µg/mL de Higromicina B, em condições de incubação de 28°C, com a finalidade de avaliar o nível de resistência ao antibiótico.

### **3.5 ANÁLISE MOLECULAR DOS TRANSFORMANTES DE *C. ALBICANS*, *C. TROPICALIS* E *C. GLABRATA***

O DNA genômico das linhagens selvagens e dos transformantes estáveis mitoticamente foi obtido conforme descrito por Gácsér e colaboradores em 2005, com algumas modificações. Cada amostra a ser analisada foi incubada a 28°C por 18 horas em 5 mL de meio Sabouraud líquido. Após este período, as culturas foram transferidas para microtubos de 1,5 mL, centrifugadas a 2000 rpm durante 5 minutos e submetidos a uma nova centrifugação com água destilada esterilizada nas mesmas condições para retirada do meio de cultura restante.

O sedimento celular foi ressuspendido em 725 µL de tampão de lise TENTIS (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, 10 mM NaAc, 1% SDS, 2% Triton X-100), seguido pela adição de pérolas de vidro e forte agitação com auxílio de um agitador tipo vortex por 3 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL e 275 µL de acetato de amônio 7M (pH=7) foi adicionado. As amostras foram então incubadas em banho-maria a 65°C por 5 minutos e logo em seguida em gelo por adicionais 5 minutos. Após esta etapa, 500 µL de clorofórmio foi adicionado. As amostras foram homogeneizadas e submetidas a uma centrifugação de 13000 rpm durante 10 minutos. Os sobrenadantes foram transferidos para novos microtubos e precipitado com etanol absoluto gelado por 18 horas a -20°C. Cada amostra foi centrifugada a 10000 rpm por 10 minutos e lavada com álcool etílico 70 % gelado nas mesmas condições de centrifugação. Após secagem e eluição do DNA com 20 µL de água ultrapura esterilizada, as amostras foram tratadas com RNase A e a qualidade e quantidade do DNA extraído foi determinado por eletroforese em gel de agarose 0.8 % em tampão de corrida TEB 1%.

A confirmação molecular quanto à presença do gene *hph* foi realizada pelo

emprego da reação em cadeia da polimerase (PCR). Os oligonucleotídeos iniciadores empregados foram: *Hph1* (5'-TTCGATGTAGGAGGGCGTGGAT-3') e *Hph2* (5'-CGCGTCTGCTGCTCCATACAAG-3'). As reações de amplificação foram realizadas nas seguintes condições: um ciclo inicial de 5 minutos a 94° C, seguido de 35 repetições do ciclo de 94° C (desnaturação), 60° C (anelamento) e 72° C (extensão), respectivamente, de 1 minuto em cada temperatura. A reação se encerra com um ciclo de extensão de 5 minutos a 72° C. O produto da amplificação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1 % em tampão de corrida TEB 1%, e analisado após coloração do gel com brometo de etídeo.

A técnica de Dot-blot foi realizada com 100 ng do DNA genômico das linhagens selvagens de *C. albicans* (Ca5'), *C. tropicalis* (C<sub>3</sub>) e *C. glabrata* (C<sub>6</sub>) e de 8 transformantes de cada espécie, empregando protocolo descrito por Sambrook e Russel (2001).

As membranas de náilon foram hibridadas por 20 horas a 40°C com a sonda correspondente a um fragmento (produto de PCR) de 600 pares de bases do gene *hph* purificado pelo emprego do High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Applied Science), marcadas e detectadas com o sistema digoxigenina (DIG High Prime DNA labeling and Detection Starter) (Roche Applied Science), segundo recomendação do fabricante.

### **3.6 ANÁLISE DOS CO-CULTIVOS EMPREGANDO MICROSCOPIA ELETRÔNICA**

Um novo experimento de transformação genética mediada por *A. tumefaciens* foi realizado para cada espécie de *Candida* como descrito anteriormente, visando à análise óptica da interação do par *Candida-Agrobacterium* na condição de co-cultivo.

#### **3.6.1 Microscopia Eletrônica de Varredura**

Dos co-cultivos obtidos após 48 horas, alíquotas referentes a cada uma das espécies de *Candida* foram depositadas sobre lamínulas tratadas com poli-L-lisina e submetidas a um período de repouso de 1 hora para a sedimentação e adesão celular.

Após este período, as amostras foram fixadas com solução de glutaraldeído

2,5% (Electron Microscopy Sciences) em tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,2) a 8°C por 12 horas. As lamínulas foram então submetidas a lavagens de 5 minutos com tampão fosfato 0,1 M (pH 7,2) e pós-fixadas com tetróxido de ósmio ( $\text{OsO}_4$ ) 1% diluído em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,2) por 1 hora. O material foi novamente lavado em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,2), e desidratado em uma série de concentrações crescentes de etanol (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% e absoluto).

As amostras foram secas ao ponto crítico (BALTEC SDC 030 Critical Point Dryer), recobertas com uma camada de ouro de 25 nm de espessura (BALTEC SCD 050 Sputter Coater) e observadas ao microscópio eletrônico de varredura Quanta 200 (FEI).

### **3.6.2 Microscopia eletrônica de transmissão**

O mesmo experimento de transformação genética foi utilizado para análise ao microscópio eletrônico de transmissão. O co-cultivo obtido referente a cada espécie de *Candida* foi fixado, lavado e pós-fixado de acordo com as condições descritas anteriormente para microscopia eletrônica de varredura. No entanto, para as lavagens e soluções foi utilizado o tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2). A desidratação foi realizada em uma série de concentrações crescentes de acetona (30%, 50%, 70%, 80%, 90% e 100%) e o material foi embebido e incluído em resina Spurr (Electron Microscopy Sciences).

Cortes de 70 nm obtidos em ultramicrotomo (Leica Ultracut UCT) foram coletados em telas de cobre de 200 *mesh* e contrastados com acetato de uranila 2% e citrato de chumbo. O material foi observado ao microscópio eletrônico de transmissão TECNAI 12 (FEI) e as imagens capturadas com auxílio do Soft Imaging System.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 TRANSFORMAÇÃO DE ESPÉCIES DO GÊNERO *CANDIDA* MEDIADA POR *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

Para o emprego de marcadores de resistência em experimentos de transformação genética, no caso a resistência ao antibiótico Higromicina B, conferida pelo gene *hph*, faz-se necessário a análise preliminar da sensibilidade da célula hospedeira a referida droga. Desta forma, foi determinada a concentração inibitória mínima deste antibiótico, plaqueando-se  $10^7$  células de *C. albicans* (Ca5'), *C. tropicalis* (C<sub>3</sub>) e *C. glabrata* (C<sub>6</sub>) em meio Sabouraud solidificado acrescido de concentrações crescentes de Higromicina B. Interessante citar que para a determinação da concentração inibitória mínima foram utilizadas placas de Petri de 90 mm de diâmetro, uma vez que a dimensão da placa pode influenciar a inibição do crescimento das células pelo antibiótico, cuja ação é dependente da densidade celular.

O crescimento das três linhagens fúngicas foi totalmente inibido na concentração de 150 µg/mL. Como critério de segurança, foi utilizada a concentração de 250 µg/mL de higromicina B para a seleção dos transformantes.

A metodologia de transformação genética via *A. tumefaciens* (AMT-*Agrobacterium mediated transformation*) proposta no presente trabalho foi aplicada com sucesso para a transformação de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*. Os resultados obtidos estão apresentados nas Tabelas 1 e 2.

**Tabela 1** – Transformação de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* via *A. tumefaciens* em co-cultivo realizado à 28°C

Espécie de <i>Candida</i> (linhagem)	Nº de células alvo	Razão Agro/ <i>Candida</i>	Nº de transformantes		
			<u>Experimento 1</u>	<u>Experimento 2</u>	<u>Experimento 3</u>
<i>C. albicans</i> (Ca5 <sup>+</sup> )	10 <sup>4</sup>	1000/1	1472	1117	1375
	10 <sup>5</sup>	100/1	1235	1284	1439
	10 <sup>6</sup>	10/1	1266	1209	1457
<i>C. tropicalis</i> (C <sub>3</sub> )	10 <sup>4</sup>	1000/1	218	103	1329
	10 <sup>5</sup>	100/1	128	110	389
	10 <sup>6</sup>	10/1	201	287	217
<i>C. glabrata</i> (C <sub>6</sub> )	10 <sup>4</sup>	1000/1	02	00	00
	10 <sup>5</sup>	100/1	01	03	8
	10 <sup>6</sup>	10/1	38	44	68

**Tabela 2** – Transformação de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* via *A. tumefaciens* em co-cultivo realizado à 24°C

Espécie de <i>Candida</i> (linhagem)	Nº de células alvo	Razão Agro/ <i>Candida</i>	Nº de transformantes		
			<u>Experimento 1</u>	<u>Experimento 2</u>	<u>Experimento 3</u>
<i>C. albicans</i> (Ca5 <sup>+</sup> )	10 <sup>4</sup>	10000/1	320	308	511
	10 <sup>5</sup>	1000/1	739	595	667
	10 <sup>6</sup>	100/1	618	867	704
<i>C. tropicalis</i> (C <sub>3</sub> )	10 <sup>4</sup>	10000/1	426	1417	1381
	10 <sup>5</sup>	1000/1	1612	1324	1275
	10 <sup>6</sup>	100/1	1439	1358	1429
<i>C. glabrata</i> (C <sub>6</sub> )	10 <sup>4</sup>	10000/1	00	02	05
	10 <sup>5</sup>	1000/1	18	31	23
	10 <sup>6</sup>	100/1	83	67	54

Muitos parâmetros podem influenciar a eficiência de transformação via *A. tumefaciens*, sendo necessária a otimização do protocolo de acordo com as características do material biológico a ser transformado. Dentre estes, tem-se como principais a linhagem de *Agrobacterium* empregada no experimento, fatores relacionados às condições de co-cultivo como a razão entre células de *Agrobacterium* e do hospedeiro, assim como o tempo e temperatura de incubação do co-cultivo. O tipo de membrana utilizada em co-cultivo realizado em sistema sólido, e o pH do meio de indução também são parâmetros importantes

(MCCLELLAND et al., 2005; MICHELSE, et al., 2005; SUGUI, et al., 2005).

No presente trabalho, alguns destes parâmetros foram analisados, sendo estes, diferentes concentrações de células alvo ( $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ) e de *Agrobacterium* ( $10^7$  e  $10^8$ ), e temperaturas de co-cultivo distintas (24°C e 28°C).

A influência da temperatura de co-cultivo na frequência de transformação foi variável, em função da espécie de *Candida* considerada (Tabelas 1 e 2). O número de transformantes de *C. albicans* foi maior quando a temperatura de co-cultivo foi de 28°C, comparativamente ao obtido em 24°C. Já para as espécies *C. tropicalis* e *C. glabrata* a diminuição da temperatura de co-cultivo resultou numa maior frequência de transformação.

Segundo a literatura, a temperatura de co-cultivo exerce influência sobre a eficiência de transformação, sendo os melhores resultados obtidos entre faixas de 22°C a 25°C (MICHELSE et al., 2005).

A menor frequência de transformação de *C. albicans* observada em co-cultivo realizado a 24°C pode ser decorrente do fato desta temperatura ser sub-ótima para seu desenvolvimento. O aumento do número de transformantes em função do aumento do número de células alvo (Tabela 2) sugere a possibilidade de um maior número de células estarem aptas a formar pares-conjugativos com *Agrobacterium*, e conseqüente transferência e expressão do T-DNA, resultando numa melhor eficiência de transformação.

Como observado nas Tabelas 1 e 2, o número de transformantes obtidos de *C. tropicalis* não variou significativamente em função da razão de células de *Agrobacterium* e células alvo. Desta forma, a razão celular estabelecida nos experimentos, tanto em 28°C quanto 24°C, não foi um parâmetro diferencial para a eficiência de transformação desta espécie. Para *C. albicans* também não foi observado variação no número de transformantes obtidos em resposta as diferentes concentrações celulares empregadas, quando o co-cultivo foi realizado a 28°C (Tabela 1). No entanto, observou-se variação na frequência de transformação em função do aumento da concentração celular de células alvo, quando o co-cultivo foi realizado a 24°C (Tabela 2). Este resultado pode estar relacionado ao efeito desta temperatura sobre as células desta espécie, como mencionado anteriormente. Já para *C. glabrata* houve um aumento no número de transformantes em função do aumento da concentração celular de células alvo em ambas as temperaturas de co-cultivo empregadas.

Segundo revisão de Michielse et al. (2005) na maioria dos estudos de transformação genética via *A. tumefaciens*, observou-se que o aumento do número celular tanto de *Agrobacterium* quanto de células alvo, resulta em aumento da eficiência de transformação. Entretanto, o aumento excessivo da concentração celular de ambos pode

resultar na diminuição desta eficiência. É relatado na maioria dos estudos que o emprego de  $10^7$  e  $10^8$  células de *Agrobacterium* no co-cultivo gera melhores resultados, e ordens menores ( $10^6$ ) e maiores ( $10^9$ ) resultam em menor número de transformantes, possivelmente devido a limitações espaciais e nutricionais (BUNDOCK et al., 1995; BUNDOCK et al., 1999; ABUODEH, et al., 2000; SULLIVAN et al., 2002; LEAL et al., 2004; dos REIS et al., 2004; McCLELLAND et al., 2005; LIMA, et al., 2006; SUGUI, et al., 2005).

Segundo Sullivan e colaboradores (2002), o emprego tanto de altas concentrações celulares como de baixas podem estabelecer uma mesma razão entre células de *Agrobacterium* e células alvo, porém razões estabelecidas com concentrações celulares menores geram um melhor resultado. Contudo, segundo os autores, cada modelo biológico apresenta uma combinação ótima de parâmetros de co-cultivo visando à obtenção de um número máximo de transformantes.

A frequência de transformação obtida para as linhagens Ca5' (*C. albicans*) e C<sub>3</sub> (*C. tropicalis*) corroboram com, e até superam as frequências obtidas para fungos filamentosos, leveduras e fase leveduriforme de fungos dimórficos empregando a metodologia de AMT (BUNDOCK et al., 1995; BUNDOCK et al., 1999; ABUODEH, et al., 2000; SULLIVAN et al., 2002; LEAL et al., 2004; REIS et al., 2004; McCLELLAND et al., 2005; LIMA, et al., 2006; DUARTE et al., 2007), sendo obtido até 01 transformante para cada 10 células alvo, dependendo da condição de co-cultivo analisada. Já para a linhagem C<sub>6</sub> (*C. glabrata*) foi observada uma baixa frequência de transformação nas condições de co-cultivo testadas, quando comparada às demais espécies de *Candida* transformadas.

