



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

SANDMARY DECHECHI CHAMBÓ

**AVALIAÇÃO DA ESPECIFICIDADE E ATIVIDADE
ANTIFÚNGICA *IN VITRO* E *IN VIVO* DE ANTICORPOS IGY
CONTRA DOIS TIPOS MORFOLÓGICOS (HIFA E
LEVEDURA) DE *Candida albicans***

Londrina
2013

SANDMARY DECHECHI CHAMBÓ

**AVALIAÇÃO DA ESPECIFICIDADE E ATIVIDADE
ANTIFÚNGICA *IN VITRO* E *IN VIVO* DE ANTICORPOS IGY
CONTRA DOIS TIPOS MORFOLÓGICOS (HIFA E
LEVEDURA) DE *Candida albicans***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina como requisito para obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Emerson José Venancio.

Londrina
2013

**Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

C446a Chambó, Sandmary Dechechi.

Avaliação da especificidade e atividade antifúngica *in vitro* e *in vivo* de anticorpos IgY contra dois tipos de morfológicos (hifa e levedura) de *Candida albicans* / Sandmary Dechechi Chambó. – Londrina, 2013.
71 f. : il.

Orientador: Venancio, Emerson José.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2013.

Inclui bibliografia.

1. *Candida albicans* – Teses. 2. Imunoglobulinas – Teses. 3. Imunoterapia – Teses. 4. *Candidíase* – Teses. 5. Fungos patogênicos – Teses. 6. Patologia experimental – Teses. I. Venancio, Emerson José. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

CDU 616-092

SANDMARY DECHECHI CHAMBÓ

**AVALIAÇÃO DA ESPECIFICIDADE E ATIVIDADE
ANTIFÚNGICA *IN VITRO* E *IN VIVO* DE ANTICORPOS IGY
CONTRA DOIS TIPOS MORFOLÓGICOS (HIFA E
LEVEDURA) DE *Candida albicans***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina como requisito para obtenção do título de mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Emerson José Venancio
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Ricardo Sergio Couto de Almeida
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Wagner Loyola
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária -
EMBRAPA

Londrina, 04 de outubro de 2013.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Emerson Jose Venancio, pelo seu profissionalismo, pela confiança, pelas orientações e meu amadurecimento científico.

Aos membros da comissão examinadora na sessão de qualificação, Prof. Dr. Ricardo Sergio de Couto Almeida e Dr. Wagner Loyola, pelas valiosas contribuições e correções, que melhoraram o conteúdo deste trabalho.

A todos os colegas do laboratório de Imunologia IV, obrigada pela companhia e pelas trocas de experiência.

Aos colegas do laboratório de Micologia Médica NIP 9, pelo auxílio e apoio em muitos momentos.

Ao prof Dr Luciano Panagio, pelo profissionalismo e pelos ensinamentos no decorrer do mestrado.

Ao Prof Dr. Ricardo Sergio Couto de Almeida, pela ética, profissionalismo, confiança e pelo direcionamento que deu ao meu trabalho.

Ao meu namorado Renato Cardoso, que foi essencial para essa etapa da minha vida, com todo seu apoio, compreensão, paciência, amor, dedicação e ajuda, meu muito obrigado com muito amor. E a sua família que me acolheu em Londrina, no qual considero minha segunda família por todo cuidado e dedicação que tem comigo.

Aos meus pais, Walter Neto Chambó e Cleusa Dechechi Chambó, pelo amor, apoio, paciência e dedicação que sempre tiveram comigo por toda minha vida e continuam tendo.

Enfim, agradeço a *Deus*, por tudo.

“Independentemente das circunstâncias,
devemos ser sempre humildes, recatados e
despidos de orgulho”

Dalai Lama

CHAMBO, Sandmary Dechechi. **Avaliação da especificidade e atividade antifúngica *in vitro* e *in vivo* de anticorpos IgY contra dois tipos morfológicos (hifa e levedura) de *Candida albicans***. 2013. 65p. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

RESUMO

Candida albicans é um micro-organismo comensal da cavidade oral, do trato gastrointestinal e do sistema reprodutor em humanos, onde podem viver sem causar danos ao hospedeiro, a menos que existam condições predisponentes que permitam a ocorrência de infecções superficiais ou sistêmicas. Nas últimas décadas tem sido demonstrado que a imunidade humoral pode proteger o hospedeiro contra infecções por *C. albicans*, se anticorpos protetores estão disponíveis em quantidades suficientes. A utilização de anticorpos em procedimentos experimentais é amplamente documentada na literatura, demonstrando ser uma poderosa ferramenta em ensaios de diagnósticos e também na imunoterapia de diversas patologias. A IgY é uma classe de imunoglobulina encontrada em aves e sua obtenção e purificação a partir do ovo de galinha é uma importante opção aos métodos tradicionais de produção de anticorpos que utilizam mamíferos. Assim, anticorpos IgY, estão sendo estudados como uma alternativa para a produção de anticorpos para imunoterapia e imunodiagnóstico de doenças. Nosso objetivo foi produzir e avaliar a efetividade de anticorpos IgY específicos, utilizando a cepa de *C. albicans* SC5314 para a produção dos anticorpos em galinhas poedeiras (White Leghorns). Para o inóculo de leveduras e hifas, o fungo foi fixado com timerosal e inoculado no músculo peitoral dos animais. Após a quarta inoculação, os ovos foram coletados e os anticorpos foram isolados da gema do ovo. Para avaliar a efetividade dos anticorpos produzidos, nós realizamos um ensaio de inibição do fungo e um modelo invertebrado de infecção (*Tenebrio molitor*). Um inóculo de 5×10^5 leveduras por larva foi capaz de matar 100 % das larvas em 12 horas de incubação a 37°C, enquanto que com a co-inoculação de 100µg de anticorpos IgY anti-levedura ou anti-hifa proporcionaram uma sobrevivência de 16,66% e 33,33%, respectivamente, após 72 horas de infecção. Nossos resultados demonstram que os anticorpos produzidos possuem uma atividade protetora *in vivo* contra a infecção pelo fungo patogênico *C. albicans*, abrindo o caminho para o desenvolvimento de novas terapias.

Palavras-chave: IgY. Anticorpo. *Candida albicans*. Imunoterapia.

CHAMBO, Sandmary Dechechi. **Evaluation of specificity and antifungal activity *in vitro* and *in vivo* of IgY antibody against two morphological types (hyphae and yeast) of *Candida albicans***. 2013. 65p. Dissertation (Master degree in Experimental Pathology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

ABSTRACT

Candida albicans is a commensal microorganism of the oral cavity, gastrointestinal tract and reproductive system in humans, where they can live without causing harm to the host, unless occurs predisposing conditions that enabling the occurrence of superficial infections or systemic infections. In recent decades, has been shown that humoral immunity can protect the host against fungal infection, only if protective antibodies are available in sufficient quantities. The use of antibodies in experimental procedures are well documented in the literature , proving to be a powerful tool in diagnostic assays and also in immunotherapy of various diseases. The IgY is a class of immunoglobulin found in birds and their production and purification from chicken egg is an important alternative to traditional methods of antibody production that use mammals. Thus, IgY antibodies are being studied as an alternative to the production of antibodies for immunotherapy and immunodiagnosis of diseases. Our aim was to produce and evaluate the effectiveness of specific IgY antibodies, using *C. albicans* SC5314 strain for the production of antibodies in laying hens (White Leghorns). For the inoculum of yeast and hyphae, the fungus was fixed with thimerosal and inoculated in the pectoral muscle of animals. After the fourth inoculation, eggs were collected and antibodies were isolated from the egg yolk. To evaluate the effectiveness of produced antibodies, we conducted an invertebrate model of infection (*Tenebrio molitor*) and a test of fungal inhibition. An inoculum of 5×10^5 of yeast per larva was able to kill 100% of larvae in 12 hours of incubation at 37°C, while the co-injection of 100µg anti-yeast or anti-hyphae antibody IgY provided a survival of 16.66% and 33.33%, respectively, after 72 hours of infection. Our results demonstrate that antibodies produced have a protective activity *in vivo* against infection by the pathogenic fungus *C. albicans*, providing new ways for development of new therapies.

Key words: IgY. Antibody. *Candida albicans*. Immunotherapy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura A** – Diferenças estruturais de IgG de mamíferos e IgY 18
- Figura 1** – Níveis de imunoglobulinas IgY anti-levedura (A) e IgY anti-hifa (B) presentes no soro de galinhas poedeiras inoculadas com o fungo *C. albicans* na forma de levedura e hifa respectivamente28
- Figura 2** – Perfil eletroforético (SDS-PAGE 10%) dos extratos de *C. albicans* na forma de levedura e hifa e análise por Western blot dos componentes dos extratos reconhecidos por anticorpos IgY presentes na gema dos ovos de galinhas poedeiras imunizadas29
- Figura 3** – Atividade candidacida. Análise da atividade dos anticorpos IgY anti-levedura e anti-hifa comparadas com a IgY controle na concentração de 7,5mg/mL no tempo de 0, 6 e 12 horas 30
- Figura 4** – Curva de sobrevivência. Os grupos, IgY anti-levedura, anti-hifa e IgY controle foram inoculados com 5×10^5 leveduras juntamente com seus respectivos anticorpos, n= 18. O grupo *C. albicans* recebeu somente 5×10^5 leveduras. No grupo controle, as larvas receberam apenas PBS. 31

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	FUNGOS PATOGÊNICOS	10
1.2	O GÊNERO CANDIDA	11
1.2.1	Resposta Imune Contra Candidíase.....	13
1.3	MODELOS INVERTEBRADOS DE INFECÇÃO	14
1.4	IGY	16
2	OBJETIVOS	21
2.1	OBJETIVO GERAL	21
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
3	METODOLOGIA	22
3.1	CEPA UTILIZADA.....	22
3.1.1	Condições de Cultivo de Células Fúngicas	22
3.2	ANIMAIS	22
3.3	PREPARAÇÕES DO ANTÍGENO	22
3.3.1	Levedura.....	22
3.3.2	Hifa	23
3.4	PREPARAÇÕES DO INÓCULO.....	23
3.5	EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE IMUNOGLOBULINA Y (IGY)	24
3.6	EXTRAÇÃO DE PROTEÍNA	24
3.7	DETERMINAÇÕES DO TÍTULO DOS ANTICORPOS CONTRA C. ALBICANS	25
3.8	CARACTERIZAÇÕES PARCIAIS DOS ANTÍGENOS RECONHECIDOS PELOS ANTICORPOS IGY ANTI-C. ALBICANS POR WESTERN BLOT	26
3.9	ATIVIDADE CANDIDACIDA	26
3.10	MODELO INVERTEBRADO DE INFECÇÃO	26
3.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	27
4	RESULTADOS	28
5	DISCUSSÃO	33

6	CONCLUSÃO	36
	REFERÊNCIAS	37
	APÊNDICES	42
	APÊNDICE A - Artigo para publicação	43
	ANEXOS	61
	ANEXO A - Normas da revista Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis	62

1 INTRODUÇÃO

1.1 FUNGOS PATOGÊNICOS

Ao longo dos últimos anos, os fungos surgiram como um dos principais causadores de infecções hospitalares. Esses micro-organismos são em sua maioria oportunistas, podendo causar infecções quando as defesas do hospedeiro estão comprometidas. Estas infecções são um importante problema clínico, devido ao aumento de populações em risco, como os pacientes imunodeprimidos, os indivíduos submetidos às cirurgias de grande porte, os pacientes com câncer, entre outros (SHOHAM; LEVITS, 2005). Como o sistema imunológico destes pacientes fica debilitado, os antifúngicos são de eficácia limitada, resultando em falhas no tratamento. Outros fatores que contribuem para o aumento da incidência de infecções fúngicas, são o uso indiscriminado de antifúngicos e o aumento do tempo de permanência em terapias intensivas, resultando assim, no aparecimento de cepas resistentes e no aumento das taxas de mortalidade. Fazendo-se necessário o desenvolvimento de novos métodos terapêuticos (RICHARDSON, 2005; TOROSANTUCCI et al., 2009).

Existem mais de cem mil espécies de fungos, porém, apenas uma pequena percentagem é conhecida por causar infecções em humanos (SHOHAM; LEVITS, 2005). Dentre os principais fungos patogênicos no homem, destacam-se: as leveduras do gênero *Candida*, como *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei*; as espécies do gênero *Aspergillus*, como *A. fumigatus*, *A. terreus* e *A. flavus*; as espécies do gênero *Cryptococcus*, como *C. neoformans* e *C. gattii*; as espécies de *Fusarium*, como *F. solani*, *F. moniliforme* e *F. oxysporum*; e algumas espécies de *Trichosporon*, como *T. asahii*, *T. mucoides*, *T. asteroides* e *T. cutaneum*. Infecções causadas por esses fungos variam desde micoses superficiais, como candidíase orofaríngea, até infecções sistêmicas persistentes, como candidíase disseminada, meningite criptocócica e aspergilose pulmonar invasiva (SHOHAM; LEVITS, 2005; REGASINI et al., 2010; LI et al., 2008).

1.2 O GÊNERO CANDIDA

Taxonomicamente as espécies do gênero *Candida* são pertencentes da família Candidaceae, da ordem Saccharomycetales, da classe Sacchromycetes, do filo Ascomycota, do Reino Fungi. Cerca de 150 espécies pertencem a esse gênero, mas apenas 13 espécies são capazes de causar infecção em seres humanos. *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. famata*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. inconspicua*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. utilis* e *C. viswanathii* formam o grupo de espécies patogênicas conhecidas (ODDS, 1988; CALDERONE, 2002).

Nos Estados Unidos da América, *Candida spp.* correspondem ao terceiro isolado mais frequente de hemoculturas nas infecções hospitalares, sendo *C. albicans* a espécie mais frequentemente isolada (aproximadamente 50%) (PERLROTH et al., 2007).

Há poucos estudos disponíveis na literatura sobre a real incidência das infecções hematogênicas causada por espécies de *Candida* no Brasil. Um estudo realizado em São Paulo demonstrou que este gênero corresponde por 4,3% do total das infecções da corrente sanguínea (COLOMBO et al., 2006). Outros estudos mostraram que espécies não-*albicans* foram os principais agentes isolados, mostrando a importância de *C. tropicalis* (HINRICHSEN et al., 2008) e *C. parapsilosis* (BRUDER-NASCIMENTO et al., 2010) em infecções fúngicas nosocomiais.

O fungo *C. albicans* é um micro-organismo comensal da cavidade oral, do trato gastrointestinal e do sistema reprodutor em humanos. Entretanto, ele é capaz de causar doença quando o equilíbrio da microbiota é perturbado, por exemplo, durante o tratamento com antibióticos por longos períodos de tempo, ou se o sistema imune do hospedeiro é comprometido. Existem duas formas principais de infecção: as superficiais da pele e da mucosa, e a candidíase invasiva, na qual o fungo pode disseminar-se por todo o sistema sanguíneo e infectar praticamente todos os órgãos do hospedeiro (CALDERONE, 2002).

C. albicans possui certa maleabilidade morfogênética, podendo crescer em várias formas, como levedura, hifa ou até mesmo como uma forma intermediária, a pseudohifa. Na forma de levedura, o crescimento ocorre pelo processo de brotamento, enquanto as hifas iniciam-se pela formação do tubo

germinativo e crescem com o alongamento apical desta estrutura. Em contraste, as pseudohifas são células leveduriformes alongadas, que se multiplicam sem separação, formando uma cadeia de células (WHITEWAY; OBERHOLZER, 2004; SHOHAM; LEVITS, 2005).

Embora todas as três formas morfológicas (levedura, pseudohifa e hifa) possam ser observadas em órgãos colonizados por *C. albicans*, a capacidade de formar hifas *in vivo* é considerada um importante fator de virulência. Cepas mutantes geradas em laboratório, incapazes de formarem hifas, apresentam virulência atenuada em modelos de candidíase disseminada em camundongos (LO, et al., 1997). A formação de hifas pode ser promovida por uma série de condições ambientais, como o crescimento numa temperatura de 37 °C, pH neutro e CO₂ elevado. Esta forma morfológica tem sido relacionada ao aumento da virulência em decorrência da variabilidade antigênica da superfície e do seu formato que favorece uma maior aderência, dificultando a fagocitose pelo sistema imune (KUMAMOTO; VINCES, 2005; KIM; SUDBERY, 2011).

Além da formação de hifas o fungo *C. albicans* expressa outros fatores de virulência que colaboram para a colonização no hospedeiro, culminando no desenvolvimento da doença, tais como a adesão das células hospedeiras, a mudança fenotípica, e a formação do tubo germinativo. Há uma variedade de enzimas hidrolíticas que podem ser encontradas em filtrados da cultura de células do fungo, tais como proteases, fosfolipases, fosfatase ácida, quitinases e esterases. Algumas dessas enzimas correspondem a importantes fatores de virulência do fungo, como a aspartil proteinase (Sap), uma das enzimas hidrolíticas mais estudadas. As Saps são as principais enzimas responsáveis pela atividade proteolítica extracelular de *C. albicans* e compõem uma família de pelo menos 10 genes (SAP 1-10) que codificam proteínas de massa molecular entre 42 e 44 kDa (NAGLIK et al., 2003; REHANI et al., 2011). Em ambas as formas (hifa e levedura), elas são expressas *in vivo* durante uma infecção por *C. albicans*, podendo levar a uma forte ativação da resposta humoral (IBRAHIM EL-SM et al., 2008; MARTÍNEZ, 1998).

1.2.1 Resposta Imune Contra Candidíase

A maioria dos fatores relacionados com a patogenicidade e virulência do fungo residem na sua parede celular, pois é o local onde se encontra uma rica fonte de antígenos. Ela é uma estrutura complexa e de grande importância para o fungo, responsável pela caracterização de cada forma de seu crescimento (levedura, pseudohifa e hifa), desempenhando papéis nutricionais e mediando sua interação inicial entre o micro-organismo e o hospedeiro (CHAFFIN, 2008).

A parede celular de *C. albicans* é composta por polímeros de glicose com ligações β -1,3 e β -1,6 glucanas, cadeias de *N*-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) com ligações β -1,4 (quitina) e polímeros de manose (manana) covalentemente associados com proteínas (manoproteínas). Os principais componentes de sua parede celular, representando 80-90% são compostos por manana ou manoproteínas, β -glucanas e quitina. As proteínas e os lipídeos representam 6-25% e 1-7% respectivamente. As proteínas e as manoproteínas das paredes fúngicas são capazes de induzir uma forte resposta humoral no hospedeiro, com capacidade de produzir elevados níveis séricos de anticorpos (MARTÍNEZ et al., 1998; LOPEZ-RIBOT et al., 2004).

Durante a interação fungo-hospedeiro a parede do fungo é capaz de ativar e modular tanto a resposta inata como a resposta adaptativa. As células T e as células da imunidade inata são consideradas a mais importante linha de defesa contra a candidíase (LOPEZ-RIBOT et al., 2004).

Pacientes que apresentam neutropenia, ou tenham alguma deficiência na imunidade celular, desenvolvem com frequência micoses, podendo manifestar formas graves de doenças fúngicas (MACHADO et al., 2004). Assim pacientes com linfoma, leucemia, doença granulomatosa crônica e quimioterapia, que apresentam deficiências na imunidade inata, são mais suscetíveis à infecção disseminada causada por *Candida spp.*. Os neutrófilos e monócitos reconhecem as células de leveduras opsonizadas e não opsonizadas por meio de receptores de superfície celular de reconhecimento padrão, como os receptores do tipo Toll (TLR: toll like receptors), receptores de manose e receptores de β -glucanas. A morte do patógeno pode ocorrer por mecanismos oxidativos, e a fagocitose pode ser aumentada por citocinas pró-inflamatórias (SHOHAM; LEVITS, 2005).

Por outro lado, nas últimas décadas algumas evidências comprovam que anticorpos específicos são extremamente importantes para a defesa do hospedeiro durante uma infecção na mucosa ou uma infecção sistêmica. Han et al. (1998) verificaram a atividade protetora de anticorpos monoclonais contra manana de *Candida*, mostrando que uma resposta de anticorpos adequada, ou a administração de anticorpos protetores, pode ajudar o hospedeiro na infecção vaginal. Independente da resposta imune utilizada, todas as respostas ou mecanismos podem funcionar sinergicamente no intuito de combater a infecção (LOPEZ-RIBOT et al., 2004).