Uma hipótese para este resultado pode ser o fato desta espécie ser haplóide. Desta forma, a integração do T-DNA em regiões essenciais para viabilidade celular não pode ser compensada como ocorre nas demais espécies diplóides, resultando na morte da célula transformada. Outro fato que sustenta esta possibilidade é o aumento diretamente proporcional do número de transformantes de *C. glabrata* com o aumento do número de células alvo (Tabelas 1 e 2).

Outra hipótese que poderia explicar a baixa eficiência de transformação, seria de que a linhagem bacteriana não seja capaz de formar o par conjugativo com as células de *C. glabrata* de forma eficaz como observado para as demais espécies testadas. Desta forma, o aumento da concentração celular de *A. tumefaciens* resultaria no aumento do número de transformantes, o que não foi observado nas diferentes condições de co-cultivo (Tabelas 1 e 2). Além disso, as análises do par *Agrobacterium-Candida* em co-cultivo através das microscopias eletrônicas de varredura e transmissão revelaram o mesmo perfil de interação

entre o *Agrobacterium* e as três espécies de *Candida* transformadas. Outras hipóteses também podem ser postuladas, como limitações referentes à construção gênica e ao vetor utilizado (pBTS-4) particularmente para esta espécie.

O emprego de AMT para *C. albicans* e *C. tropicalis* resultou em alta eficiência na obtenção de transformantes, chegando a números de 1472 e 1612, respectivamente. A AMT da espécie *C. glabrata* resultou numa menor frequência, gerando um número máximo de 83 transformantes. Gácsér e colaboradores em 2005, empregando as metodologias de eletroporação e acetato de lítio para transformação de *C. parapsilosis*, obtiveram um número de 150 transformantes integrativos ao utilizar 20µg de DNA e  $10^8$  células alvo e 0,1 transformantes por µg de DNA e  $10^8$  células alvo, respectivamente. Yehuda e colaboradores em 2001, também empregando estas metodologias, porém para transformação de *C. oleophila*, obtiveram um número de 125 transformantes integrativos ao utilizar 1 µg de DNA e  $10^8$  células alvo na eletroporação e 0,32 transformantes por µg de DNA e  $10^8$  células alvo na metodologia de acetato de lítio. Gietz e Wood em 2001, em revisão dos principais métodos de transformação de leveduras, relatam eficiências de transformação de *C. albicans* que abrangem faixas de 50 a 300 transformantes integrativos por µg de DNA, dependendo da metodologia utilizada. O número de células alvo utilizado nestes experimentos varia entre  $10^7$  e  $10^9$  por mL. Dmytruk e colaboradores em 2006 obtiveram aproximadamente 200 transformantes integrativos de *C. famata* por µg de DNA, empregando a metodologia de esferoplastos com a adição de endonucleases de restrição. François e colaboradores em 2003 obtiveram de 100 a 200 transformantes integrativos de *C. lusitaniae* por µg de DNA através da eletroporação. Rohrer e Picataggio em 1992, através da metodologia de eletroporação obtiveram 45 transformantes integrativos de *C. tropicalis* por µg de DNA.

Neste trabalho, para o estabelecimento da metodologia de transformação genética de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* mediada por *A. tumefaciens* foram feitas modificações em relação aos protocolos comumente descritos. Nestes protocolos, o co-cultivo é realizado sobre a superfície de membranas (nitrocelulose, celulose ou náilon) e, após o período de incubação, as membranas são transferidas para o meio de seleção (De GROOT et al., 1998; MULLINS et al., 2001; SULLIVAN et al., 2002; LIMA et al., 2006; DUARTE et al., 2007; MATTA et al., 2007). Outro protocolo utilizado, principalmente para as leveduras e fases leveduriformes de fungos dimórficos, também se baseia no emprego de membranas para o co-cultivo, entretanto, as membranas não são transferidas como no protocolo anterior, e sim lavadas com solução salina ou água destilada esterilizada e a suspensão celular é plaqueada em meio seletivo (BUNDOCK et al., 1995, 1999; ABUODEH et al., 2000; LEAL et al., 2004;

MCCLELLAND et al., 2005; ALMEIDA et al., 2007).

Para a transformação de espécies do gênero *Candida* mediada por *A. tumefaciens*, o emprego de membranas foi descartado devido a alguns fatores. Em experimentos preliminares realizados em nosso laboratório, para as três espécies analisadas (*C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*), as colônias resultantes após transferência da membrana contendo o co-cultivo para meio de seleção, quando submetidas à confirmação fenotípica quanto a resistência à Higromicina B e a análise da estabilidade mitótica, demonstraram resultados falso-positivos. A suspeita de falsos transformantes foi confirmada pela ausência do produto de amplificação em parte das amostras após análise por PCR (dados não mostrados). Estes resultados sugerem que a membrana possa representar uma barreira para a ação eficaz da droga utilizada na seleção de transformantes, podendo dessa maneira resultar no crescimento de falsos transformantes. O protocolo que lança mão da recuperação dos transformantes a partir da membrana por lavagem não foi testado, por acreditarmos que este procedimento pode resultar em super-estimativa da frequência de transformação e conseqüente geração de clones, visto que a possível presença de colônias (no caso de leveduras) no co-cultivo ao serem submetidas à lavagem se dispersam, sendo caracterizadas como transformantes distintos após crescimento em meio de seleção. Alguns protocolos ainda realizam uma pré-incubação das células após o co-cultivo, antes do plaqueamento em meio seletivo. Esta estratégia também pode super-estimar o número de transformantes, visto que o tempo desta pré-incubação muitas vezes é superior ao tempo de geração (ciclo celular) de espécies de *Candida*, permitindo desta forma a multiplicação celular dos possíveis transformantes.

Outro fato analisado por Sugui e colaboradores (2005), na transformação de *Aspergillus fumigatus* via *A. tumefaciens*, foi a influência que o tipo de membrana (nitrocelulose, celulose ou náilon) exerce na eficiência de transformação, também relatado em outros trabalhos (MICHIELSE et al. 2005). Este fato ocorre possivelmente devido a diferenças de composição e propriedades químicas destas membranas, que podem afetar a distribuição e/ou interação entre as células da bactéria e do hospedeiro, assim como diferenças na capacidade de difusão de compostos, inclusive antibióticos, por estas membranas.

Para contornar as limitações metodológicas mencionadas acima, a etapa de co-cultivo foi modificada, sendo realizada em microtubos contendo meio líquido como descrito no item Materiais e Métodos, e as células plaqueadas diretamente em meio de seleção.

O crescimento de colônias transformantes Higromicina B-resistentes foi

constatado a partir do segundo dia de incubação após o plaqueamento do co-cultivo em meio seletivo. Transformantes de *C. glabrata* foram recuperados após 48 de incubação, sendo que o surgimento de transformantes de *C. albicans* e *C. tropicalis* ocorreu no decorrer de uma semana.

Embora os testes de concentração inibitória mínima, para as três espécies de *Candida*, tenham sido realizados empregando-se um período longo de incubação (30 dias), a recuperação de transformantes foi realizada até o 7º dia, com a finalidade de prevenir a perda da ação do antibiótico e possível crescimento de transformantes falso-positivos, assim como colônias resistentes ou tolerantes a doses sub-inibitórias da droga. A presença de restos celulares de bactérias mortas pela ação da mefoxina no meio de seleção também pode interferir, visto que altera a densidade celular no meio e serve como fonte alternativa de nutrientes.

Além das medidas de prevenção realizadas anteriormente, as colônias resultantes do co-cultivo plaqueadas em meio de seleção ainda foram transferidas e submetidas ao crescimento em um novo meio de seleção, para confirmação do fenótipo de resistência ao antibiótico Higromicina B. Todas as colônias transferidas apresentaram crescimento na concentração de 250 µg/mL da droga.

Do total de transformantes confirmados, 100 colônias de cada espécie fúngica foram aleatoriamente selecionadas e analisadas quanto à estabilidade mitótica, sendo que após quatro repiques em meio não seletivo, todos os transformantes de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* analisados cresceram quando expostos ao antibiótico na concentração de 250 µg/mL em meio Sabouraud solidificado, sendo dessa forma estáveis mitoticamente.

Os transformantes também foram analisados quanto ao nível de resistência a concentrações de 500 µg/mL e 750 µg/mL do antibiótico. Em concentração de 500 µg/mL da droga, houve o crescimento de 100%, 97% e 90% dos transformantes de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*, respectivamente. Já na concentração de 750 µg/mL, observou-se a diminuição destes índices, sendo que 74%, 29% e 68% dos transformantes de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* cresceram nesta condição, respectivamente.

A capacidade de gerar um grande número de transformantes não é a única característica desejada no estabelecimento de uma determinada metodologia de transformação. A simplicidade e reprodutibilidade de execução metodológica, a maleabilidade quanto ao emprego e competência em atender os requisitos necessários como ferramenta de biologia molecular também são características importantes.

Muitos trabalhos de AMT consideram o crescimento na placa de co-cultivo

como sendo o número real de transformantes obtidos. Como constatado em alguns trabalhos, existem variações significativas quanto ao número de transformantes obtidos diretamente a partir do co-cultivo em relação àqueles que são confirmados fenotipicamente, refletindo a ocorrência de falsos transformantes. Outra questão fundamental é a obtenção de transformantes estáveis. Poucos estudos realizam a análise da estabilidade mitótica, e nestes, também são observadas variações significativas pela presença de transformantes abortivos (COVERT et al. 2001; RHO, et al. 2001; FITZGERALD et al. 2003; MEYER et al. 2003; REIS et al. 2004, DUARTE et al., 2007; MATTA et al., 2007).

São raros os relatos deste tipo de análise para transformantes de *Candida*, sendo que no geral, somente a confirmação fenotípica em relação a marca seletiva empregada é realizada. Como demonstrado por De Backer e colaboradores (1999), do total de transformantes de *C. albicans* obtidos pelo emprego de esferoplastos, constatou-se após o replaqueamento em meio seletivo que 70% a 90% dos transformantes eram abortivos. Também tem sido relatada a limitação do número de transformantes integrativos, assim como a estabilidade de transformantes obtidos pelas diversas metodologias de transformação estabelecidas para espécies do gênero *Candida* (DE BACKER et al., 2000; GIETZ e WOODS, 2001).

Como mencionado anteriormente, outro parâmetro que pode afetar a eficiência de transformação por ATM é o vetor binário utilizado. Há variações significativas na eficiência de transformação de acordo com o vetor utilizado (ABUODEH et al., 2000; SULLIVAN et al., 2002; DOS REIS et al., 2004; DUARTE et al., 2007), e em alguns casos, até a ausência de transformantes (LEAL et al., 2004).

O vetor pBTS-4, utilizado no presente trabalho, demonstrou ser eficiente para transformação de espécies de *Candida*, possibilitando a obtenção de um maior número de transformantes quando comparado aos resultados obtidos para *Blastomyces dermatitidis* e *Histoplasma capsulatum* (SULLIVAN et al., 2002), e *Beauveria bassiana* (DOS REIS et al., 2004), estudos que também empregaram a metodologia de AMT e o mesmo vetor.

No estudo de dos Reis e colaboradores em 2004 citado acima, três vetores foram utilizados para transformação de *B. bassiana*, e constatou-se diferenças na estabilidade mitótica dos transformantes de acordo com o vetor (faixas entre 80% a 100%), sendo o melhor resultado gerado pelo emprego do vetor pBTS-4. Nossos resultados de estabilidade mitótica corroboram com este estudo, cujo a estabilidade mitótica dos transformantes analisados foi de 100%.

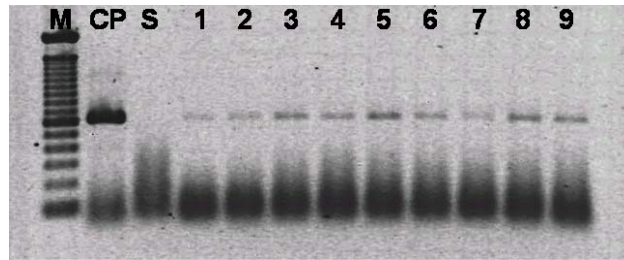
A utilização de marcadores de seleção de resistência à quimioterápicos para

espécies de *Candida* se faz atrativo e vantajoso, pois sabe-se que a expressão de marcadores auxotróficos, como o extensivamente utilizado *URA3*, influenciam a morfogênese, adesão e virulência em espécies de *Candida*. Em alguns casos, demonstram-se diferentes níveis de expressão de acordo com a posição de integração no genoma, e sabe-se que pequenas variações na expressão de *URA3* são suficientes para causar alterações fenotípicas em *Candida*. Tem sido sugerido que mais de 30% dos mutantes de virulência obtidos são decorrentes da expressão do marcador *URA3* e foram erroneamente caracterizados, como se a deleção de outros genes fossem responsáveis por tais alterações. Outras etapas à que as células são submetidas, como a exposição ao ácido 5-fluoro-orótico (5-FOA) na seleção de colônias *URA3*<sup>+</sup>, também interferem na interpretação dos possíveis defeitos de virulência observados, visto que gera rearranjos cromossômicos e outras anormalidades genéticas (DE BACKER et al., 2000; MAGEE et al., 2003; NOBLE e JOHNSON, 2005; WELLINGTON E RUSTCHENKO, 2005). Outra vantagem de marcadores de seleção de resistência está no fato de qualquer linhagem poder ser transformada, dispensando a necessidade do emprego de mutantes auxotróficos caracterizados.

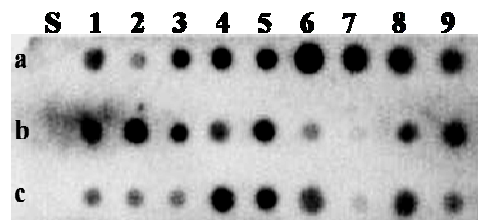
No presente trabalho, foi utilizado como marcador de seleção o gene *hph*, que confere resistência ao antibiótico Higromicina B, contornando desta maneira as limitações quanto ao uso de marcadores auxotróficos, como mencionado anteriormente.

## 4.2 ANÁLISE MOLECULAR DOS TRANSFORMANTES

A confirmação molecular do fenótipo de resistência observado em placa foi realizada pelo emprego das técnicas de PCR e Dot-Blot. Observou-se a presença do produto de amplificação (600pb) correspondente ao gene *hph* em todos os transformantes testados para as três espécies através da PCR (Figura 3), assim como a hibridização positiva da sonda correspondente ao gene *hph* com o DNA de todos transformantes testados (Figura 4), confirmando dessa maneira a presença do T-DNA no genoma das células fúngicas. Observa-se ausência de produto de amplificação (Figura 3) e de sinal de hibridação (Figura 4) correspondente ao DNA genômico das linhagens selvagens. A análise quanto ao tipo de integração está sendo realizada através da técnica de Southern Blot para verificar se ocorreu de forma randômica e em sítios únicos no genoma das células fúngicas, como é característica da metodologia de transformação via *A. tumefaciens* quando empregado vetores com sequências a serem transferidas não homólogas ao genoma da célula hospedeira.