A prevenção da aderência, neutralização de toxinas, e opsonização são as principais funções dos anticorpos nas infecções fúngicas (POLONELLI et al., 2000). Os mecanismos exatos pelos quais os anticorpos protegem contra infecção por espécies do gênero *Candida* são pouco compreendidos, mas provavelmente incluem a inibição da adesão do fungo à célula do hospedeiro, inibição da formação do tubo germinativo, opsonização, neutralização de enzimas que estão relacionadas com a virulência do fungo e a atividade candidacida direta (LOPEZ-RIBOT et al., 2004).

1.3 MODELOS INVERTEBRADOS DE INFECÇÃO

O modelo murino é o mais utilizado para o estudo de infecções fúngicas que acometem o homem, devido à semelhança do seu sistema imune com o sistema imune humano. Entretanto, modelos invertebrados estão sendo cada vez mais utilizados como um modelo válido para o estudo da virulência de organismos patogênicos, que podem causar doença em humanos. Porém a escolha de um modelo animal depende principalmente do efeito específico a ser estudado. Atualmente há vários estudos em modelos invertebrados utilizando *Galleria mellonella*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, entre outras (JACKSON et al., 2009; ARVANITIS et al., 2013).

A larva da mariposa *Galleria mellonella*, por exemplo, apesar de não possuir ainda um genoma sequenciado, apresenta algumas vantagens únicas em relação a alguns modelos de infecção em ratos e camundongos, sendo capaz de se manter sob várias condições de temperatura (25°C - 37°C), possibilitando a

compreensão das características relacionadas com as respostas imunes assim como a virulência do fungo (JACKSON et al., 2009; SEED; DENNIS, 2008).

O nematódeo de vida livre, *Caenorhabditis elegans* vem ganhando muita atenção como um modelo para uma variedade de doenças infecciosas e estudos imunológicos, sendo geneticamente acessível, tornando-se um modelo favorável por seu ciclo de vida rápido, pelo sistema fisiológico simples, e por sua cutícula ser transparente permitindo a observação direta dos processos que acontecem no seu interior. Desta forma ele vem se tornando um modelo muito promissor para o estudo de potenciais compostos anti-fúngicos, e para a análise das características de importantes fatores de virulência dos fungos (MARSH; MAY, 2012; ARVANITIS et al., 2013; KRAMER, 1994).

Nos últimos anos a *Drosophila melanogaster* tem se tornado um modelo interessante para se obter conhecimento sobre o estudo da resposta imune do hospedeiro, sendo muito utilizada como um modelo experimental para estudos sobre fatores de virulência fúngicas visando à identificação de novos anti-fúngicos, como também, processos moleculares e celulares (ARVANITIS et al., 2013 e KAUN et al., 2012).

Além dos modelos citados acima, há vários outros animais invertebrados que são utilizados para estudar diferentes características na patogênese de doenças, como por exemplo, a larva do besouro *Tenebrio molitor*, onde alguns trabalhos demonstram que uma proteína antifúngica deste inseto (Tenecin 3) parece exercer uma ação fungicida contra o fungo *C. albicans* (KIM et al., 2001; LEE et al., 1999).

Embora as pesquisas mostrem que os invertebrados são separados por milhões de anos de evolução em relação aos mamíferos, muitos aspectos do sistema imune inato são conservados entre as espécies (JACKSON et al., 2009; ARVANITIS et al., 2013).

A imunidade inata dos insetos, por exemplo, partilham uma grande semelhança estrutural e funcional com o sistema imune inato dos mamíferos, porém ela não exhibe memória ou mecanismos de seleção clonal, mas apresentam uma grande resistência as infecções microbianas. A resposta humoral desses insetos é constituída pela melanização, coagulação da hemolinfa e uma série de peptídeos antimicrobianos. A imunidade mediada por células incluem a fagocitose e o

encapsulamento dos micro-organismos (HOFFMANN, 1995; JACKSON et al., 2009; SEED; DENNIS, 2008).

Nos insetos, o resultado de uma lesão séptica leva ao desencadeamento de duas cascatas proteolíticas que resultam na coagulação da hemolinfa e a melanização, representando um importante papel na resposta inata dos insetos frente à infecção. Algumas proteínas destas cascatas podem se ligar a componentes microbianos, como lipopolissacarídeos (LPS), peptidoglicanos e β 1,3-glucanas servindo para o reconhecimento dos micro-organismos (HOFFMANN, 1995).

As semelhanças entre os mecanismos do sistema imunológico inato de insetos e humanos confirma a importância da utilização de modelos invertebrados na imunologia, se tornando um modelo de infecção atrativo, sendo eticamente aceitável, facilitando assim a sua utilização para experimentação *in vivo* (PURSALL; ROLFF, 2011).

1.4 IgY

Os linfócitos B ativados podem se diferenciar em células secretoras de anticorpos (imunoglobulinas), denominados plasmócitos, sendo esses, encontrados em uma variedade de animais, incluindo mamíferos e aves (SILVA; TAMBOURGI, 2010).

Nas aves, apenas três classes de imunoglobulinas são produzidas: IgM, IgA e IgY (TIZARD, 2002). Esses anticorpos têm propriedades específicas que podem ser exploradas de várias maneiras em investigação, diagnóstico e terapia. A IgM e IgA das aves são equivalentes às imunoglobulinas presentes nos mamíferos quanto à estrutura, peso molecular e mobilidade eletroforética (CARLANDER, 2002).

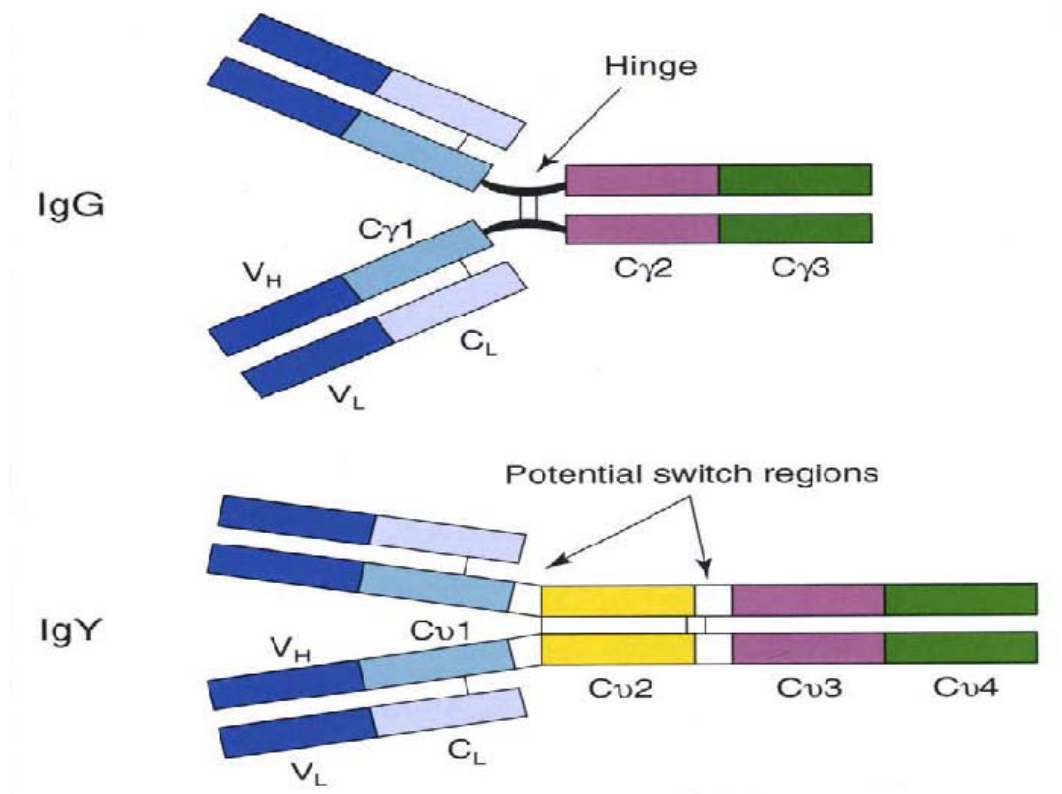
A classe de anticorpos IgM aparece depois de aproximadamente 5 dias de exposição ao antígeno e seus títulos diminuem entre o 10º e o 12º dia. A IgA é produzida geralmente após o 5º dia de exposição ao agente infeccioso em locais específicos, como nas secreções do trato gastrointestinal, do trato respiratório e secreções lacrimais. A classe IgY aparecem posteriormente e são mais específicas para reconhecimento pelo linfócito B e produção de anticorpos (TIZARD, 2002).

A IgY é a classe de anticorpo mais abundante no soro, com concentrações que variam de 5 a 15 mg/ml em galinhas poedeiras, enquanto que a

IgM e a IgA possuem concentrações mais baixas (IgM: 1 e 3 mg/ml e IgA 0.3 e 0.5 mg/ml) (SPILLNER et al., 2012). A imunoglobulina Y é o principal anticorpo de baixo peso molecular em animais ovíparos, e durante a formação do ovo, a IgY presente no soro é transferida seletivamente para a gema por um receptor específico de membrana (CARLANDER, 2002; KOVACS-NOLAN; MINE, 2012).

Historicamente, a IgY foi denominada IgG devido à função que compreende e a sua concentração sanguínea que é similar a da IgG dos mamíferos, mas existem algumas diferenças marcantes nas suas estruturas químicas (MORRISON; MOHAMMED et al., 2001). Esta classe de anticorpo apresenta um peso molecular de aproximadamente 160 kDa e ponto isoelétrico entre 5,7 a 7,6, e é composta por duas cadeias leves (L), e duas cadeias pesadas (H). A cadeia pesada é de 67-70 kDa, formada por uma região variável e quatro regiões constantes (CH1, CH2, CH3 e CH4). O domínio CH2 está relacionado com a região de dobradiça da molécula IgG dos mamíferos, porém a região de dobradiça da IgY é mais curta e menos flexível do que a IgG, podendo esta ser uma das razões das diferenças estruturais entre IgY e IgG (Figura A). Já a cadeia leve apresenta peso molecular entre 19-21 kDa, formada pelos domínios variável (VL) e constante (CL) (WARR et al., 1995, MORRISON; MOHAMMED, 2001; HATTA et al., 1993).