**Figura 3** – Confirmação da presença do produto de amplificação de 600 pb, correspondente à parte do gene *hph*, dos transformantes de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* por PCR. M) Padrão de peso molecular (100 pb). CP) Controle positivo. S) Linhagens selvagens (Ca5<sup>7</sup>; C<sub>3</sub> e C<sub>6</sub>). 1, 2 e 3) Transformantes de *C. albicans*. 4, 5 e 6) Transformantes de *C. tropicalis*. 7, 8 e 9) Transformantes de *C. glabrata*.



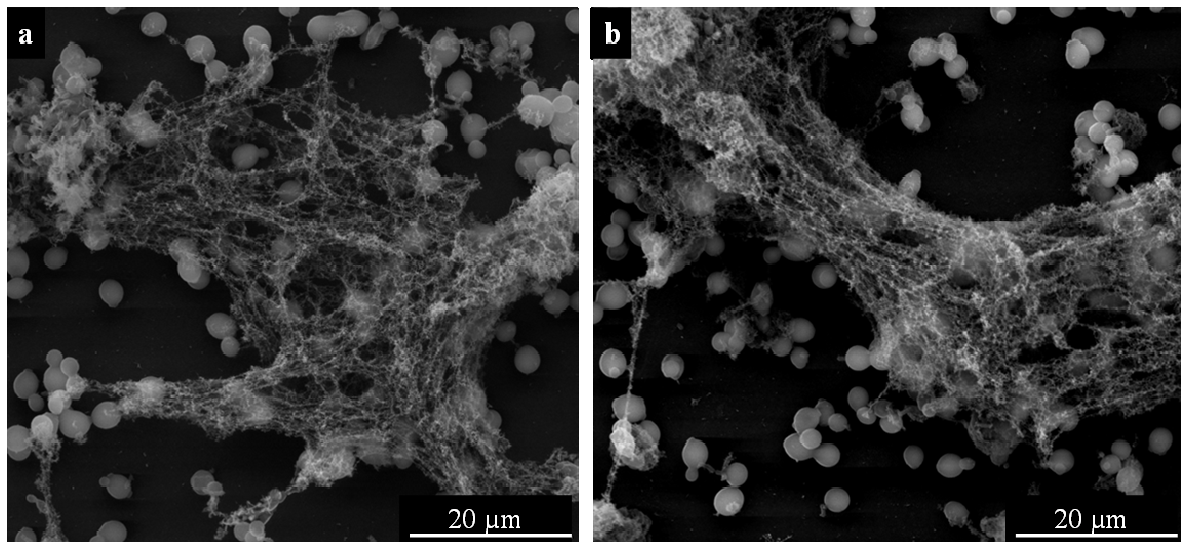
**Figura 4** – Análise de Dot-blot para a confirmação da presença do gene *hph*, hibridizado com a sonda correspondente a um fragmento do gene *hph* (produto de PCR), das linhagens selvagens e dos transformantes de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*. a) Linhagem selvagem (S) e transformantes de *C. albicans* (1 a 9). b) Linhagem selvagem (S) e transformantes de *C. tropicalis* (1 a 9). c) Linhagem selvagem (S) e transformantes de *C. glabrata* (1 a 9).

#### 4.3 ANÁLISE DO CO-CULTIVO ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA

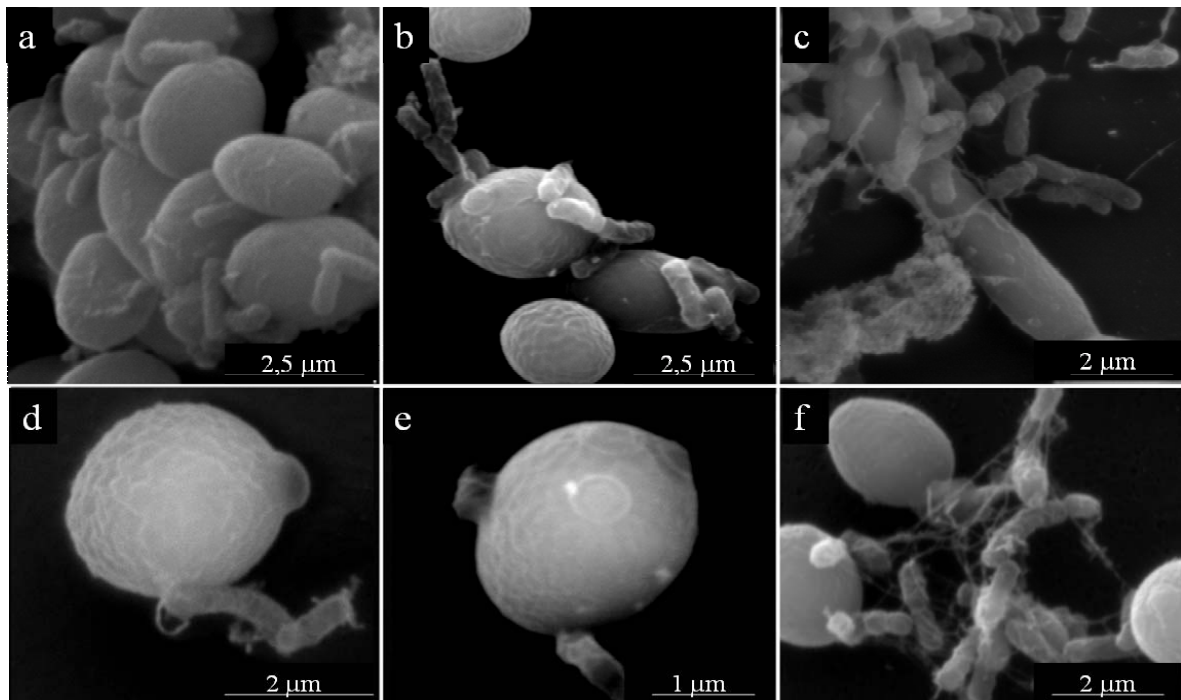
A análise dos co-cultivos referentes a cada espécie de *Candida* empregando-se microscopia eletrônica, tanto de varredura quanto de transmissão, foi realizada com a finalidade de observar possíveis interações entre o par *Agrobacterium-Candida*.

Como demonstrado nas Figuras 5 e 6, percebe-se a inexistência da formação de estruturas de dimensões bem delimitadas semelhante ao “*T-Pilus*” entre as células de *Candida* e *Agrobacterium*, nem entre células bacterianas, como relatado para modelos vegetais (FULLNER et al., 1996; KADO, 2000; LAI e KADO; 2000; TZFIRA e

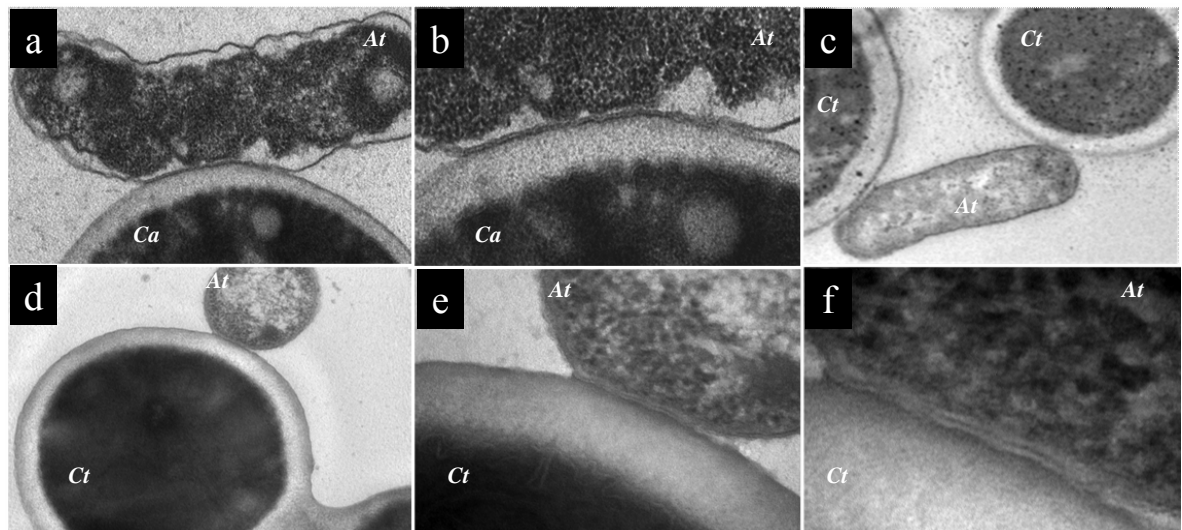
CITOVSKY, 2000) e demonstrado para o fungo filamentosso *Metarhizium anisopliae* (DUARTE et al., 2007). Pode-se observar, no entanto, a produção de biofilme pelas células fúngicas das três espécies, formando uma rede onde se encontram envolvidas também células bacterianas (Figura 5 a-b), assim como a produção de substâncias extracelulares pelas células, formando finos filamentos irregulares entre elas (tipo microfibrilas) (Figura 6c-f), sendo predominante o contato direto entre as paredes celulares dos microrganismos (Figuras 6 a-b-d-e, 7 e 8). Não houve diferenças entre as três espécies quanto ao perfil de interação do par *Agrobacterium/Candida* nas condições de co-cultivo analisadas, tanto qualitativa quanto quantitativamente, sendo observado o mesmo padrão de interação descrito acima entre elas.



**Figura 5** – Eletromicrografia de varredura do par *Agrobacterium-Candida* em co-cultivo. a) Células de *C. albicans* e *Agrobacterium* em co-cultivo a 28°C envolvidas por rede de matriz extracelular (biofilme). b) Células de *C. tropicalis* e *Agrobacterium* em co-cultivo a 28°C envolvidas por rede de matriz extracelular (biofilme).



**Figura 6** – Eletromicrografia de varredura do par *Agrobacterium-Candida* em co-cultivo a 28°C. a-b-e) Contato direto entre células de *C. glabrata* e *Agrobacterium*. c) Presença de filamentos irregulares e aglomerados amorfos de matriz extracelular entre *C. albicans* e *Agrobacterium*. d) Contato direto entre células de *C. tropicalis* e *Agrobacterium*. f) Presença de filamentos irregulares de matriz extracelular entre *C. glabrata* e *Agrobacterium*.



**Figura 7** – Eletromicrografia de transmissão do par *Agrobacterium-Candida* em co-cultivo a 28°C. a, b) Mesma eletromicrografia mostrando o contato direto entre células de *C. albicans* (Ca) e *A. tumefaciens* (At) em aumentos de 46.000X e 96.000X, respectivamente. c) Contato direto entre células de *C. tropicalis* e *A. tumefaciens* em aumento de 18.500X. d, e, f) Mesma eletromicrografia mostrando o contato direto entre células de *C. tropicalis* e *A. tumefaciens* em aumentos de 37.000X, 135.000X e 310.000X, respectivamente.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A metodologia proposta para transformação genética de espécies do gênero *Candida* no presente trabalho, demonstrou ser eficiente para a geração de transformantes integrativos estáveis, atendendo de maneira competente aos requisitos fundamentais para o seu emprego como ferramenta de biologia molecular, sendo simples, reprodutível e altamente explorável quanto à análise da expressão gênica. O gênero *Candida* conta com mais de 300 espécies, portanto, esta metodologia pode ser explorada e empregada para a transformação de outras espécies de importância clínica, assim como espécies envolvidas em processos de melhoramento genético através da biotecnologia, como fermentação, produção de proteínas recombinantes e metabólitos secundários de interesse, e biocontrole, atendendo tanto a área médica quanto o setor industrial alimentício, entre outros.

## 6 CONCLUSÕES

- A linhagem AGL-1 foi efetiva na transformação de *C. albicans* (Ca5'), *C. tropicalis* (C<sub>3</sub>) e *C. glabrata* (C<sub>6</sub>);
- A influência da temperatura de co-cultivo na eficiência de transformação foi variável para as espécies de *Candida* analisadas;
- A eficiência de transformação em função do número de células alvo empregado nas transformações foi variável para as espécies de *Candida* analisadas;
- AMT permitiu a obtenção de transformantes de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* mitoticamente estáveis;
- A interação de AGL-1 com células de *Candida* no co-cultivo parece ocorrer pelo contato direto.

## REFERÊNCIAS

ABU-ARISH, A.; FRENKIEL-KRISPIN, D.; FRICKE, T.; TZFIRA, T.; CITOVSKY, V.; WOLF, S. G.; ELBAUM, M. Three-dimensional reconstruction of *Agrobacterium* VirE2 protein with single-stranded DNA. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 25359-25363, 2004.

ABUODEH, R. O.; ORBACH, M. J.; MANDEL, M. A.; DAS, A.; GALGANI, J. N. Genetic transformation of *Coccidioides immitis* facilitated by *Agrobacterium tumefaciens*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, p. 2106-2110, 2000.

AKPAN, A.; MORGAN, R.; Oral candidiasis. **Postgraduate Medicine Journal**, v. 78, p. 455-459, 2002.

ALMEIDA, A.J.; CARMONA, J.A.; CUNHA, C.; CARVALHO, A.; RAPPLEYE, C.A.; GOLDMAN, W.E.; HOOYKAAS, P.J.; LEÃO, C.; LUDOVICO, P.; RODRIGUES, F. Towards a molecular genetic system for the pathogenic fungus *paracoccidioides brasiliensis*. **Fungal Genetics and Biology** (2007). Doi: 10.1016/j.fgb.2007.04.004.

ALMIRANTE, B.; RODRÍGUEZ, D.; PARK, B.J.; CUENCA-ESTRELLA, M.; PLANES, A.M.; ALMELA, M.; MENSA, J.; SANCHEZ, F.; AYATS, J.; GIMENEZ, M.; SABALLS, P.; FRIDKIN, S.K.; MORGAN, J.; RODRIGUEZ-TUDELA, J.L.; WARNOCK, D.W.; PAHISSA, A. Epidemiology and Predictors of Mortality in Cases of *Candida* Bloodstream Infection: Results from Population-Based Surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 1829–1835, 2005.