Figura. A - Diferenças estruturais de IgG de mamíferos e IgY (Warr et al., 1995, com modificações).



A estabilidade da IgY sob processamento e condições fisiológicas é muito importante para aplicações de imunoterapia passiva. Foi demonstrado que a atividade da IgY diminui com o aumento da temperatura e do tempo. A mínima perda da atividade é observada após o aquecimento entre 60 °C e 65 °C, e a atividade pode ser rapidamente reduzida por um aquecimento de 30 minutos à 70 °C ou temperatura superior. Este anticorpo é estável entre pH 4 e 11, mas com um pH abaixo de 3,5 ou acima de 12, demonstra uma redução da atividade, através de rápidas mudanças conformacionais podendo ser melhorado pela adição de estabilizantes, tais como os açúcares (HATTA et al., 1993; LEE et al., 2002; SHIMIZU et al., 1988).

A imunoglobulina Y possui características vantajosas sobre a IgG dos mamíferos, resultante pela distância filogenética entre aves e mamíferos. Assim a IgY não ativa o sistema complemento de mamíferos, e não possuem reação cruzada com seus receptores Fc e fator reumatóide, reduzindo resultados falsos positivos em ensaios imunológicos. Estudos demonstram que a IgY pode ser mais hidrofóbica que a IgG, fator que corresponde ao meio rico em lipídios da gema.

Desta maneira, os anticorpos da classe IgY, estão sendo intensamente estudados como uma alternativa para a produção de anticorpos para imunoterapia e imunodiagnóstico de doenças. A utilização desta imunoglobulina se justifica por ser encontrada em altas concentrações na gema do ovo, de onde pode ser purificada com processos de baixo custo. Dada a capacidade de postura de uma galinha, que chega a cerca de 330 ovos por ano, sendo que 20g de IgY total pode ser obtida de uma galinha (MATHEIS; SCHADE, 2011). Normalmente o processo de produção de anticorpos não ocasiona sofrimento ao animal. Além disso, diversos estudos apontam que anticorpos IgY produzidos em galinhas poedeiras têm ação eficaz contra bactérias, parasitas, vírus e fungos (WANG et al., 2008; SPILLNER et al., 2012).

A produção de grandes quantidades de IgY é o ponto chave para a utilização bem sucedida na imunização passiva. Deste modo, o anticorpo IgY vem sendo cada vez mais estudado, a fim de melhorar a produção e deposição de anticorpos na gema, assim como, as vias de imunizações, os adjuvantes e os diferentes tipos de antígenos (HATTA et al., 1993).

O primeiro trabalho que demonstrou a ação inibitória de anticorpos IgY contra fungos foi publicado por Wang et al. (2008). Os autores observaram que anticorpos anti-*C. albicans* podem inibir o crescimento de *C. albicans* "in vitro". No mesmo ano, Ibrahim et al., mostraram que anticorpos IgY anti-*C. albicans* são capazes de inibir a aderência do fungo às células FaDu (linhagem de células epiteliais orofaríngeas humanas) e que a administração oral de anticorpos IgY reduz significativamente o número de *C. albicans*, a intensidade de lesões na língua de camundongos e a colonização dos órgãos desses animais.

O mecanismo pelo qual os anticorpos IgY interferem no processo infeccioso é um aspecto pouco estudado. Na maioria dos casos é observada a inibição de moléculas importantes para infecção, como moléculas de adesão, toxinas e outros fatores de virulência. Porém, alguns estudos demonstram que os anticorpos IgY podem ter uma ação direta sobre o micro-organismo, por mecanismos desconhecidos, que podem ser observados em *Cryptosporidium parvum*, *Salmonella enteritidis* e *Salmonella typhimurium*. Anticorpos IgY específicos para *Salmonella* podem ligar-se nos antígenos expressos em sua superfície, resultando em alterações estruturais na superfície bacteriana. Estudos *in vitro*, demonstraram a atividade de ligação de IgY contra *S. enteritidis* e *S. typhimurium*, resultando na

inibição do crescimento bacteriano, sugerindo que moléculas de IgY se ligam a superfície da *Salmonella* levando ao comprometimento funcional de seus componentes (KOBAYASHI et al., 2004; LEE et al., 2002).

Estas características fazem dos anticorpos IgY uma alternativa promissora para o uso em imunoterapia passiva (CARLANDER et al., 2000).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a especificidade e atividade antifúngica *in vitro* e *in vivo* de anticorpos IgY contra dois tipos morfológicos (hifa e levedura) de *C. albicans*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Produzir e purificar anticorpos IgY específicos contra leveduras e hifas de *C. albicans*.

Avaliar o nível de anticorpos IgY específicos produzidos por galinhas poedeiras inoculadas com o fungo *C. albicans*.

Caracterizar, pelos métodos de ELISA e Western blot, os antígenos reconhecidos pelos anticorpos IgY específicos contra *C. albicans*.

Avaliar *in vitro* a ação dos anticorpos IgY específicos contra leveduras e hifas através de ensaios de inibição de crescimento e ensaio candidacida.

Investigar o efeito antifúngico dos anticorpos *in vivo*, utilizando um modelo invertebrado de infecção.

3 METODOLOGIA

3.1 CEPA UTILIZADA

Neste estudo foi utilizada a cepa de *C. albicans* (SC5314), gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Bernhard Hube, Friedrich Schiller Universitaet, Jena, Alemanha, para a produção de anticorpos IgY anti-hifa e anti-levedura.

3.1.1 Condições de Cultivo de Células Fúngicas

A cepa de *C. albicans* foi mantida em meio YPD ágar (1% extrato de levedura, 1% de peptona, 2% de dextrose, 2% de ágar) a 4 °C com subcultivos a cada 15 dias.

3.2 ANIMAIS

Para a produção de anticorpos IgY específicos contra *C. albicans*, foram utilizadas galinhas poedeiras (White Leghorns), em fase de postura, obtidas da Fazenda Escola da Universidade Estadual de Londrina (UEL) e mantidas em gaiolas na própria Fazenda Escola desta Instituição, sem restrição de ração e água, sob estritas condições éticas, de acordo com as recomendações sobre bem-estar animal, segundo projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina, sob nº 12003/ 2012. Foram utilizadas 04 galinhas até o término do experimento.

3.3 PREPARAÇÕES DO ANTÍGENO

3.3.1 Levedura

A amostra de *C. albicans* mantida em meio YPD ágar foi transferida para caldo YPD e incubada a 37 °C por 16 horas com agitação de 160 rpm. A seguir, as células foram lavadas em tampão PBS com pH 7,4 por centrifugação à 2600 g por 5 minutos. O sedimento celular foi ressuspenso em PBS contendo 0,1% de timerosal e incubado a temperatura ambiente sob agitação por 2 horas. Após

incubação as leveduras foram lavadas e ressuspensas com PBS. A concentração celular foi estimada utilizando câmara de Neubauer. O inóculo foi ajustado para 5×10^7 células/mL. A completa inativação das leveduras pelo timerosal foi verificada pelo plaqueamento da suspensão final em meio YPD sólido e incubação a 37°C por dois dias.

3.3.2 Hifa

A amostra de *C. albicans* mantida em meio YPD ágar foi transferida para caldo YPD e incubada a 37°C por 16 horas com agitação a 160 rpm. A seguir, as células foram lavadas em PBS por centrifugação à 2600 g por 5 minutos. A concentração de 1×10^7 células fúngicas em 2 mL de meio RPMI foi incubada novamente a 37°C por 3 horas com agitação a 160 rpm. A seguir, as células foram lavadas em tampão PBS com pH 7,4 por centrifugação à 2600 g por 5 minutos. O sedimento celular foi ressuspenseado em PBS contendo 0,2% de timerosal e incubado a temperatura ambiente sob agitação por 2 horas. Após incubação as hifas foram lavadas e ressuspensas em PBS. A completa inativação das hifas pelo timerosal foi verificada pelo plaqueamento da suspensão final em meio YPD sólido e incubação a 37°C por dois dias.

3.4 PREPARAÇÕES DO INÓCULO

Para o inóculo de leveduras, uma suspensão de 5×10^7 células/mL, foi misturada volume a volume com adjuvante incompleto de Freund. Assim, cada ave foi inoculada com 400µL da solução de adjuvante contendo 1×10^7 leveduras. Em relação às hifas, uma suspensão de 5×10^6 hifas/mL, foi misturada volume a volume com adjuvante incompleto de Freund, compondo um inóculo de 1×10^6 hifas em 400µL de solução. As injeções das suspensões fúngicas citadas acima foram realizadas em quatro pontos no músculo peitoral. Após 15 dias os animais receberam uma dose de reforço nas mesmas condições, e depois com período de 30 e 45 dias as aves receberam mais doses de reforço.

Os ovos das galinhas poedeiras foram coletados diariamente desde o dia -7 da quarta inoculação até 30 dias após a última inoculação. Os ovos foram

mantidos em geladeira por até 30 dias quando então a gema foi separada da clara e congelada a -20°C até o processamento.

3.5 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE IMUNOGLOBULINA Y (IGY)

Um protocolo de precipitação com sulfato de amônia, seguindo o método descrito por Akita & Nagai (1992) com algumas modificações, foi utilizado para extrair IgY anti-levedura, anti-hifa e IgY controle (pré imune). A gema coletada livre da película protetora foi diluída com seis partes de água destilada ácida e incubada por 18 horas à 4 °C. Após incubação, a solução foi filtrada em papel de filtro Whatmann número 1 também à 4 °C. Ao filtrado foi então adicionado sulfato de amônia até que a concentração final ficasse em 33%, homogenizado e incubado por 30 minutos à temperatura ambiente. Após o período de incubação, a solução foi centrifugada por 15 minutos a 1500 g. O precipitado foi ressuspendido em 5 mL de solução de sulfato de sódio a 18% e incubado a temperatura ambiente por 20 minutos. Após incubação, centrifugado a 2000 g por 20 minutos e ressuspendido em solução de sulfato de sódio a 14%, incubado a temperatura ambiente por 20 minutos. Centrifugado novamente por 20 minutos a 2000 g e ressuspendido em PBS. A IgY purificada foi filtrada em filtros estéreis Millipore, 0,22 µm, de modo a se obter a IgY estéril. A concentração de IgY foi determinada pelo método de Bradford (1976) utilizando BSA como padrão.