ALMIRANTE, B.; RODRÍGUEZ, D.; CUENCA-ESTRELLA, M.; ALMELA, M.; SANCHEZ, F.; AYATS, J.; ALONSO-TARRES, C.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L.; PAHISSA, A.; AND THE BARCELONA CANDIDEMIA PROJECT STUDY GROUP. Epidemiology, Risk Factors, and Prognosis of *Candida parapsilosis* Bloodstream Infections: Case-Control Population-Based Surveillance Study of Patients in Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44 (5), p. 1681–1685, 2006.

ARENDRUP, M.C.; FUURSTED, K.; GAHRN-HANSEN, B.; JENSEN, I. M.; KNUDSEN, J. D.; LUNDGREN, B.; SCHØNHEYDER, H. C.; TVEDE, M. Seminal Surveillance of Fungemia in Denmark: Notably High Rates of Fungemia and Numbers of Isolates with Reduced Azole Susceptibility. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 43 (9), p. 4434–4440, 2005.

ARMALEO, D.; YE, G.N.; KLEIN, T.M.; SHARK, K.B.; SANFORD, J.C.; JOHNSTON, S.A. Biolistic nuclear transformation of *S. cerevisiae* and other fungi. **Current Genetics**, v. 17, p. 97-103, 1990.

ASMUNDSDOTTIR, L.R.; ERLENDSDOTTIR, H.; GOTTFREDSSON, M. Increasing incidence of candidemia: results from a 20-year nationwide study in Iceland. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 3489–3492, 2002.

BANERJEE, S.N.; EMORI, T.G.; CULVER, T.H.; GAYNES, R.P.; JARVIS, W.R.; HORAN, T.; EDWARDS, J.R.; TOLSON, J.; HENDERSON, T.; MARTONE, W.J. Secular trends in nosocomial primary bloodstream infections in the United States, 1980–1989. National Nosocomial Infections Surveillance System. **American Journal of Medicine**, v. 91, p. 86S–89S, 1991.

BARNS, S.M.; LANE, D.J.; SOGIN, M.L.; BIBEAU, C.; WEISBURG, W.G. Evolutionary relationships among pathogenic *Candida* species and relatives. **Journal of Bacteriology**, v. 173, p. 2250–2255, 1991.

BASSETTI, M.; RIGHI, E.; COSTA, A.; FASCE, R.; MOLINARI, M. P.; ROSSO, R.; PALLAVICINI, F. B.; VISCOLI, C. Epidemiological trends in nosocomial candidemia in intensive care. **BMC Infectious Diseases**, 6 (21), 2006.

BECK-SAGUE, C.; JARVIS, W.R. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United States, 1980–1990. National Nosocomial Infections Surveillance System. **Journal of Infection Disease**, v. 167, p. 1247–1251, 1993.

BERMAN, J.; SUDBERY, P. E. *Candida Albicans*: A molecular revolution built on lessons from budding yeast. **Nature**, v. 3, p. 918-930, 2002.

BOLTRON, G.W.; NESTER, E.W.; GORDON, M.P. Plant phenolic compounds induce expression of the *Agrobacterium tumefaciens* loci needed for virulence. **Science**, v 232, p. 983-5, 1986.

BRIELAND, J.; ESSIG, D.; JACKSON, C.; FRANK, D.; LOEBENBERG, D.; MENZEL, F.; ARNOLD, B.; DIDOMENICO, B.; HARE, R. Comparison of Pathogenesis and Host Immune Responses to *Candida glabrata* and *Candida albicans* in Systemically Infected Immunocompetent Mice. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 5046–5055, 2001.

BRUNO, V. M.; MITCHELL, A. P. Large-scale gene function analysis in *Candida albicans*. **TRENDS in Microbiology**, v. 12 (4), p. 157-161, 2004.

BUNDOCK, P.; DEN DULK RAS, A.; BEIJERSBERGEN, A.; HOOYKAAS, P.J. Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. **EMBO Journal**, v. 14, p. 3206-3214, 1995.

BUNDOCK, P.; HOOYKAAS P. J. J. Integration of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA in the *Saccharomyces cerevisiae* genome by illegitimate recombination. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, p. 15272–15275, 1996.

BUNDOCK, P.; MRÓCZEK, K.; WINKLER, A.A.; STEENSMA, H.Y.; HOOYKAAS, P.J.J. T-DNA from *Agrobacterium tumefaciens* as an efficient tool for gene targeting in *Kluyveromyces lactis*. **Molecular and General Genetics**, v. 261, p. 115-121, 1999.

CALDERONE, R.A.; BRAUN, P.C. Adherence and Receptor Relationships of *Candida albicans*. **Microbiological Reviews**, v. 55, p. 1-20, 1991.

CHAFFIN, W.L.; RIBOT, J.L.L.; CASANOVA, M.; GOZALBO, D.; MARTÍNEZ, J.P. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: Identification, Function, and Expression. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, p. 130–180, 1998.

CHENG, M.F.; YANG, Y.L.; YAO, T.J.; LIN, C.Y.; LIU, J.S.; TANG, R.B.; YU, K.W.; FAN, Y.H.; HSIEH, K.S.; HO, M.; LO, H.J. Risk factors for fatal candidemia caused by *Candida albicans* and non-*albicans* *Candida* species. **BMC Infectious Diseases**, v. 5:22, 2005.

CITOVSKY, V.; GURALNICK, B.; SIMON, M. N.; WALL, J. S. The molecular structure of *Agrobacterium* VirE2-single-stranded DNA complexes involved in nuclear import. **Journal of Molecular Biology** v. 271, p. 718-727, 1997.

COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; PARK, B. J.; NOUÉR, S. A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; DA MATTA, D. A.; WARNOCK, D.; MORGAN, J. for the Brazilian Network Candidemia Study. Epidemiology of Candidemia in Brazil: a Nationwide Sentinel Surveillance of Candidemia in Eleven Medical Centers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44 (8), p. 2816–2823, 2006.

COVERT, S. F.; KAPOOR, P.; LEE, M.; BRILEY, A.; NAIRN, C. J. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Fusarium circinatum*. **Mycological Research**, v. 105, p. 259-264, 2001.

CUENCA-ESTRELLA, M.; MELLADO, E.; DÍAZ-GUERRA, T. M.; MONZÓN, A.; RODRÍGUEZ-TUDELA, J. L. Azasordarins: Susceptibility of Fluconazole-Susceptible and Fluconazole-Resistant Clinical Isolates of *Candida* spp. to GW 471558. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 45 (6), p. 1905–1907, 2001.

CUENCA-ESTRELLA, M.; GOMEZ-LOPEZ, A.; MELLADO, E.; BUITRAGO, M. J.; MONZON, A.; RODRIGUEZ-TUDELA, J.L. Head-to-Head Comparison of the Activities of Currently Available Antifungal Agents against 3,378 Spanish Clinical Isolates of Yeasts and Filamentous Fungi. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 50 (3), p. 917–921, 2006.

DAGDEVIREN, M.; CERIKCIOGLU, N.; KARAVUS, M. Acid proteinase, phospholipase and adherence properties of *Candida parapsilosis* strains isolated from clinical specimens of hospitalized patients. **Mycoses**, v. 48, p. 321-326, 2005.

DE BACKER, M. D.; MAES, D.; VANDONINCK, S.; LOGGHE, M. Transformation of *Candida albicans* by electroporation. **Yeast**, v. 15, p. 1609-1618, 1999.

DE BACKER, M.D.; MAGEE, P. T.; PLA J. Recent Developments In molecular Genetics Of *Candida albicans*. **Annual Reviews Of Microbiology**, v. 54, p. 463–498, 2000.

DE GROOT, M. J.; BUNDOCK, P.; HOOYKAAS, P. J.; BEIJERSBERGEN, A. G.; *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of filamentous fungi. **Nature Biotechnology**, v. 16, p. 839–842, 1998.

DE LEON, E.M.; JACOBBER, S.J.; SOBEL, J.D.; FOXMAN, B. Prevalence and risk factors for vaginal *Candida* colonization in women with type 1 and type 2 diabetes. **BMC Infectious Diseases**, v. 2, p. 1-5, 2002.

DE REPENTIGNY, L.; LEWANDOWSKI, D.; JOLICOEUR, P. Immunopathogenesis of oropharyngeal candidiasis in human immunodeficiency virus infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, p. 729–759, 2004.

DE VIRAGH, P.A.; SANGLARD, D.; TOGNI, G.; FALCHETTO, R.; MONOD, M. Cloning and sequencing of two *Candida parapsilosis* genes encoding acid proteases. **Journal of General Microbiology**, v. 139, p. 335–342, 1993.

DIEKEMA, D.J.; MESSER, S.A.; BRUEGGEMANN, A.B.; COFFMAN, S.L.; DOERN, G.V.; HERWALT, L.A.; PFALLER, M.A. Epidemiology of candidemia: 3-year results from the emerging infections and the epidemiology of Iowa organisms study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 1298–1302, 2002.

DIEKEMA, D. J.; BEEKMANN, S. E.; CHAPIN, K. C.; MOREL, K. A.; MUNSON, E.; DOERN, G. V. Epidemiology and Outcome of Nosocomial and Community-Onset Bloodstream Infection. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 41 (80), p. 3655–3660, 2003.

DMYTRUK, K.V.; VORONOVSKY, A.Y.; SIBIRNY, A.A. Insertional mutagenesis of the yeast *Candida famata* (*Debaryomyces hansenii*) by random integration of linear DNA fragments. **Current Genetics**, v. 50, p. 183-191, 2006.

DOHMEN, R. J.; STRASSER, A. W. M.; HÖNER, C. B.; HOLLENBERG, C. P. An Efficient Transformation Procedure Enabling Long-term Storage Competent Cells Of Various Yeast Genera. **Yeast**, v. 7 (7), p. 691-692, 2004.

DOS REIS, M. C., FUNGARO, M. H. P., DUARTE, R. T. D., FURLANETO, L., FURLANETO, M. C. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 58 (2), p. 197-202, 2004.

DUARTE, R.T.D.; STAATS, C.C.; FUNGARO, M.H.P.; SCHRANK, A.; VAINSTEN, M.H.; FURLANETO-MAIA, L.; NAKAMURA, C.V.; DE SOUZA, W.; FURLANETO M.C. Development of a simple and rapid *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system for the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 44 (3), p. 248–254, 2007.

FIDEL JR, P.L.; SOBEL, J.D. Immunopathogenesis of Recurrent Vulvovaginal Candidiasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 9, p. 335–348, 1996.

FIDEL JR, P.L.; VAZQUEZ, J.A.; SOBEL, J.D. *Candida glabrata*: Review of Epidemiology, Pathogenesis, and Clinical Disease with Comparison to *C. albicans*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, p. 80–96, 1999.

FITZGERALD, A.M.; MUDGE, A. M.; GLEAVE, A. P.; PLUMMER, K. M. *Agrobacterium* and PEG-mediated transformation of the phytopathogen *Venturia inaequalis*. **Mycological Research**, v. 107, p. 803-810, 2003.

FOTEDAR, R.; AL-HEDAITHY, S.S.A. Comparison of phospholipase and proteinase activity in *Candida albicans* and *C.dubliniensis*. **Mycoses**, v. 48, p. 62-67, 2003.

FRANÇOIS, F.; CHAPELAND-LECLERC, F.; VILLARD, J.; NOËL, T. Development of an integrative transformation system for the opportunistic pathogenic yeast *Candida lusitanae* using *URA3* as a selection marker. **Yeast**, v. 21 (2), p. 95-106, 2003.

FRIDKIN, S. K., JARVIS W. R. Epidemiology of nosocomial fungal infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 9 (4), p. 499-511, 1996.

FULLNER, K. J.; LARA, C. J.; NESTER, E. W. Pilus assembly by *Agrobacterium* T-DNA transfer genes. **Science**, v. 273, p. 1107-1109, 1996.

GÁCSEER, A.; SALOMON, S.; SCHÄFER, W. Direct transformation of a clinical isolate of *Candida parapsilosis* using a dominant selection marker. **FEMS Microbiology Letters**, v. 245, p. 117-121, 2005.

GELVIN, S.B. *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. **Annu. Rev. Plant. Physiol.** V 51, p. 223-256, 2000.

GELVIN, S. B. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: The biology behind the “Gene-Jockeying” tool. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, p. 16-37, 2003.

GHAI, J.; DAS, A. The *virD* operon of *Agrobacterium* Ti plasmid encodes a DNA relaxing enzyme. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, p. 3109-3113, 1989.

GHANNOUM, M. A.; RICE, L. B. Antifungal Agents: Mode of Action, Mechanisms of Resistance, and Correlation of These Mechanisms with Bacterial Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12 (4), p. 501–517, 1999.

GHANNOUM, M. A. Potential Role of Phospholipases in Virulence and Fungal Pathogenesis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13 (1), p. 122–143, 2000.

GHEYSEN, G.; VILLARROEL, R.; VAN MONTAGU, M. Illegitimate recombination in plants: a model for T-DNA integration. **Genes & Development**, v. 5, p. 287-297, 1991.

GIETZ, R. D.; WOODS, R. A. Genetic transformation of yeast. **Biotechniques**, v. 30 (4), p. 816-831, 2001.

GIETZ, D; SCHIESLT, R. H. Frozen Competent Yeast Cells That Can Be Transformed With High Efficiency Using The LiAc/ss carrier/PEG method. *Nature Protocols*, v. 2, p. 1-4, 2007 (a).

GIETZ, D; SCHIESLT, R. H. High Efficiency yeast transformation using the LiAc/ss carrier/PEG method. *Nature Protocols*, v. 2, p. 31-34, 2007(b).

GILFILLAN, G.D.; SULLIVAN, D.J.; HAYNES, K.; PARKINSON, T.; COLEMAN, D.C.; GOW, N.A.R. *Candida dubliniensis*: phylogeny and putative virulence factors. **Microbiology**, v. 144, p. 829–838, 1998.

GUDLAUGSSON, O.; GILLESPIE, S.; LEE, K.; BERG, J. V.; HU, J.; MESSER, S.; HERWALDT, L.; PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. Attributable Mortality of Nosocomial Candidemia, Revisited. **Clinical Infectious Diseases**, v. 37 (I nov), p. 1172-1177, 2003.

HAJJEH, R. A.; SOFAIR, A. N.; HARRISON, L. H.; LYON, G. M.; ARTHINGTON-SKAGGS, B. A.; MIRZA, S. A.; PHELAN, M.; MORGAN, J.; LEE-YANG, W.; CIBLAK, M. A.; BENJAMIN, L. E.; SANZA, L. T.; HUIE, S.; YEO, S. F.; BRANDT, M. E.; AND WARNOCK, D. W. Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species and in vitro susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population based active surveillance program. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 1519–1527, 2004.