3.6 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNA

Para a extração de proteína do fungo *C. albicans* na forma de levedura. Uma amostra de *C. albicans* mantida em meio YPD ágar foi transferida para caldo YPD e incubada a 37 °C por 16 horas com agitação de 160 rpm. Em seguida, as células foram lavadas em tampão PBS com pH 7,4 por centrifugação à 2600 g por 5 minutos, ressuspendido em 1mL e retirado o sobrenadante. A seguir o sedimento foi macerado com nitrogênio líquido até formar um pó, no qual foi adicionado 1 mL de tampão de extração de proteína (Tris base, pH 7,5 – 25mM; EGTA, pH 7,5 – 15mM; Cloreto de magnésio – 15mM), com o inibidor de protease. Logo após, a amostra foi centrifugada por 45 minutos a 5600 g, 4 °C. O sedimento foi descartado, e o sobrenadante recolhido e armazenado a -80 °C.

Para a extração de proteína do fungo na forma de hifa. Uma amostra de *C. albicans* mantida em meio YPD ágar foi transferida para caldo YPD e incubada a 37 °C por 16 horas com agitação de 160 rpm. Em seguida, as células foram lavadas em tampão PBS com pH 7,4 por centrifugação à 2600 g por 5 minutos e ressuspendidas em meio RPMI e incubada novamente a 37°C por 3 horas com agitação a 160 rpm. A seguir, as células foram lavadas em tampão PBS com pH 7,4 por centrifugação à 2600 g por 5 minutos, ressuspendidos em 1 mL e retirado o sobrenadante. O sedimento foi macerado com nitrogênio líquido até formar um pó, no qual foi adicionado 1 mL de tampão de extração de proteína (Tris base, pH 7,5 – 25mM; EGTA, pH 7,5 – 15mM; Cloreto de magnésio – 15mM), com o inibidor de protease. Logo após, foi centrifugado por 45 minutos a 5600 g, 4 °C. O sedimento foi descartado, e o sobrenadante recolhido e armazenado a -80 °C.

3.7 DETERMINAÇÕES DO TÍTULO DOS ANTICORPOS CONTRA *C. ALBICANS*

Os níveis de anticorpos específicos obtidos do soro das galinhas imunizadas foram dosados por ELISA contra antígeno de *C. albicans*, obtido por maceração do fungo em nitrogênio líquido. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976). Estes antígenos foram diluídos em tampão carbonato-bicarbonato, pH 9,6 e 100 µl por poço de antígeno foram colocados em placas de ELISA e incubados por no mínimo 18 horas a 4°C. Após três lavagens com PBS + 0,05% de Tween 20, a placa foi incubada com 150 µl/poço de PBS-leite 5% por 1h, à temperatura ambiente. Após três lavagens, 100 µl/poço de amostras de soros diluídas 1:100 foram adicionadas, e a placa incubada por 1h a temperatura ambiente. Após três lavagens, 100 µl/poço de imunoglobulina de cabra anti-IgY conjugada com peroxidase (1: 40.000) foi adicionada e após 1h, à temperatura ambiente, 150 µl/poço de substrato (10 ml de tampão 0,1M acetato de sódio, 100 µl H₂O₂ 0,05%, 100 µl TMBZ (Sigma, St. Louis, USA); pH 5,0) foi adicionado. Após incubação por 15 minutos no escuro à temperatura ambiente a reação foi interrompida pela adição de 50 µl/poço de ácido sulfúrico 1M. As densidades ópticas foram medidas a 450 nm em um aparelho leitor de ELISA.

3.8 CARACTERIZAÇÕES PARCIAIS DOS ANTÍGENOS RECONHECIDOS PELOS ANTICORPOS IGY ANTI-C. *ALBICANS* POR WESTERN BLOT

Inicialmente, 5µg das amostras do antígeno de *C. albicans* foram misturadas em tampão de amostra (50 mM Tris, pH 6,8; 1% SDS; 0,025% azul bromofenol; 10% glicerol; 20 mM DTT) e submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% com SDS. Os antígenos separados por eletroforese foram transferidos para membrana de nitrocelulose a 30V/18 h e a 50v/1 h, à 4°C. As membranas de nitrocelulose foram bloqueadas com PBS-leite desnatado a 5% por 1 hora à temperatura ambiente. Após duas lavagens as membranas foram incubadas com anticorpos IgY, por 1 hora à temperatura ambiente. Após lavagens, essa membranas foram incubadas com imunoglobulina de coelho anti-IgY conjugada com peroxidase (PBS tween 20 a 0,1% e leite desnatado a 5%) por 1 h a temperatura ambiente. Após as lavagens, as membranas foram incubadas com 16 ml de PBS 1X contendo 5mg de DAB (3,3-diaminobenzidina-4HCl) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), pH 7,2, e 5% H₂O₂. As membranas foram lavadas várias vezes em água destilada para bloquear a reação. Para a estimativa da massa molecular dos antígenos foi usado um padrão de massa molecular.

3.9 ATIVIDADE CANDIDACIDA

Para o teste, um inóculo de *C. albicans* contendo 10⁶ células/mL em tampão PBS, foi misturado com 7,5 mg/ml de anticorpo IgY anti-hifa e anti-levedura e IgY controle. Em diferentes tempos de cultivo (0, 6 e 12 horas), alíquotas foram retiradas, diluídas em PBS e plaqueadas em meio de cultura YPD para a determinação da UFC (unidade formadora de colônia). Uma curva de crescimento foi construída em função do número de UFC e tempo.

3.10 MODELO INVERTEBRADO DE INFECÇÃO

Para análise de sobrevivência, foi utilizado larvas do besouro *Tenebrio molitor*. Larvas pesando 200 mg foram utilizadas em todos os ensaios e inoculadas com 5 x 10⁵ leveduras em 5 µL de PBS. Logo após a inoculação do fungo, as larvas do grupo experimental receberam um inóculo de 5 µL de PBS contendo anticorpos

(anti-levedura ou anti-hifa) na concentração de 100µg/larva. Como controle, larvas infectadas receberam apenas PBS. Os diferentes grupos foram incubados a 37 °C e as larvas foram verificadas a cada 12 horas. A morte das larvas foi avaliada pela ausência de movimento e pela sua melanização.

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

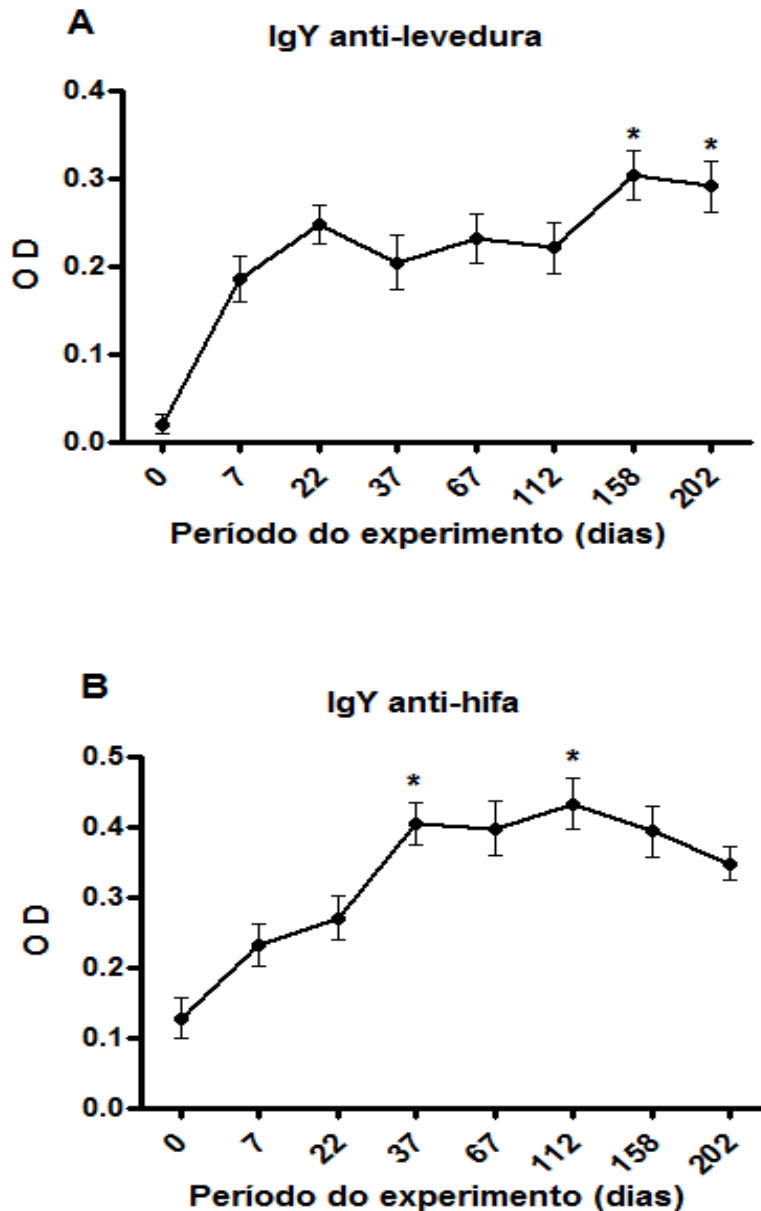
A análise estatística foi realizada através do Graph Pad Prism 5.0 (La Jolla, 5 CA). A distribuição de normalidade foi verificada com o teste de Kolmogorov-Smirnov. Os resultados do ELISA foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis. Para análise de inibição do crescimento, o teste *t-student* foi usado para verificar as diferenças entre o grupo experimental e controle ($P < 0.05$). A sobrevivência das larvas foi estimada pelo método de Kaplan-Meier, seguido pelo teste estatístico log-rank.

4 RESULTADOS

Produção dos níveis de anticorpos IgY anti-*C. albicans*

Para determinação dos níveis de anticorpos IgY anti-levadura e anti-hifa produzidos após sucessivas imunizações, amostras de soro obtidas ao longo do experimento foram analisadas por ELISA indireto (Figura 1).