HAMILTON, C. M.; FRARY, A.; LEWIS, C.; TANKSLEY, S. D. Stable transfer of intact high molecular weight DNA into plant chromosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, p. 9975–9979, 1996.

HAWES, M. C.; SMITH, L. Y.; HOWARTH, A. J. *Agrobacterium tumefaciens* mutants deficient in chemotaxis to root exudates. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 1, p. 182-186, 1988.

HAYNES, K. Virulence in *Candida* species. **TRENDS in Microbiology**, v. 9, p. 591-596, 2001.

HAZEN, K.C.; BARON, E. J.; COLOMBO, A. L.; GIRMENIA, C.; SANCHEZ-SOUSA, A.; DEL PALACIO, A.; DE BEDOUT, C.; GIBBS, D. L.; AND THE GLOBAL ANTIFUNGAL SURVEILLANCE GROUP. Comparison of the Susceptibilities of *Candida* spp. to Fluconazole and Voriconazole in a 4-Year Global Evaluation Using Disk Diffusion. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41 (12), p. 5623–5632, 2003

HEINEMANN, J. A.; SPRAGUE, JR. G. F. Bacterial conjugative plasmids mobilize DNA transfer between bacteria and yeast. **Nature**, v. 340, p. 205 – 209, 1989.

HERRERA-ESTRELLA, L.; DEPICKER, A.; VAN MONTAGU, M.; SCHELL, J. Expression of chimeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid derived vector. **Nature**, v. 303, p. 209-213, 1983.

HINNEN, A.; HICKS, J.B.; FINK, G.R. Transformation of yeasts. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 75, p. 1929-1933, 1978.

- HOEKEMA, A.; HIRSCH, P. R.; HOOYKAAS, P. J. J.; SCHILPEROOT, R. A. A binary vector strategy based on separation of *vir* and T region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. **Nature**, v. 303, p. 179-180, 1983.
- HOOYKAAS, P. J. J.; BEIJERSBERGEN, A. G. M. The virulence system of *Agrobacterium tumefaciens*. **Annual Review of Phytopathology**, v. 32, p. 157-179, 1994.
- HUBE, B.; NAGLIK, J. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. **Microbiology**, v. 147, p. 1997-2005, 2001.
- IDNURM, A.; REEDY, J.L.; NUSSBAUM, J.C.; HEITMAN, J. *Cryptococcus neoformans* virulence gene discovery through insertional mutagenesis. **Eukaryotic Cell**, v. 3, p. 420-429, 2004.
- ISHIGURO, J.; KOBAYASHI, W. A practical method for fission yeast transformation by electroporation. **Jpn. J. Genet. (Idengaky Zasshi)**, v. 70 (1), p. 1-6, 1995.
- ITO, H.; FUKUDA, Y.; MURATA, K.; KIMURA, A. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. **Journal of Bacteriology**, v. 153, p. 163-168, 1983.
- JUN, Z. et al. The bases of crown gall tumorigenesis. **Journal of Bacteriology**, v. 15, p. 3885-3895, 2000.
- KADO, C. I. The role of T-pilus in horizontal gene transfer and tumorigenesis. **Current Opinion in Microbiology**, v. 3, p. 643-648, 2000.
- KANTARCIOGLU, A.S.; YÜCEL, A. Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with to the sources of strains. **Mycoses**, v. 45, p. 160-165, 2002.
- KLEE, H. A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. **Trends in Plant Science**, v. 5, p. 446-451, 2000.
- KOJIC, E.M.; DAROUICHE, R.O. *Candida* Infections of Medical Devices. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, p. 255-267, 2004.
- KONCZ, C. et al. T-DNA insertional mutagenesis in Arabidopsis. **Plan. Mol. Biol.** v 20, p. 963-976, 1992.

LAI, E., KADO, C. I. The T-pilus of *Agrobacterium tumefaciens*. **TRENDS in Microbiology**, v. 8 (8), p. 361-369, 2000.

LEAL, C.V.; MONTES, B.A.; MESA, A.C.; RUAS, A.L.; CORREDOR, M.; RESTREPO, A.; McEWEN, J.G. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Medical Mycology**, v. 42, p.391-395, 2004.

LEE, K. Y.; LUND, P.; LOWE, K.; DUNSMUIR, P. Homologous recombination in plant cells after *Agrobacterium*-mediated transformation. **Plant Cell**, v. 2, p. 415-425, 1990.

LEUNG, W.K.; DASSANAYAKE, R.S.; YAU, J.Y.Y.; JIN, L.J.; YAM, W.C.; SAMARANAYAKE, L.P. Oral Colonization, Phenotypic, and Genotypic Profiles of *Candida* Species in Irradiated, Dentate, Xerostomic Nasopharyngeal Carcinoma Survivors. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 2219–2226, 2000.

LIMA, I.G.P.; DUARTE, R.T.D.; FURLANETO, L.; BARONI, C.H.; FUNGARO, M.H.P.; FURLANETO M.C. Transformation of the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus* with *Agrobacterium tumefaciens*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 42 (6), p. 631–636, 2006.

LOPER, J. E.; KADO, C. I. Host range conferred by the virulence specifying plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. **Journal of Bacteriology**, v. 139, p. 591–596, 1979.

MAGEE, P. T.; GALE, C.; BERMAN, J.; DAVIS, D. Molecular genetic and genomic approaches to the study of medically important fungi. **Infection and Immunity**, v. 71 (5), p. 2299–2309, 2003.

MARCHETTI, O.; BILLE, J.; FLUCKIGER, U.; EGGIMANN, P.; RUEF, C.; GARBINO, J.; CALANDRA T.; GLAUSER, M.P.; TAUBER, M.G.; PITTET, D. Fungal Infection Network of Switzerland. Epidemiology of candidaemia in Swiss tertiary care Hospitals: secular trends 1991–2000. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, p. 311-320, 2004.

MATTA, M.; TANIWAKI, M.H.; MATSUMOTO, F.M.; IAMANAKA, B.; FURLANETO, M.C.; SARTORI, D.; FUNGARO, M.H.P. *Agrobacterium* mediated insertional mutagenesis of the ochratoxigenic fungus *Aspergillus westerdijkiae*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 53, p. 1-4, 2007.

MATTHYSSE, A. G.; KIJNE, J. W. Attachment of *Rhizobiaceae* to plant cells. In: SPAINK, H. P., KONDOROSI, A. & HOOYKAAS, P. J. J. **The Rhizobiaceae**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, p. 235-249, 1998.

MATTHYSSE, A. G.; YARNALL, H.; BOLES, S. B.; MCMAHAN, S. A region of the *Agrobacterium tumefaciens* chromosome containing genes required for virulence and attachment to host cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1490, p. 208-212, 2000.

MCCLELLAND, C.M.; CHANG, Y.C.; KWON-CHUNG, K.J. High frequency transformation of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* by *Agrobacterium tumefaciens*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 42, p. 904-913, 2005.

MEILHOC, E.; MASSEN, J.M.; TEISSIÉ, J. High efficiency transformation of intact yeast cells by electric field pulses. **Nature Biotechnology**, v.8, p. 223-227, 1990.

MESSER, S. A.; JONES, R. N.; FRITSCH, T. R. International Surveillance of *Candida* spp. and *Aspergillus* spp.: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2003). **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 44 (5), p. 1782–1787, 2006.

MEYER, V.; MUELLER, D.; STROWIG, T.; STAHL, U. Comparison of different transformation methods for *Aspergillus giganteus*. **Current Genetics**, v. 43, p. 371– 377, 2003.

MICHIELSE, C.B.; RAM, A.F.J.; HOOYKAAS, P.J.J.; VAN DEN HONDEL, C. A. M. J. J. Role of bacterial virulence proteins in *Agrobacterium*-mediated transformation of *Aspergillus awamori*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 41, p. 571-578, 2004.

MICHIELSE, C. B.; HOOYAKAAS, P. J. J.; VAN DEN HONDEL, C. A. M. J. J.; RAM, A. F. J. *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. **Current Genetics**, v. 48, p. 1-17, 2005.

MONOD, M.; TOGNI, G.; HUBE, B.; AND SANGLARD, D. Multiplicity of genes encoding secreted aspartic proteinases in *Candida* species. **Molecular Microbiology**, v. 13, p. 357– 368, 1994.

MORRELL M., FRASER V. J., AND KOLLEF M. H. Delaying the Empiric Treatment of *Candida* Bloodstream Infection until Positive Blood Culture Results Are Obtained: a Potential Risk Factor for Hospital Mortality. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 49 (9), p. 3640–3645, 2005.

MULLINS, E. D.; CHEN, X.; ROMAINE, P.; RAINA, R.; GEISER, D. M.; KANG, S. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fusarium oxysporum*: an efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer. **Phytopathology**, v. 91, p. 173-180, 2001.

MYSORE, K. S.; NAM, J.; GELVIN, S. B. An *Arabidopsis* histone H2A mutant is deficient in *Agrobacterium* T-DNA integration. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, p. 948-953, 2000.

NAGLIK, J.R.; CHALLACOMBE, S.J.; HUBE, B. *Candida albicans* Secreted Aspartyl Proteinases in Virulence and Pathogenesis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, p. 400–428, 2003

NAIR, G. R.; LIU, Z.; BINNS, A. N. Reexamining the role of the accessory plasmid pAtC58 in the virulence of *Agrobacterium tumefaciens* strain C58. **Plant Physiology**, v. 133, p. 989-999, 2003.

NOBLE, S.M.; JOHNSON, A. D. Strains and strategies for large-scale gene deletion studies of the diploid human fungal pathogen *candida albicans*. **Eukaryotic Cell**, v. 4 (2), p. 298–309, 2005.

OHBA, T. et al. DNA rearrangement associated with the integration of T-DNA in tobacco: an example for multiple duplications of DNA around the integration target. **Plant Journal**. v. 7, p. 157-164, 1995.

OSTROSKY-ZEICHNER, L.; REX, J. H.; PAPPAS, P. G.; HAMILL, R. J.; LARSEN, R. A.; HOROWITZ, H.W.; POWDERLY, W. G.; HYSLOP, N.; KAUFFMAN, C. A.; CLEARY, J.; MANGINO, J. E.; LEE, J. Antifungal Susceptibility Survey of 2,000 Bloodstream *Candida* Isolates in the United States. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 47 (10), p. 3149–3154, 2003.

PAPPAS, P. G.; REX, J. H.; LEE, J.; HAMILL, R. J.; LARSEN, R. A.; POWDERLY, W.; KAUFFMAN, C. A.; HYSLOP, N.; MANGINO, J. E.; CHAPMAN, S.; HOROWITZ, H. W.; EDWARDS, J. E.; DISMUKES, W. E.; FOR THE NIAID MYCOSES STUDY GROUP. A Prospective Observational Study of Candidemia: Epidemiology, Therapy, and Influences on Mortality in Hospitalized Adult and Pediatric Patients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 37 (I sept), p. 634-643, 2003.

PAULSSON, M.; WADSTROM, T. Vitronectin and type-I collagen binding by *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. **FEMS Microbiology and Immunology**, v. 2, p. 55-62, 1990.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; RINALDI, M. G.; BARNES, R.; HU, B.; VESELOV, A. V.; TIRABOSCHI, N.; NAGY, E.; GIBBS, D. L.; and GLOBAL ANTIFUNGAL SURVEILLANCE GROUP. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study: a 6.5-Year Analysis of Susceptibilities of *Candida* and Other Yeast

Species to Fluconazole and Voriconazole by Standardized Disk Diffusion Testing. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 43 (12), p. 5848–5859, 2005.

PFALLER, M. A.; BOYKEN, L.; HOLLIS, R. J.; MESSER, S. A.; TENDOLKAR, S.; DIEKEMA, D. J. In Vitro Susceptibilities of *Candida* spp. to Caspofungin: Four Years of Global Surveillance. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 44 (3), p. 760–763, 2006.

PITTET, D.; AND WENZEL, R. P. Nosocomial bloodstream infections. Secular trends in rates, mortality, and contribution to total hospital deaths. **Archives of Internal Medicine**, v. 155, p. 1177–1184, 1995.

REDDING, S.W.; ZELLARS, R.C.; KIRKPATRICK, W.R.; MCATEE, R.K.; CACERES, M.A.; FOTHERGILL, A.W.; LOPEZ-RIBOT, J.L.; BAILEY, C.W.; RINALDI, M.G.; PATTERSON, T.F. Epidemiology of oropharyngeal *Candida* colonization and infection in patients receiving radiation for head and neck cancer. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 3896–3900, 1999.

RICHTER, S. S.; GALASK, R. P.; MESSER, S. A.; HOLLIS, R. J.; DIEKEMA, D. J.; PFALLER, M. A. Antifungal Susceptibilities of *Candida* Species Causing Vulvovaginitis and Epidemiology of Recurrent Cases. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43 (5), p. 2155–2162, 2005.

RHO, H. S.; KANG, S.; LEE, H. Y. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*. **Molecules and Cells**, v. 12, p. 407-411, 2001.

RHORER, T.L.; PICATAGGIO, S. K. Targeted integrative transformation of *Candida tropicalis* by electroporation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 36 (5), p. 650-654, 1992.

ROONEY, P. J.; SULLIVAN, T. D; KLEIN, B. S. Selective expression of the virulence factor BAD1 upon morphogenesis to the pathogenic yeast form of *Blastomyces dermatitidis*: evidence for transcriptional regulation by a conserved mechanism. **Molecular Microbiology**, v. 39, p. 875-889, 2001.

RUIZ-DÍEZ, B. A review: Strategies for the transformation of filamentous fungi. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92. p. 189-195, 2002.

SAFDAR, A.; CHATURVEDI, V.; CROSS, E.W.; PARK, S.; BERNARD, E.M.; ARMSTRONG, D.; PERLIN, D.S. Prospective Study of *Candida* Species in Patients at a Comprehensive Cancer Center. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, p. 2129–2133, 2001.

SAMARANAYAKE, Y. H.; SAMARANAYAKE, L. P. Experimental Oral Candidiasis in Animal Models. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14 (2), p. 398–429, 2001.

SANDVEN, P.; BEVANGER, L.; DIGRANES, A.; HAUKLAND, H. H.; MANNSÅKER, T.; GAUSTAD, P.; AND THE NORWEGIAN YEAST STUDY GROUP. Candidemia in Norway (1991 to 2003): Results from a Nationwide Study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44 (6), p. 1977–1981, 2006.

SANGLARD, D.; ISCHER, F.; PARKINSON, T.; FALCONER, D.; BILLE, J. *Candida albicans* Mutations in the Ergosterol Biosynthetic Pathway and Resistance to Several Antifungal Agents. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 47 (8), p. 2404–2412, 2003.

SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B.; FIORI, B.; RANNO, S.; TORELLI, R.; FADDA, G. Mechanisms of Azole Resistance in Clinical Isolates of *Candida glabrata* Collected during a Hospital Survey of Antifungal Resistance. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 49 (2), p. 668–679, 2005.

SANFORD, J. C.; KLEIN, T. M.; WOLF, E. D.; ALLEN, N. Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. **Particulate Science and Technology**, v. 5, p. 27-37, 1987.

SCHIESTL, R. H.; GIETZ, R. D. High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. **Current Genetics**, v. 16 (5-6), p. 339-346, 1989.

SCHIESTL, R. H.; PETES, T. D. Integration of DNA fragments by illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, p. 7585-7589, 1991.

SHENG, J.; CITOVSKY, V. *Agrobacterium*-plant cell DNA transport: have virulence proteins, will travel. **The Plant Cell**, v. 8, p. 1699-1710, 1996.

SHAW, C. H.; ASHBY, A. M.; BROWN, A.; ROYAL, C.; LOAKE, G. J.; SHAW, C. *virA* and *virG* are Ti-plasmid functions required for chemotaxis of *Agrobacterium tumefaciens* towards acetosyringone. **Molecular Microbiology**, v. 2, p. 413-417, 1988.

SENDID, B.; COTTEAU, A.; FRANÇOIS, N.; D'HAVELOOSE, A.; STANDAERT, A.; CAMUS, D.; POULAIN, D. Candidaemia and antifungal therapy in a French University Hospital: rough trends over a decade and possible links. **BMC Infectious Diseases**, 6 (80), 2006.

SOLL, D.R. High-Frequency Switching in *Candida albicans*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 5, p. 183-203, 1992.

STAIB, P.; KRETSCHMAR, M.; NICHTERLEIN, T.; HOF, H.; MORSCHHÄUSER, J. Differential activation of a *Candida albicans* virulence gene family during infection. **PNAS**, v. 97, p. 6102–6107, 2000.

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. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71 (4), p. 1798–1802, 2005.

SULLIVAN, T.D.; ROONEY, P.J.; KLEIN, B.S. *Agrobacterium tumefaciens* integrates transfer DNA into single chromosomal sites of dimorphic fungi and yields homokaryotic progeny from multinucleate yeast. **Eukaryotic cell**, v. 1, p. 895-905, 2002.

TAVANTI, A.; PARDINI, G.; CAMPA, D.; DAVINI, P.; LUPETTI, A.; SENESI, S. Differential Expression of Secretory Aspartyl Proteinase Genes (*SAP1-10*) in Oral *Candida albicans* Isolates with Distinct Karyotypes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, 4726–4734, 2004.

TAYLOR, B. N.; STAIB, P.; BINDER, A.; BIESEMEIER, A.; SEHNAL, M.; RÖLLINGHOFF, M.; MORSCHHÄUSER, J.; SCHRÖPPEL, K. Profile of *Candida albicans*-Secreted Aspartic Proteinase Elicited during Vaginal Infection. **Infection And Immunity**, v. 73 (3), p. 1828–1835, 2005.

THOMASHOW, M. F.; PANAGOPOULOS, C. G.; GORDON, M. P.; NESTER, E. W. Host range of *Agrobacterium tumefaciens* is determined by the Ti plasmid. **Nature**, v. 283, p. 794–796, 1980.

THOMPSON, J. R.; REGISTER, E.; CUROTTO, J.; KURTZ, M.; KELLY, R. An improved protocol for the preparation of yeast cells for transformation by electroporation. **Yeast**, v. 14 (6), p. 565-571, 1998.

TINLAND, B.; HOHN, B. Recombination between prokaryotic and eukaryotic DNA: Integration of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA into the plant genome. **Genetic Engineering**, v. 17, p. 209-229, 1995.

TOGNI, G.; SANGLARD, D.; FALCHETTO, R. AND MONOD, M. Isolation and nucleotide sequence of the extracellular acid protease gene (ACP) from the yeast *Candida tropicalis*. **FEBS Letters**, v. 286, p. 181-185, 1991.

TZFIRA, T.; CITOVSKEY, V. From host recognition to T-DNA integration: the function of bacterial and plant genes in the *Agrobacterium*-plant cell interaction. **Molecular Plant Pathology**. V. 1, p. 201-212, 2000.

VARGAS, K.G.; JOLY, S. Carriage Frequency, Intensity of Carriage, and Strains of Oral Yeast Species Vary in the Progression to Oral Candidiasis in Human Immunodeficiency Virus-Positive Individuals. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 341-350, 2002.

WANG, T.T.; CHOI, Y.J.; LEE, B.H. Transformation systems of non-saccharomyces yeasts. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 21, p. 177-218, 2001.

WAGNER, V. T.; MATTHYSSE, A. G. Involvement of a vitronectin-like protein in attachment of *Agrobacterium tumefaciens* to carrot suspension culture cells. **Journal of Bacteriology**, v. 174, p. 5999-6003, 1992.

WALTHER, A.; WENDLAND, J. An Improved transformation protocol for the human fungal pathogen *Candida albicans*. **Current Genetics**, v. 42, p. 339-343, 2003.

WATTS, J. W.; STACEY, N. J. Novel methods of DNA transfer. In: PEBERDY, J. F.; CATEN, C. E.; OGDEN, J. E.; BENNETT, J. W. **Applied Molecular Genetics of Fungi**. Cambridge University Press, Cambridge, New York, USA, 1990.

WEY, S. B.; MORI, M.; PFALLER, M. A.; WOOLSON, R. F. AND WENZEL, R. P. Hospital acquired candidemia: attributable mortality and excess length of stay. **Archives of Internal Medicine**, v. 148, p. 2642-2645, 1988.

WELLINGTON, M.; RUSTCHENKO, E. 5-Fluoro-ortotic acid induces chromosome alterations in *Candida albicans*. **Yeast**, v. 22 (1), p. 57-70, 2005.

WHITE, T. C., MARR K.A., BOWDEN R. A. Clinical, Cellular, and Molecular Factors That Contribute to Antifungal Drug Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11 (2), p. 382-402, 1998.

WONG, S.; FARES, M.A.; ZIMMERMANN, W.; BUTLER, G.; WOLFE, K.H. Evidence from comparative genomics for a complete sexual cycle in the 'asexual' pathogenic yeast *Candida glabrata*. **Genome Biology**, v. 4: R10, 2003.

ZAUGG, C.; ZEPÉLIN, M.B.V.; REICHARD, U.; SANGLARD, D.; MONOD, M. Secreted Aspartic Proteinase Family of *Candida tropicalis*. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 405–412, 2001.

ZAMBRYSKI, P. C.; JOOS, H.; GENETELLO, C.; LEEMANS, J.; VAN MONTAGU, M.; SCHELL, J. S. Ti plasmid vector for introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. **EMBO Journal**, v. 2, p. 2143-2150, 1983.

ZHU, J.; OGER, P. M.; SCHRAMMEIJER, B.; HOOYKAAS, P. J. J.; FARRAND, S. K.; WINANS, S. C. The bases of crown gall tumorigenesis. **Journal of Bacteriology**, v. 182, p. 3885-3895, 2000.

ZIEMIENOWICZ, A. Odissey of *Agrobacterium* T-DNA. **Acta Biochimica Polonica**, v. 48, p. 623-635, 2001.

ZUPAN, J. R.; ZAMBRYSKI, P. Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. **Plant Physiology**, v. 107, p. 1041-1047, 1995.

ZUPAN, J. R.; MUTH, T. R.; DRAPER, O.; ZAMBRYSKI, P. The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. **The Plant Journal**, v. 23 p. 11-28, 2000.

**ARTIGO: Establishment of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system for *Candida* species using a dominant selection marker**

Marcelo Tempesta de Oliveira<sup>1</sup>, Luciana Furlaneto-Maia<sup>2</sup>, Célia Guadalupe Tardeli de Jesus Andrade<sup>1</sup>, Juca Abramo Barrera San Martin<sup>1</sup> & Marcia Cristina Furlaneto<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina -PR, Brazil, <sup>2</sup> Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina-PR, Brazil.

Correspondence: Marcia Cristina Furlaneto, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, P.O. Box 6001, Londrina –PR, 86051-990, Brazil Tel.: +55-43-33715736; Fax: +55-43-33714207; E-mail [furlaneto@uel.br](mailto:furlaneto@uel.br)

**Abstract**

The opportunistic yeast *Candida albicans* and non-albicans species, *Candida tropicalis* and *Candida glabrata* are of great clinical importance in human candidiases. This paper describes the establishment of an efficient transformation system for these species, by the employment the *Agrobacterium*-mediated transformation method (AMT). Yeast cells were transformed to hygromycin B resistance using the binary vector pBTS4 carrying a hygromycin B resistance gene (*hph*) as a selection marker under different co-cultivation conditions. Overall, our data indicate a transformation frequency of up to 1472, 1612 and 83 transformants/co-cultivation for *C. albicans*, *C. tropicalis* and *C. glabrata*, respectively. Following 4 serial passages of transformants on non-selective medium, 100% of the transformants were found to be mitotically stable. PCR and dot-blot targeted at a 600 bp fragment from *hph* gene confirmed the transformation of *Candida* species. The ability of *Agrobacterium* strain AGL-1 to attach to *Candida* cells under co-cultivation was analysed under electron microscopy. The reproducible transformation system described in this work may provides a method for the genetic manipulation of these pathogens, which will facilitate detailed molecular analysis of these fungal species.

**Keywords** *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Agrobacterium tumefaciens*, hygromycin B

Running title: *A. tumefaciens*-mediated transformation of *Candida* spp

## Introduction

Several yeast species are among the agents causing opportunistic infections in humans and mammals. Candidiases are of the greatest clinical importance among them. *Candida albicans* is clearly the predominant species of *Candida* mycoses, however, a series of recent clinical surveys have illustrated the increasing impact of non-*albicans* species, including *Candida tropicalis* and *Candida glabrata* (Richardson & Warnock, 2003; Paulitsch *et al.*, 2006). The asexual diploid yeast *C. tropicalis* is one of the three most commonly isolated non-*albicans* *Candida* species (Yang *et al.*, 2006; Colombo *et al.*, 2006; Mokaddas *et al.*, 2007; Comert *et al.*, 2007). Unlike *C. albicans*, which is a normal commensal on human mucous membranes, the detection of *C. tropicalis* is more often associated with the development of deep candidiasis (Komshian *et al.*, 1989; Chakrabarti *et al.*, 2007). *Candida glabrata* (formerly *Torulopsis glabrata*) is a haploid fungal pathogen capable of causing both superficial mucosal infections and life-threatening systemic diseases in humans (Kaur *et al.*, 2005). In recent years, cases of *C. glabrata* infection have increased significantly so that it is now one of the most common cause of candidiases (Richardson, 2005) with a mortality rate nearing that of *C. albicans* (Fidel *et al.*, 1999).

Significant progress has been made in our understanding of *Candida* virulence. Several reports suggested differences in virulence of non-*albicans* species in comparison to *C. albicans*. *C. tropicalis* and *C. glabrata* show lower virulence in an animal model, but may be associated with a higher mortality than *C. albicans* (reviewed in Krcmery & Barnes, 2002).

In this concern, molecular genetic tools, such as gene transfer, open new avenues for the functional analysis of genes which may contribute in understanding virulence attributes of *Candida* species. Previous developed tools for gene manipulation in *Candida* species have relied on lithium acetate transformation (Ito *et al.*, 1983) and spheroplast transformation (Hinnen *et al.*, 1983). Both widely used methods, suffer from significant limitations,

especially when applied to *C. albicans*. The lithium acetate procedure is fast and simple but gives low transformation efficiencies for *C. albicans* (Sanglard *et al.*, 1996). Transformation of spheroplasts was reported to be more efficient in *C. albicans* (Herrerros *et al.*, 1992), however, this method often yields abortive transformants and even more problematic, can result in spheroplast fusions, with resulting polyploidy. As an alternative, transformation of *C. albicans* by electroporation was established (De Backer *et al.*, 1999). This approach took advantage of a combination of the lithium acetate procedure as a pretreatment to an electroporation pulse and resulted in transformation efficiencies comparable with that of spheroplast transformation.

Fungal transformation has progressed substantially due to the development of a approach based on the ability of *Agrobacterium tumefaciens* to transfer DNA to fungi (Bundock *et al.*, 1995; de Groot *et al.*, 1998). *A. tumefaciens* is a gram-negative soil bacterium that causes crown gall in plants. *A. tumefaciens* is capable of transferring a piece of its Ti plasmid DNA into plant cells, where it is integrated into the host chromosome and expressed. Ti plasmid vectors have been developed to deliver target DNA sequences in many cell types, including mammalian cells (Kunik *et al.*, 2001). The *Agrobacterium*-mediated transformation (AMT) has been applied to human pathogens such as *Blastomyces dermatitidis* and *Histoplasma capsulatum* (Sullivan *et al.*, 2002), *Paracoccidioides brasiliensis* (Leal *et al.*, 2004), *Cryptococcus neoformans* (Idnurm *et al.*, 2004), *Cryptococcus gatti* (McClelland *et al.*, 2005) using yeast cells as starting material.

*Agrobacterium*-mediated transformation offers advantages over conventional transformation methods. AMT renders high number of transformants, is easier to perform since time consuming steps such as protoplasting are eliminated. The isolation of protoplasts is laborious, and both yield and viability are dependent on the quality of enzyme preparation (reviewed in Michielse *et al.*, 2005b).

In this paper, we report for the first time the employment of *A. tumefaciens*-mediated transformation for *Candida* species, which is based on hygromycin resistance as a selectable marker. Furthermore, the attachment of *Agrobacterium* to yeast cells was analysed under electron microscopy opening new avenues for the study of this essential step of the T-DNA transfer process.

## **Materials and methods**

### **Strains and plasmid**

*Candida albicans* strain Ca5, *Candida tropicalis* strain C<sub>3</sub> and *Candida glabrata* strain C<sub>6</sub> were recovered from the oral swabs of healthy individuals who were attended in the Dental Clinic of the University of Parana (Londrina, Brazil). *Agrobacterium tumefaciens* strain AGL-1 containing the pBTS4 binary vector (AGL-1::pBTS4) (dos Reis *et al.*, 2004) was used in transformation experiments. The pBTS4 binary vector contains a hygromycin B resistance cassette from pAN7-1 driven by the *Aspergillus nidulans gpd* promoter and *trpC* terminator (Rooney *et al.*, 2001).