Figura 1 - Níveis de imunoglobulinas IgY anti-levadura (A) e IgY anti-hifa (B) presentes no soro de galinhas poedeiras inoculadas com o fungo *C. albicans* na forma de levedura e hifa respectivamente. *diferença significativa em relação ao pré imune (0 dias) ($P < 0,05$). OD: densidade óptica a 450 nm.

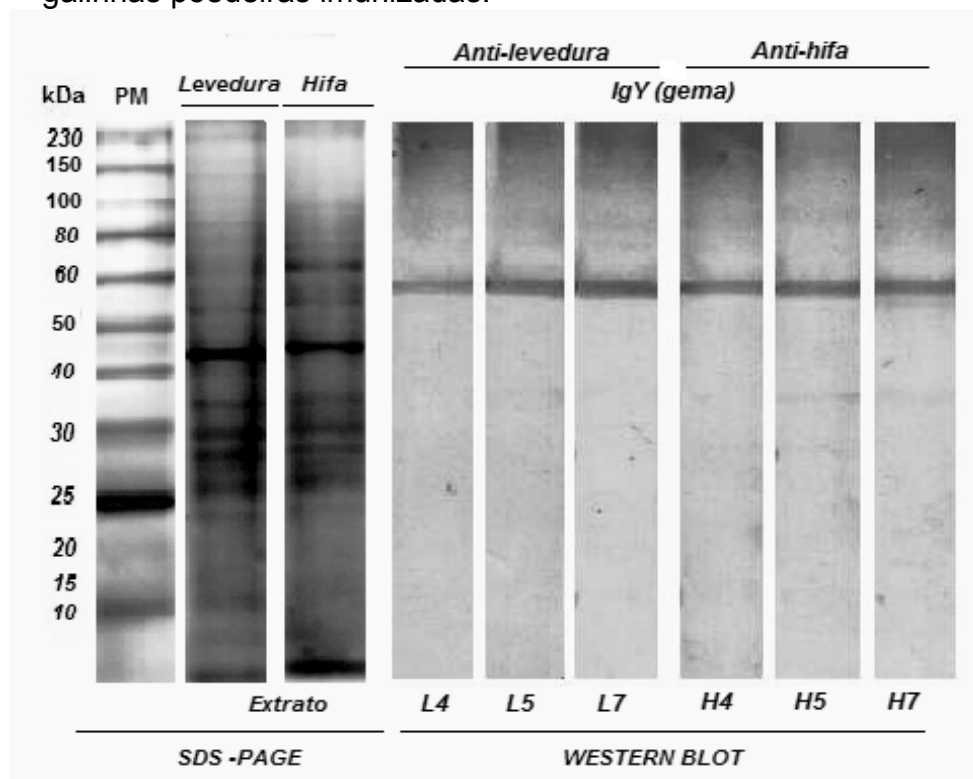


As galinhas inoculadas com antígeno da levedura de *C. albicans* (Fig. 1 A), apresentaram um aumento no nível de atividade desses anticorpos após a primeira imunização, atingindo nível máximo nas imunizações posteriores, permanecendo assim até o final do experimento, mostrando diferença significativa no 158° e 202° dias após a primeira inoculação. Nos anticorpos produzidos pelas galinhas imunizadas com o antígeno de hifa (Fig. 1 B), foi observado um aumento no nível da IgY logo após a primeira inoculação, atingindo nível máximo nas imunizações posteriores, mostrando diferença significativa nos 37° e 112° dias após a primeira inoculação.

Reconhecimento dos antígenos de *C. albicans* analisados por Western blot

Foram realizadas análises por Western blot para determinar quais componentes dos extratos de *C. albicans* na forma de levedura e hifa são reconhecidos pelos anticorpos IgY anti-levedura e IgY anti-hifa obtidos da gema das galinhas imunizadas.

Figura 2 - Perfil eletroforético (SDS-PAGE 10%) dos extratos de *C. albicans* na forma de levedura e hifa e análise por Western blot dos componentes dos extratos reconhecidos por anticorpos IgY presentes na gema dos ovos de galinhas poedeiras imunizadas.

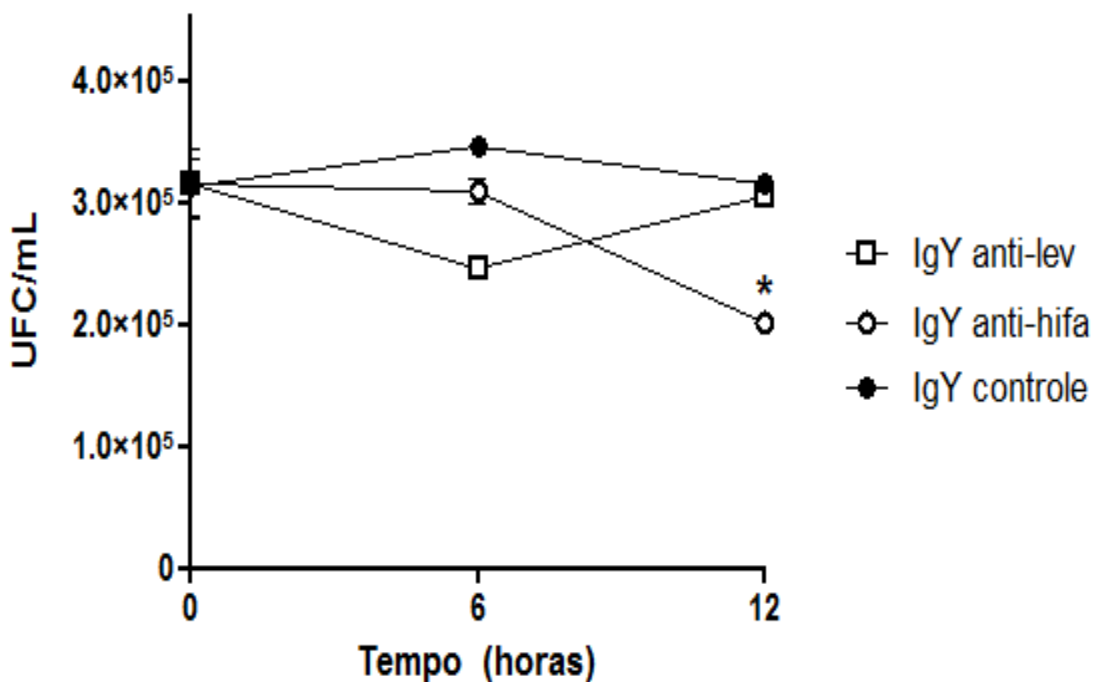


Estes anticorpos reconheceram uma única fração dos antígenos de aproximadamente 60 kDa mesmo após sucessivas imunizações (Figura 2). Em ambos os anticorpos foi observado que não houve diferença no reconhecimento dos componentes antigênicos. Assim também observado no perfil eletroforético dos extratos dos antígenos de hifa e levedura, no qual também não se obteve diferença nos componentes observados.

Avaliação da atividade candidacida dos anticorpos IgY anti-levedura e anti-hifa

Para avaliar a atividade candidacida dos anticorpos específicos contra o fungo *C. albicans*, após diferentes tempos de cultivos (0, 6 e 12 horas), foi realizada uma curva de crescimento em relação ao tempo e UFC (unidade formadora de colônia) (Figura 3).

Figura 3 - Atividade candidacida. Análise da atividade dos anticorpos IgY anti-levedura e anti-hifa comparadas com a IgY controle na concentração de 7,5mg/mL no tempo de 0, 6 e 12 horas. * diferença significativa em relação a IgY controle (12 horas) ($P < 0,05$).

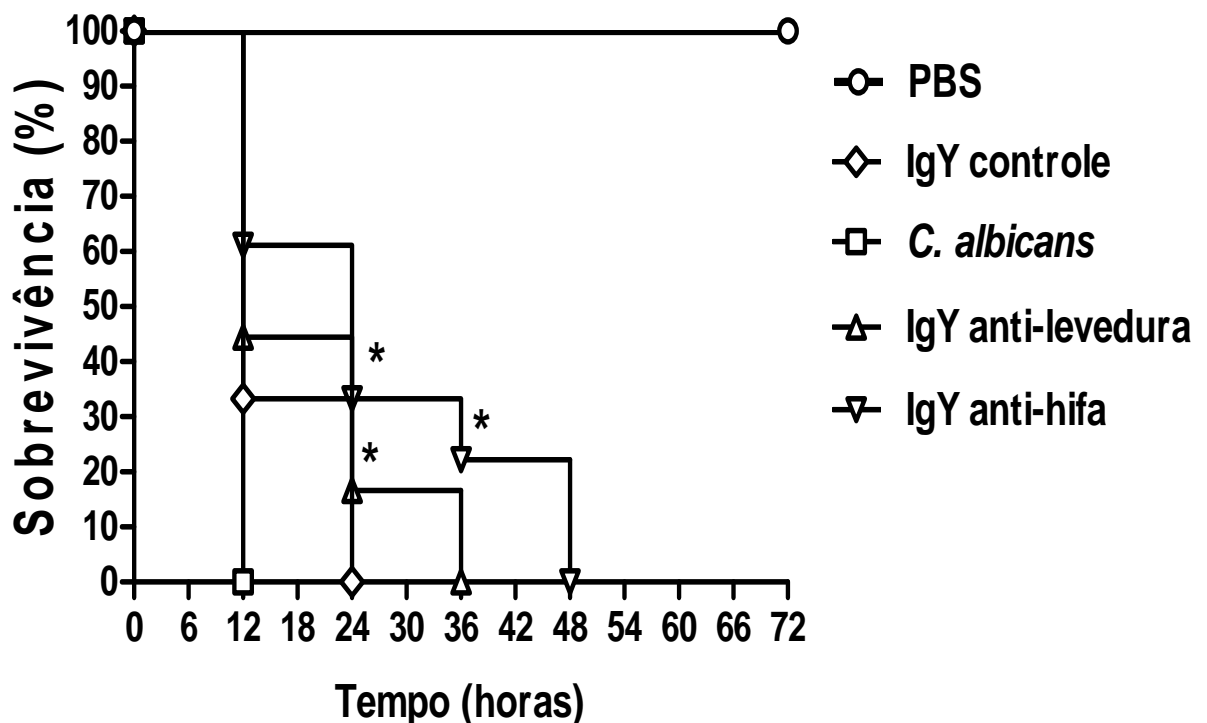


Os anticorpos IgY anti-levedura e IgY controle, não mostraram ação sobre o crescimento do fungo, mantendo-se na concentração do primeiro plaqueamento até o término do experimento (12 horas). A IgY anti-hifa no tempo de 6 horas não inibiu o crescimento do fungo, porém nas 12 horas que seguiram o experimento o anticorpo inibiu significativamente o crescimento do fungo em relação a IgY controle, demonstrando uma atividade candidacida ($P < 0,05\%$).