### ***Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation (AMT) of *Candida* spp**

The *A. tumefaciens* strain AGL-1::pBTS4 was grown at 28°C for 18 h in liquid LB (Luria Bertani) medium (Sambrook & Russel, 2001) supplemented with 50µg mL<sup>-1</sup> of kanamycin and 50µg mL<sup>-1</sup> of streptomycin. The culture was diluted to an optical density at 660 nm (OD<sub>660</sub>) of 0.15 in 20 mL of induction medium (IM) (dos Reis *et al.*, 2004) in the presence of 200 µM acetosyringone (2-[N-morpholino]ethanesulfonic acid, pH 5.8) and grown under the same conditions until an OD<sub>660</sub> of 0.6 - 0.8 was reached (approximately 10<sup>8</sup> – 10<sup>9</sup> cells mL<sup>-1</sup>). Yeast cells were grown for 18 h in Saboraud's liquid medium with shaking at 28°C. The cells were washed in induction medium, and resuspended in the same medium containing 200 µM

acetosyringone to a final concentration of  $10^5$ ,  $10^6$  and  $10^7$  cells per mL. Co-cultivation between *A. tumefaciens* and yeast cells was performed by addition of 100  $\mu$ l of bacterial culture in 100  $\mu$ l of yeast cell suspension in sterile microfuge tubes. This mix was incubated at 28 °C for 48 h, following plating on Saboraud agar medium containing hygromycin B ( $250\mu\text{g mL}^{-1}$ ) as the selection agent for fungal transformants and mefoxin ( $150\ \mu\text{g mL}^{-1}$ ) to inhibit growth of *A. tumefaciens* cells. Putative transformants emerged from the selective medium within 2-7 days later. All putative transformants were transferred to fresh Saboraud plates containing  $250\mu\text{g mL}^{-1}$  of hygromycin B for a second round of selection. Control experiments were carried out by plating untransformed yeast strains into selective medium.

#### **Mitotic stability and resistance analysis**

Mitotic stability of the integrated T-DNA was assessed by successively culturing 100 putative transformants obtained from each yeast strain subculturing on Saboraud agar medium for five generations, after which transformants were transferred to selective medium (Saboraud +  $250\mu\text{g mL}^{-1}$  hygromycin B). The resistance analysis of putative transformants was tested after subculturing on Saboraud agar medium containing hygromycin at different concentrations ( $500$  and  $750\ \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Plates were incubated at 28°C for 18 h.

#### **DNA isolation and molecular analysis**

DNA extraction was carried out as described by (Gácsér *et al.*, 2005) with modifications. Briefly, 3 mL culture of the yeast in Sabouraud was grown overnight to stationary phase and cells were harvested by centrifugation at 1200 g. The pellets were washed with sterile water and resuspended in 725  $\mu$ l lysis buffer (10 mM Tris , pH 8.0 containing 2% v/v Triton-X-100, 1% w/v SDS, 100 mM NaAc and 1 mM EDTA) along with 3 glass beads (425-600 microns). The suspension was vortexed at maximum speed for 3 min. The supernatant was recovered

and 275 µl 7 M ammonium acetate (pH 7.0) was added. After 5 min of incubation at 65 °C, the sample was left on ice for additional 5 min. Then 500 µl chloroform was added and the sample was centrifuged for 2 min at 21,000g. The DNA from the aqueous phase was precipitated with 2.5 volumes of chilled ethanol. The pellet was washed with 70% (v/v) ethanol, air-dried, and resuspended in 20 µl H<sub>2</sub>O containing 10 µg RNase A/mL. The quality and quantity of the isolated DNA were determined by 0.8% agarose gel electrophoresis in 1% TBE.

Genomic DNA of putative transformants was analysed for the presence of the *hph* gene. PCR analysis was performed using the primer pair *hph1* (5'-TTCGATGTAGGAGGGCGTGGAT-3') and *hph2* (5'-CGCGTCTGCTGCTCCATACAAG-3') that amplify a 600 bp *hph* fragment (dos Reis *et al.*, 2004) with an initial denaturing cycle of 4 min at 95°C, followed by 35 cycles of 92°C for 45 s (denaturation), 60°C for 1 min (annealing) and 72°C for 1.5 min (polymerisation).

Dot blot analyses were performed with genomic DNA from both the putative transformants and the untransformed strains of *Candida* (Sambrook & Russel, 2001). Hybridization and chemiluminescent detection were performed under conditions recommended for the digoxigenin (DIG) hybridization system by Roche (Mannheim, Germany) using a 600 pb DIG-labelled DNA probe covering part of the *hph* resistance gene.

### **Electron microscopic analysis of the co-cultivated pair**

The co-cultivation of *A. tumefaciens* and yeast cells was analysed under scanning electron microscopy (SEM). Firstly, aliquots of 10 µl of each mixture suspension were added on cover glasses (13-mm diameter) previously treated with poli-L-lisine, following incubation of 1 h at room temperature. Then, the cover glasses were washed twice with sterile distilled water followed by 2.5% glutaraldehyde (Electron Microscopy Sciences) fixation at 8°C for 12 h. The cover glasses were washed with 0.1 M phosphate buffer , pH 7.2. Post-fixation was carried out for 1 h at 28°C with 1% osmium tetroxide in phosphate buffer. Subsequently, the samples were dehydrated in graded ethanol, critical point-dried in CO<sub>2</sub> (BALTEC SDC 030 Critical Point Dryer) coated with carbon (BALTEC SDC 050 Sputter Coater) and viewed in a Quanta 200 Field Emission Scanning Electron Microscope. Images were obtained using secondary electrons.

The co-cultivation of *A. tumefaciens* and yeast cells was also analysed under transmission electron microscopy. The samples were prepared as described above, except that the washing solution was replaced by cacodylate buffer. Subsequently, the samples were dehydrated in graded acetone, and embedded in Spurr resin (Electron Microscopy Sciences). Samples 70 nm thick were collected critical point-dried in carbon- coated copper grid (200 mesh), flooded on 2% uranyl acetate and blotted dry. All samples were examined using a TECNAI 12 Field Emission Transmission Electron Microscope.

## **Results**

### **Establishment of an AMT system for *Candida* sp**

Prior to experimental procedures for AMT establishment, the Hygromycin B (HygB) minimum inhibitory concentration of *Candida* yeast cells was determined. Our results showed that yeast growth of all three *Candida* species was inhibited at a final concentration of HygB

of 150  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (data not shown). However, for subsequent transformation experiments a concentration of 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  was used for selection of resistant colonies. For all controls performed no hygromycin natural resistant clones were obtained.

In preliminary transformation procedure the *Agrobacterium*-yeast cells mix was plated on nitro-cellulose filters on a co-cultivation medium. After co-cultivation period the membranes were transferred to selective medium, as described by many authors (reviewed in Michielse *et al.*, 2005). This procedure, renders high percentage of putative transformants that could not be confirmed by PCR analysis, suggesting the possible occurrence of false-positive transformants.

For this reason, to start establishing a protocol for AMT of *Candida*, we first carried out the co-cultivation in induction liquid medium, followed by plating the co-cultivated pair cells onto selective medium. Our data showed that this procedure was reliable since transformants recovered were confirmed by molecular means. Transformants emerged from the selective medium as distinct colonies within 2-7 days of co-cultivation.

The transformation frequencies achieved for *C. albicans*, *C. tropicalis* and *C. glabrata* using *A. tumefaciens* strain AGL-1 transformed with the vector pBTS4 are given in Table 1.

During the experiments we analysed the influence of co-cultivation temperature on transformation frequency. As shown in Table 1 the influence of temperature varied among the *Candida* species. For *C. albicans* a temperature of 28°C resulted in a higher average number of Hyg<sup>r</sup> transformants than co-cultivation at 24°C. For *C. tropicalis* and *C. glabrata* the highest transformation frequencies were obtained at temperature co-cultivation temperature of 24°C.

The increase of the number of recipient cells in the co-cultivation mixture (changing the ratio of yeast cells to *Agrobacterium*) is a well known key factor in the establishment of an AMT system (Michielse *et al.*, 2005b). Thus, we tested different number of target yeast ( $10^4$ ,

$10^5$  and  $10^6$ ) in the transformation experiments. As shown in Table 1 the influence of this variable also varied among the *Candida* species. At best temperature of co-cultivation, for *C. albicans* and *C. tropicalis* the increase of the yeast recipient cells (10-fold) in the co-cultivation mixture did not lead to an increase in the transformation frequency.

As shown in Table 1, AMT of *C. glabrata* yielded the lowest transformation frequencies compared to that obtained for *C. albicans* and *C. tropicalis*. Furthermore, the increase of the number of target cells lead to increase in number of transformants recovered.

### **Stability and resistance levels of transformants**

The stability of the integrated T-DNA in a random selection of 100 putative transformants for each *Candida* species was examined by cultivating the transformants in absence of hygromycin. Following five rounds of growth on this medium, clones were transferred to selective medium. All tested transformants still showed the ability to grow in the presence of hygromycin, indicating that *hph* resistance gene is mitotically stable.

The resistance levels of putative transformants varied among the *Candida* species. For *C. albicans* 100% and 74% of the transformants tested were capable of growing on 500 and 750  $\mu\text{g mL}^{-1}$  hygromycin, respectively. For *C. tropicalis* and *C. glabrata* these percentage were lower, where 97% and 90% of the transformants tested grew on 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  hygromycin, and 90% and 68% grew on 750  $\mu\text{g mL}^{-1}$  hygromycin, respectively.

### **Molecular analysis of transformants**

PCR analysis of putative transformants targeted at the *hph* gene yielded an amplified product of the expected size (600 bp) from all the transformants tested. No product was amplified from the untransformed wild-type strains (Figure 1). Genomic DNA was also used for dot-blot hybridization analysis, using the 600 pb amplicon as a probe. As shown in Fig. 2, all

transformants tested gave a positive hybridization signal, indicating the presence of the *hph* gene in *Candida* genome.

### **Analysis of the co-cultivated pair**

Infection of host cells by *Agrobacterium* must begin from attachment of the bacteria to the host cell. Thus, we examined the ability of *Agrobacterium* strain AGL-1 to associate with *Candida* yeast cells under co-cultivation using scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM). As shown in Fig. 3A (a,b,c), *Agrobacterium* attached to and formed aggregates around yeast cells. We also observed the presence of extracellular matrix, resembling biofilm connecting neighbouring *C. tropicalis* cells (Fig 3B,a,b). Fig 4 shows a close interaction between yeast – agrobacteria.

### **Discussion**

A prerequisite for molecular biological manipulation is a reliable and efficient means for introducing exogenous DNA into the cell. In this study we developed a reproducible AMT method for three *Candida* species using yeast cell as starting material and hygromycin resistance gene as selective trait.

Currently, a number of tools have been developed to facilitate the genetic manipulation of *Candida* species, but these methods have generally relied on the use of auxotrophic markers. This limit the strains that can be studied, but can also affect a strain's phenotype. The employment of auxotrophic markers has affected the interpretation of gene deletion studies in *C. albicans* (Lay *et al.*, 1998; Bain *et al.*, 2001). The gene *hph* which confers resistance to the antibiotic hygromycin B has been employed as a selection marker in various transformation systems (Hara *et al.*, 2000)

*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation has been successfully applied to a variety of different fungal species due to its technical efficiency and simplicity (reviewed in Michielse *et al.*, 2005b). During this study, we aimed to establish a protocol for AMT of *Candida* species, by evaluating co-cultivation conditions. Our data show that the co-cultivation carried out in induction liquid medium instead of being plated on nitro-cellulose filters is essential for *Candida* transformation. To our knowledge, this is the first report on the interference of this physical barrier (membrane) on the yeast transformants recovering. According to Michielse *et al.* (2005b) co-cultivation temperature has also been shown to have an influence on transformation efficiency, and its selection may be balanced between biological characteristics of *Agrobacterium* and recipient cells. Our data revealed that decreasing the temperature stepwise from 28°C to 24°C in *C. tropicalis* and *C. glabrata* co-cultivation lead to an increased transformation frequency. Finally, the influence of the number of recipient cells in the co-cultivation mixture was assessed throughout this work. Our results show that the effect of this variable on transformation frequency varied among the *Candida* species tested. In fact, the addition of an increased number of fungal cells to co-cultivation mixture may decrease or enhance transformation frequency, depending on the system (Michielse *et al.*, 2005b).

In this study, our tested experimental procedures led to transformation frequencies of up to 1472, 1612 and 83 transformants for *C. albicans*, *C. tropicalis* and *C. glabrata*, per  $10^4$ ,  $10^5$  and  $10^6$  target cells, respectively. The employment of the widely used methods of transformation, e.g, spheroplasting, lithium acetate and electroporation, for *C. albicans* yielded 50 – 300 transformants per  $10^7$  –  $10^9$  recipient cells (reviewed in Gietz & Wood, 2001). Transformation of *Candida parapsilosis* using electroporation yielded up to 150 transformants per 20 µg plasmid DNA per  $10^8$  recipient cells (Gácsér *et al.*, 2005).

The efficiency and the simplicity of AMT potentially make this the preferred method for *Candida* species transformation. In turn, the *A. tumefaciens* strain AGL-1 bearing the binary vector pBTS4 employed in this study has also been successfully used for transformation of the dimorphic fungi *Blastomyces dermatitidis* and *Histoplasma capsulatum* (Sullivan *et al.*, 2002) and the filamentous fungus *Beauveria bassiana* (dos Reis *et al.*, 2004).

An assessment of the mitotic stability showed that all of the transformants tested remained mitotically stable, maintaining their hygromycin resistance after being cultured in the absence of hygromycin B. This mitotic stability is consistent with T-DNA integration into chromosomal DNA and compares favourably with those obtained for *C. immitis* (Abuodeh *et al.*, 2000) and *P. brasiliensis* (Leal *et al.*, 2004; Almeida *et al.*, 2007) using AMT.

*A. tumefaciens* recognition of and attachment to the host cells is an early and essential step of the T-DNA transfer process. Currently, close examination of *A. tumefaciens* cells paired with host cells other than plant cells is limited to *Streptomyces lividans* cells (Kelly & Kado 2002), human cells (Kunik *et al.*, 2001) and filamentous fungal cells (Duarte *et al.*, 2007). Similar to what has been found in *Agrobacterium*-plant interaction (Matthysse *et al.* 1981) we observed the occurrence of bacterial aggregates at and around the yeast and germ tubes (Fig.3A). Our data show a close interaction between yeast – agrobacteria with absence of microfibrils (Figs 3 and 4) as observed for plant cells (Chumakov *et al.*, 2001) and fungal cells (Duarte *et al.*, 2007).

AMT approach requires no special equipment that might complicate biocontainment. Furthermore, transformation does not require digestion of fungal cell walls, further simplifying this procedure. Besides constituting an appropriate method for transforming *Candida* species, the procedure could be applied to other molecular studies, such as development of a mutagenesis system by random insertion in genes that may be related to virulence. In addition, it could be used to produce specific gene mutants by gene replacement,

such as previously reported in *Aspergillus awamori* (Michielse *et al.*, 2005a).

**Acknowledgements** This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Araucária and PROPPG/UEL - Brazil. The authors thank Dr. Peter Romaine for providing *Agrobacterium* strain, Dr. Tom Sullivan for providing the binary plasmid (pBTS4).

## References

- Abuodeh RO, Orbach MJ, Mandel MA, Das A & Galgiani JN (2000) Genetic transformation of *Coccidioides immitis* facilitated by *Agrobacterium tumefaciens*. *J Infect Dis* **181**: 2106-2110.
- Almeida AJ, Carmona JA, Cunha C, Carvalho A, Rappleye CA, Goldman WE, Hooykaas PJ, Leão C, Ludovico P & Rodrigues F (2007) Towards a molecular genetic system for the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Gen Biol*, doi: 10.1016/j.fgb.2007.04.004.
- Bain JM, Stubberfield C & Goe NAR (2001) Ura-status-dependent adhesion of *Candida albicans* mutants. *FEMS Microbiol Lett* **204**: 3213-3228.
- Bundock P, den Dulk-Ras A, Beijersbergen A & Hooykaas PJJ (1995) Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **14**: 3206-3214.
- Chakrabarti A, Rao P, Tarai B, Shivaprakash MR & Wing J (2007) *Candida* in acute pancreatitis. *Surg Today* **37**: 207-211.
- Chumakov MI, Dykman LA, Bogatyrev VA & Kurbanova IV (2001) Investigation of the cell surface structures of *Agrobacteria* involved in bacterial and plant interactions. *Microbiology* **70**: 232-238
- Colombo AL, Nucci M, Park BJ, Nouer AS, Arthington-Skaggs B, da Matta DA, Warnock D & Morgan J (2006) Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical Centers. *J Clin Microbiol* **44**: 2816-2823.
- Comert F, Kulah C, Aktas E, Eroglu O & Ozlu N (2007) Identification of *Candida* species isolated from patients in intensive care unit and in vitro susceptibility to fluconazole for a 3-year period. *Mycoses* **50**: 52-57.
- De Backer MD, Mães D, Vandonick S, Logghe M, Contreras R & Luyten WH (1999)

- Transformation of *Candida albicans* by electroporation. *Yeast* **15**: 1609-1618.
- dos Reis MC, Fungaro MHP, Duarte RTD, Furlaneto L & Furlaneto MC (2004) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *J Microbiol Methods* **58**: 197-202.
- Duarte RTD, Staats CC, Fungaro MHP, Schrank A, Vainstein MH, Furlaneto-Maia L, Nakamura CV, Souza W & Furlaneto MC (2007) Development of a simple and rapid *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system for the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. *Lett Appl Microbiol* **44**: 248-254.
- Fidel PL, Vazquez JA & Sobel JD (1999) *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *Candida albicans*. *Clin Microbiol Rev* **12**: 80-96.
- Fox CR & Sandle MA (2001) *Current Diagnosis & Treatment in Infectious Diseases*, (Wilson WR & Sandle MA, eds), pp 734-744. McGraw-Hill/Appleton & Lange, Rochester, NM.
- Gácsér A, Salomon S & Schafer W (2005) Direct transformation of a clinical isolate of *Candida parapsilosis* using a dominant selection marker. *FEMS Microbiol Lett* **245**: 117-121.
- Gietz RD & Woods RA (2001) Genetic transformation of yeast. *Biotechniques* **30**: 816-828.
- Hara A, Ueda M, Misawa S, Matsui T, Furuhashi K & Tanaka A (2000) A mutated hygromycin resistance gene is functional in the n-alkane-assimilating yeast *Candida tropicalis*. *Arch Microbiol* **173**: 187-192.
- Herreros E, Garcia-saez MI, Nombela C & Sanchez M (1992) A reorganized *Candida albicans* DNA sequence promoting homologous non-integrative genetic transformation. *Mol Microbiol* **6**: 3567-3574.
- Idnurm A, Reedy JL, Nussbaum JC & Heitman J (2004) *Cryptococcus neoformans* virulence gene discovery through insertional mutagenesis. *Eukaryot Cell* **3**: 420-429.

- Kaur R, Domergue R, Zupancic ML & Cormack BP (2005) A yeast by any other name: *Candida glabrata* and its interaction with then host. *Curr Opin Microbiol* **8**: 378-384.
- Kelly BA & Kado CI (2002) *Agrobacterium*-mediated T-DNA transfer and integration into the chromosome of *Streptomyces lividans*. *Mol Plant Pathol* **3**: 125-134.
- Komshian SV, Uwaydah AK, Sobel JD & Crane LR (1989) Fungemia caused by *Candida* species and *Torulopsis glabrata* in the hospitalized patient: frequency, characteristics, and evaluation of factors influencing outcome. *Rev Infect Dis* **11**: 379-390.
- Kunik T, Tzfira T, Kapulnik Y, Gafni Y, Dingwall C & Citovsky V (2001) Genetic transformation of HeLa cells by *Agrobacterium*. *Proc Natl Acad Sci USA*. **98**: 1871-1876.
- Lay J, Henry LK, Clifford J, Koltin Y, Bulawa CE & Becker JM (1998) Altered expression of selectable marker URA3 in gene disrupted *Candida albicans* strains complicates interpretation of virulence studies. *Infect Immun* **66**: 5301-5306.
- Matthysse AG, Holmes KV & Gurlitz RHG (1981) Elaboration of cellulose fibrils by *Agrobacterium tumefaciens* during attachment to carrot cells. *J Bacteriol* **145**: 583-595.
- Michielse CB, Arenthorst M, Ram AFJ & van den Hondel CAMJJ (2005a) *Agrobacterium*-mediated transformation leads to improved gene replacement efficiency in *Aspergillus awamori*. *Fungal Genet Biol* **42**: 9-19.
- Michielse CB, Hooykaas PJJ, van den Hondel CAMJJ & Ram AFJ (2005b) *Agrobacterium*-mediated transformation as a tool for functional genomics in fungi. *Curr Genet* **48**, 1-17.
- Mcclelland CM, Chang YC & Kwon-Chung KJ (2005) High frequency transformation of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gatti* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Fungal Genet Biol* **42**: 904-913.
- Mokaddas EM, Al-Sweih NA & Khan ZU (2007) Species distribution and antifungal susceptibility of *Candida* bloodstream isolates in Kuwait: a 10-year study. *J Med Microbiol* **56**: 255-259.

- Paulitsch A, Weger W, Ginter-Hanselmayer G, Marth E & Buzina W (2006) A 5 year (2000-2004) epidemiological survey of *Candida* and non-*Candida* yeast species causing vulvovaginal candidiasis in Graz, Austria. *Mycoses* **49**: 471-465.
- Richardson MD (2005) Changing patterns and trends in systemic fungal infections. *J Antimicrob Chemother* **56** (Suppl. S1): i5-i11.
- Richardson MD & Warnock DW (2003) Fungal Infection: *Diagnosis and Management*, 3<sup>rd</sup> edn. Blackwell Publishing, Oxford.
- Rooney PJ, Sullivan TD & Klein BS (2001) Selective expression of the virulence factor BAD1 upon morphogenesis to the pathogenic yeast form of *Blastomyces dermatitidis*: evidence for transcriptional regulation by a conserved mechanism. *Mol Microbiol* **39**: 875-889.
- Sambrook J & Russel DW (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.
- Sanglard D, Ischer F, Monod M & Bille J (1996) Susceptibilities of *Candida albicans* multidrug transporter mutants to various antifungal agents and other metabolic inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* **40**: 2300-2305.
- Sullivan TD, Rooney PJ & Klein BS (2002) *Agrobacterium tumefaciens* integrates transfer DNA into single chromosomal sites of dimorphic fungi and yields homokaryotic progeny from multinucleate yeast. *Eukaryot Cell* **1**: 895-905.
- Yang Y-L, Cheng H-H & Lo H-J (2006) Distribution and antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from different age populations in Taiwan (2006) *Med Mycol* **44**: 237-242.

**Table 1.**

*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Candida* species by use of hygromycin selection. Effects of different concentration of target yeast cells and co-cultivation temperature.

<i>Candida</i> species	Number of target yeast/co-cultivation	Number of Hyg <sup>r</sup> transformants/co-cultivation <sup>a</sup>	
		28°C	24°C
<i>C. albicans</i>	10 <sup>4</sup>	1321 ± 183	380 ± 113
	10 <sup>5</sup>	1319 ± 106	667 ± 72
	10 <sup>6</sup>	1310 ± 129	730 ± 126
<i>C. tropicalis</i>	10 <sup>4</sup>	160 ± 57	1399 ± 18
	10 <sup>5</sup>	209 ± 156	1404 ± 182
	10 <sup>6</sup>	235 ± 45	1409 ± 44
<i>C. glabrata</i>	10 <sup>4</sup>	0	2.4 ± 2.0
	10 <sup>5</sup>	4 ± 3.5	24 ± 6.5
	10 <sup>6</sup>	50 ± 15	68 ± 14

<sup>a</sup> Each result is the mean of three independent transformation experiments ± standard error of the mean. Co-cultivation was performed at either 28°C or 24°C.

## Figures legends

Fig. 1 Polymerase chain reaction (PCR) of *Candida* wild-type strains and AMT transformants using the *hph*-specific primers. M- 100bp DNA molecular size marker; pc- pBTS4 plasmid DNA (positive control); wt- *Candida* wild-type DNA; lines 1-3- *C. albicans* hygromycin-resistant transformants; lines 4-6- *C. tropicalis* hygromycin-resistant transformants; lines 7-9- *C. glabrata* hygromycin-resistant transformants.

Fig. 2 Dot blot analysis of wild-type (negative control) and nine hygromycin-resistant strains transformed with the *hph* gene. (a) correspond to *C. albicans* wild-type (wt) and transformants (1-9); (b) correspond to *C. tropicalis* wild-type (wt) and transformants (1-9); (c) correspond to *C. glabrata* wild-type (wt) and transformants (1-9).

Fig. 3 (A,B) *A. tumefaciens* and *Candida* interaction under co-cultivation at a Field Emission Scanning Electron Microscope. A (a,b) show the attachment of *Agrobacterium* with aggregates at and around the *C. glabrata* cells and (c) *C. albicans* germ tube; B (a,b) show the presence of extracellular matrix, resembling biofilm connecting neighbouring *C. tropicalis* cells.

Fig. 4 *A. tumefaciens* and *Candida* interaction under co-cultivation at a Field Transmission Electron Microscope. (a) *C. albicans* 46000x; (b) *C. albicans* 97000x; (c) *C. tropicalis* 18500x and (d) *C. tropicalis* 97000x show yeast-bacteria cell contact. At, *Agrobacterium tumefaciens*; Ca, *Candida albicans*; Ct, *Candida tropicalis*.

Figure 1

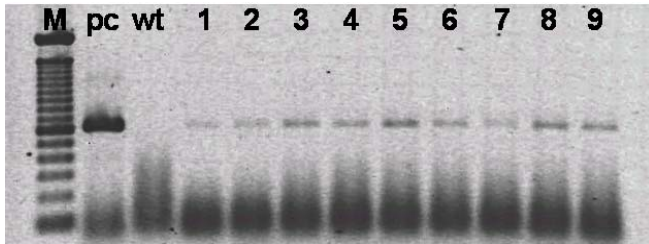




Figure 3A

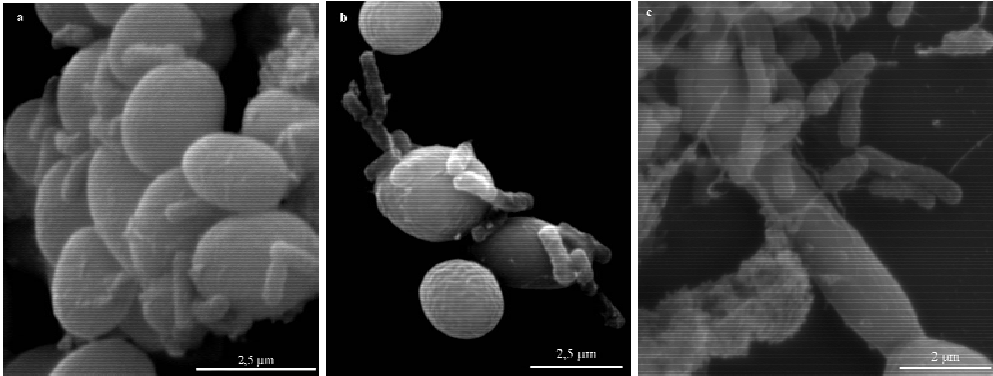


Figure 3B

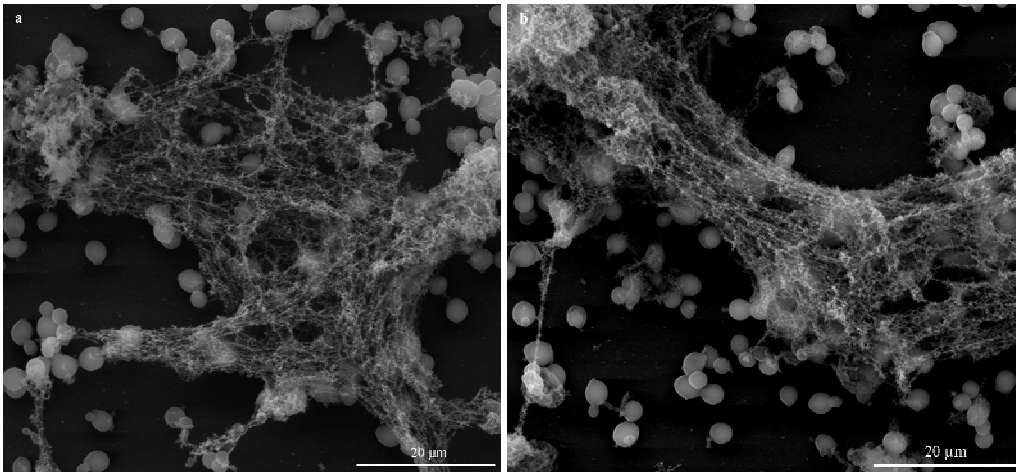


Figure 4