Ensaio de sobrevivida

Para o ensaio de sobrevivida utilizando o modelo invertebrado de infecção com a larva do besouro *Tenebrio molitor*, foi avaliada a atividade protetora dos anticorpos específicos contra o fungo *C. albicans*.

Figura 4 - Curva de sobrevivida. Os grupos, IgY anti-levedura, anti-hifa e IgY controle foram inoculados com 5×10^5 leveduras juntamente com seus respectivos anticorpos, $n = 18$. O grupo *C. albicans* recebeu somente 5×10^5 leveduras. No grupo controle, as larvas receberam apenas PBS



Os diferentes grupos foram incubados a 37°C e verificados a cada 12 horas. A sobrevivida foi plotada em uma curva de Kaplan-Meier, e o teste de log rank utilizado para comparação de pares de sobrevivência. * diferença significativa em relação ao grupo *C. albicans* ($P < 0,05$).

Um inóculo de 5×10^5 ufc /larvas foi capaz de matar 100 % dos animais em 12 horas de incubação a 37 °C, mostrando-se estatisticamente diferente dos grupos IgY anti-levedura, anti-hifa ($P < 0,05\%$). Com a co-inoculação de 100 µg de anticorpos anti-levedura as larvas mantiveram-se vivas até 36 horas que seguiu o experimento. Com a co-inoculação de 100 µg de anticorpos anti-hifa observou-se a sobrevida das larvas até 48 horas de incubação. Embora não foi observado diferença estatisticamente significativa do grupo IgY controle com IgY anti-hifa, os anticorpos específicos anti-hifa prolongaram a sobrevida das larvas 24 horas a mais do que o grupo controle. Nas larvas do grupo PBS houve 100% de sobrevivência nas 72 horas do experimento, garantindo que as larvas não sofreram nenhum trauma em sua inoculação e se mantiveram saudáveis no decorrer do experimento.

5 DISCUSSÃO

Nas últimas décadas tem sido demonstrado que a imunidade humoral pode proteger o hospedeiro contra infecções fúngicas, caso os anticorpos protetores estiverem disponíveis em quantidades suficientes, desde então a imunização passiva a partir de anticorpos IgY têm sido extensivamente estudados (IBRAHIM et al., 2008; CALDERONE, 2002; MARTÍNEZ, 2008).

No presente estudo, foi realizada a produção de anticorpos policlonais em galinhas poedeiras, específicos contra o fungo *C. albicans*, no qual foram observada um perfil na produção desses anticorpos logo após uma semana da primeira inoculação, com níveis mais altos a partir do 37° dia, mantendo-se constantes após doses de reforços subsequentes.

Resultados semelhantes foram observados nos estudos de Neema et al. (2012), com anticorpos IgY específicos contra *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus*, no qual observaram um aumento da resposta dos anticorpos na segunda semana, aumentando somente na quarta semana de imunização, mantendo-se constante até o final do experimento, independente da inoculação com doses de reforço. E estudos de Zhen et al. (2008) que mostraram a capacidade da IgY em se ligar com antígeno de *Staphylococcus aureus* e de *Escherichia coli*, revelando o padrão de resposta pelas galinhas imunizadas ao longo de 160 dias, em que no período de 50 a 70 dias aproximadamente, mantiveram-se os níveis mais elevados desses anticorpos.

Neste trabalho foi demonstrado que tanto os anticorpos IgY anti-levedura e anti-hifa, reconheceram uma única fração (60 kDa) do antígeno de *C. albicans*, não mostrando diferença no padrão de reconhecimento entre os anticorpos. Uma importante característica de *C. albicans* que está associado com sua patogênese é a sua capacidade de transição de uma forma de levedura a uma forma filamentosa (WELLINGTON et al., 2012).

Ainda não é muito compreendida a maneira no qual a estrutura das mananas distribuídas na parede celular do fungo difere em células de leveduras e hifas, embora se sabe que a parede celular de *C. albicans* em hifas contém menos ligações fosfodiésteres e β -1,2 manooligossacarídeos do que a parede celular das leveduras. As células de hifas contém uma maior quantidade de quitina, em contraste, as β -1,3 glucanas de leveduras e hifas são semelhantes, porém elas

podem estar menos expostas na superfícies das hifas (NETEA et al., 2008). Uma grande variedade de componentes analisados da parede celular de *C. albicans* de ambas as formas (levedura e hifa), isolados de algumas células intactas do fungo, revelaram em sua composição, polipeptídeos de médio à baixo peso molecular (15 – 80 kDa), sendo que as mais proeminentes foram de 24, 27, 30, 40, 66 e 72 kDa (ELORZA; MURGUI; SENTANDREU, 1985; MARTÍNEZ et al., 1998).

Estas observações podem ser importantes para a interação com o sistema imune. Assim, embora os componentes da parede celular de *C. albicans* são semelhantes na morfologia do fungo, o proteoma de superfície do fungo e a quantidade de PAMPs (padrões moleculares associados ao patógenos) que são reconhecidos pelas células do hospedeiro diferem substancialmente. As células de leveduras induzem a produção de IL-12 a partir das células dendríticas, enquanto que as hifas não conseguem induzir citocinas do padrão Th1, e induzem a produção de IL-4 (GOW et al., 2011).

Os mecanismos exatos que os anticorpos protegem o hospedeiro contra a infecção por *Candida spp.* ainda são desconhecidos, algumas explicações prováveis incluem a inibição da adesão, inibição da formação do tubo germinativo, opsonização, neutralização de enzimas e atividade candidacida direta (POLONELLI et al. 2000; MORANGUES, 2003). Como foi observado neste trabalho, tanto os anticorpos IgY anti-levedura e IgY controle não demonstraram uma inibição do fungo, durante as 12 horas que seguiu o experimento, no entanto os anticorpos IgY anti-hifa exerceram uma inibição significativa quando comparado com a IgY anti-levedura e IgY controle, demonstrando sua atividade candidacida.

Wang et al. (2011), obtiveram resultados semelhantes com duas cepas de *S. aureus*, no qual a atividade de seus anticorpos foi semelhante quando comparados com a IgY controle, sugerindo que esse resultado foi ocasionado devido as cepas utilizadas que são menos sensíveis, não desconsiderando o fato de que as galinhas do grupo controle podem ter sido expostas ao micro-organismo durante o experimento. Fujibayashi et al. (2009), investigaram a eficácia *in vitro* de IgY anti-*C. albicans* na prevenção da adesão do fungo e a formação de biofilme, no qual observaram que a IgY anti-*C. albicans* reduziu significativamente a adesão de *C. albicans* às células epiteliais bucais humanas de uma maneira dose-dependente.

Neste estudo utilizamos um modelo invertebrado de infecção, para verificar o efeito *in vivo* de anticorpos IgY específicos, no qual foi observado que os

anticorpos IgY anti-hifa, anti-levedura e IgY controle não mostraram diferença significativa entre si, embora o anticorpo IgY anti-hifa tenha prolongado o tempo de vida das larvas. Outras pesquisas obtiveram resultados satisfatórios realizados com IgY contra *C. albicans*, como os estudos *in vitro* e *in vivo* realizados por Ibrahim et al. (2008), no qual foi observado a redução da capacidade de aderência da *C. albicans* em células FaDu de maneira dose-dependente e que a administração oral de IgY anti-*C. albicans* diminuiu significativamente a disseminação do fungo e a quantidade de lesões na mucosa oral em modelo de camundongos, indicando que este efeito pode ser devido ao bloqueio da ligação de *C. albicans* as células do hospedeiro.

E estudos realizados por Wang et al. (2008), que verificaram a inibição do crescimento de *C. albicans* por anticorpos IgY *in vitro*, no qual os autores relatam que este resultado pode variar dependendo do tipo do antígeno, do animal a ser utilizado, do protocolo de imunização e da coleta dos ovos, e que a inibição é dependente da concentração de proteína do anticorpo, de tal forma que em concentrações baixas dos anticorpos, não houve inibição do crescimento de *C. albicans*. Para os hospedeiros imunodeprimidos, que estão em grande risco de infecções fúngicas graves, este modo de ação, independente da ajuda da imunidade do hospedeiro, se torna extremamente vantajoso.

Nos estudos de Casadevall (1995); Blanco e Garcia (2008), os autores descreveram que diferenças na quantidade, na especificidade, e no isotipo do anticorpo, poderia explicar porque a proteção de anticorpos tem sido observada em alguns estudos e em outros não, e que a identificação de anticorpos policlonais protetores pode ser difícil se anticorpos não protetores também estão presentes, sugerindo assim, que alguns resultados negativos não implicariam necessariamente na ausência de anticorpos protetores.

6 CONCLUSÃO

Os anticorpos produzidos em galinhas estão sendo cada vez mais utilizados por possuir características próprias que os tornam adequadas para utilização na imunoterapia e imunodiagnóstico de doenças. No presente estudo, verificou-se por ELISA, que os anticorpos IgY anti-levedura e anti-hifa mostraram atividades específicas contra o fungo, embora não tenha sido observado o efeito inibitório *in vitro*. Contudo nos estudos *in vivo* os anticorpos IgY anti-hifa prolongaram a sobrevivência das larvas em 24 horas a mais quando comparados com o grupo controle. Estes dados sugerem que os anticorpos IgY produzidos em galinhas poedeiras tem um potencial terapêutico. Portanto mais estudos devem ser realizados.

REFERÊNCIAS

- AKITA, E. M.; NAKAI, S. Immunoglobulin from egg yolk: Isolation and purification. **J Food Sci.** v. 57, p. 626–634, 1992.
- ARVANITIS, M.; GLAVIS-BLOOM, J.; MYLONAKIS, E. Invertebrate models of fungal infection. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1832, p. 1378-1383, 2013.
- BALISH, E. Mucosal and disseminated candidiasis in gnotobiotic SCID mice. **J Med Vet Mycol.** v. 31, p. 143-54, 1993.
- BLANCO, J. L.; GARCIA, M. E. Immune response to fungal infections. **Vet Immunol Immunopathol.** v. 15, p. 47-70, 2008.
- BRUDER-NASCIMENTO, A., et al. Species distribution and susceptibility profile of *Candida* species in a Brazilian public tertiary hospital. **BMC. Res. Notes.** v. 3, p. 3-10, 2010.
- CALDERONE R. A. *Candida* and Candidiasis. ASM Press. Washington, 2002. 472 pages.
- CASADEVALL, A. Antibody immunity and invasive fungal infections. **Infect Immun.** v. 63, p. 4211-4218, 1995.
- CARLANDER, D.; KOLLBERG, H.; LARSSON, A. Retention of specific yolk IgY in the human oral cavity. **Bio Drugs.** v. 16, p. 433-7, 2002.
- CARLANDER D; KOLLBERG H; WEJAKER PE.; LARSSON, A. Peroral immunotherapy with yolk antibodies for the prevention and treatment of enteric infections. **Immunology Res.** v. 21: p.1-6, 2000.
- CHAFFIN, W. L. *Candida albicans* Cell Wall Proteins. **Microbiology and Molecular Biology Reviews.** v. 72, p. 495-544, 2008.
- COLOMBO, A. L., et al. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **J. Clin. Microbiol.** v. 44, p. 2816 - 2823, 2006.
- ELORZA, M. V.; MURGUI, A.; SENTANDREU, R. Dimorphism in *Candida albicans*: contribution of mannoproteins to the architecture of yeast and mycelial cells. **J. Gen. Microbiol.** 131:2209–2216, 1985.
- GOW NA, VAN DE VEERDONK F. L.; BROWN A. J.; NETEA M. G. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. **Nat Rev Microbiol.** v. 12, p. 112-22, 2011.
- HAN, Y.; MORRISON, R. P.; CULTLER, J. E. A vaccine and monoclonal antibodies that enhance mouse resistance to *Candida albicans* vaginal infection. **Infect Immun.** p. 5771-5776, 1998.

- HATTA, H. et al. Productivity and some properties of egg yolk antibody (IgY) against Human Rotavirus compared with Rabbit IgG. **Biosci. Biotech. Biochem.** v. 57, p. 450 – 454, 1993.
- HINRICHSEN, S. L. et al. Candidemia in a tertiary hospital in northeastern Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 41, p. 394-398, 2008.
- HOFFMANN, J. A. Innate immunity of insects. **Current Opinion in Immunology.** v. 7, p. 4-10, 1995.
- IBRAHIM, EL-SM et al. *In vitro* and *in vivo* effectiveness of egg yolk antibody against *Candida albicans* (anti-CA IgY). **Vaccine.** v. 26, p. 2073-2080, 2008.
- JACKSON, J. C.; HIGGINS, L. A.; LIN, X. Conidiation Color Mutants of *Aspergillus fumigatus* Are Highly Pathogenic to the Heterologous Insect Host *Galleria mellonella*. **Ploss One.** v. 4, 2009.
- KAUN, K. R.; DEVINENI, A. V.; HEBERLEIN, U. *Drosophila melanogaster* as a model to study drug addiction. **Hum Genet.** v. 131, p. 959-975, 2012.
- KIM, J.; SUDBERY, P. *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. **The Journal of Microbiology.** v. 49, p. 171-177, 2011.
- KIM, DAE-HEE et al. Internalization of tenecin 3 by a fungal cellular process is essential for its fungicidal effect on *Candida albicans*. **Eur. J. Biochem.** v. 268, p. 4449-4458, 2001.
- KRAMER, J. M. Structures and functions of collagens in *Caenorhabditis elegans*. **Faseb J.** v. 8, p. 329- 336, 1994.
- KOBAYASHI, C. et al. Effect of egg yolk antibody on experimental *Cryptosporidium parvum* infection in scid mice. **Vaccine.** v. 23, p. 232-235, 2004.
- KOVACS-NOLAN, J.; MINE, Y. Egg Yolk Antibodies for Passive Immunity. **Annu. Rev. Food Sci. Technol.** v. 3, p. 163–82, 2012.
- KUMAMOTO, C. A.; VINCES, M. D. Contributions of hyphae and hypha-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence. **Cellular microbiology.** v. 7, p. 1546-1554, 2005.
- LI, A. P. et al. Engineering Fusarium Head Blight Resistance in Wheat by Expression of a Fusion Protein Containing a Fusarium-Specific Antibody and an Antifungal Peptide. **Molecular Plant-Microbe Interactions.** v. 21, p. 1242–1248, 2008.
- LEE, E. N.; SUNWOO, H. H.; MENNINEN, K.; SIM, J. S. *In vitro* studies of chicken egg yolk antibody (IgY) against *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium*. **Poult Sci.** v. 81, p. 632-641, 2002.
- LEE, YOUNG-TAE et al. Structural characteristics of tenecin 3, an insect antifungal protein. **Biochemistry and molecular biology international.** v. 47, p. 369-376, 1999.

- LO, H. J. et al. Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. **Cell**. v.90, p. 939-949, 1997.
- LÓPEZ-RIBOT, J. L.; CASANOVA, M.; MURGUI, A.; MARTÍNEZ, J. P. Antibody response to *Candida albicans* cell wall antigens. **FEMS Immunol Med Microbiol**. v. 1, p. 87-96, 2004.
- MACHADO, P. R. L. et al. Immune response mechanisms to infections. **An. Bras. Dermatol**. v. 79, p. 647-662, 2004.
- MARSH, E. K. e MAY, R. C. *Caenorhabditis elegans*, a model organism for investigating immunity. **Appl Environ Microbiol**. v. 78, p. 2075-2082, 2012.
- MARTÍNEZ, J. P. et al. Serologic Response to Cell Wall Mannoproteins and Proteins of *Candida albicans*. **Clinical Microbiology reviews**. v. 11, p. 121-141, 1998.
- MATHEIS, W, SCHADE, R. Development of an IgY-based rocket-immunoelectrophoresis for identity monitoring of Pertussis vaccines. **J Immunol Methods**. v. 30, p. 125-32, 2011.
- MORRISON, S. L. MOHAMMED, M. S. Sequences in antibody molecules important for receptor-mediated transport into the chicken egg yolk. **Molecular Immunology**. v. 38, p. 619-625, 2001.
- NETEA, G. M., BROWN, G. D., KULLBERG, B. J., GOW, N. A. R. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. **Microbiology**. vol. 6, 2008.
- NAGLIK, J. R., CHALLACOMBE, S. J. E HUBE, B. *Candida albicans* Secreted Aspartyl Proteinases in Virulence and Pathogenesis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 67, p. 400-428, 2003.
- ODDS, F. C. *Candida and Candidiasis* London: Bailliere Tindal. 1988.
- PERLROTH, J., CHOI, B., SPELLBERG, B. Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. **Med Mycol**. v. 45, p. 321-346, 2007.
- POLONELLI, L. et al. The efficacy of acquired humoral and cellular immunity in the prevention and therapy of experimental fungal infections. **Med Mycol**. v. 38, p. 281-92, 2000.
- PURSALL, E. R., ROLFF, J. Immune Responses Accelerate Ageing: Proof-of-Principle in an Insect Model. **Plos One**. v. 6, 2011.
- REGASINI, L. O. et al. Antimicrobial activity of *Pterogyne nitens* Tul., Fabaceae, against opportunistic fungi. **Rev. bras. farmacogn**. v. 20, n. 5, 2010.
- REHANI, S., et al. Spectrophotometric analysis of the expression of secreted aspartyl proteinases from *Candida* in leukoplakia and oral squamous cell carcinoma. **Journal of Oral Science**. v. 53, p. 421-425, 2011.

RICHARDSON, M. D. Changing patterns and trends in systemic fungal infections. **Journal of antimicrobial chemotherapy**. 2005.

SILVA, W. D., TAMBOURGI, D.V. IgY: A promising antibody for use in immunodiagnostic and in immunotherapy. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v.135, p.173-180, 2010.

SEED, K. D., DENNIS J. J. Development of *Galleria mellonella* as an Alternative Infection Model for the Burkholderia cepacia Complex. **Infection and Immunity**. v.76, p. 1267-1275, 2008.

SELVAN, K., SENTILA, R. e MICHAEL, A. Generation and Characterization of Chicken Egg Yolk Antibodies Against *Propionibacterium Acnes* for the Prevention of Acne Vulgaris. **Indian J Dermatol**. v. 1, p. 15-19, 2012.

SHIMIZU, M., NAKAI, S., FITZSIMMONS, R.C. An-*E. coli* immunoglobulin Y isolated from egg yolk of immunized chickens as a potential food ingredient. **J. Food Sci**. v. 5, p. 1360-1366, 1988.

SHOHAM, S., LEVITZ, S. M. The immune response to fungal infections. **British Journal of Haematology**. v. 129, p. 569-82, 2005.

SPILLNER, E., et al. Avian IgY antibodies and their recombinant equivalents in research, diagnostics and therapy. **Biologicals**. v. 40(5), p. 313-322, 2012.

TIZARD, I. *Imunologia veterinária: uma introdução*. 6.ed. São Paulo: Roca. p. 532, 2002.

TOROSANTUCCI, A., et al. Protection by Anti- β -Glucan Antibodies Is Associated with Restricted β -1,3 Glucan Binding Specificity and Inhibition of Fungal Growth and Adherence. **The Plos Journals**. v. 4, 2009.

WHITEWAY, M., OBERHOLZER, U. *Candida* morphogenesis and host pathogen interactions. **Curr Opin Microbiol**. p. 350–357, 2004.

WANG, X. Z. et al. *In vitro* inhibition of oral *Candida albicans* by chicken egg yolk antibody (IgY). **Mycopathologia**. p. 381-387, 2008.

WANG, LIN-HUI, et al. Characterization of chicken egg yolk immunoglobulins (IgYs) specific for the most prevalent capsular serotypes of mastitis-causing *Staphylococcus aureus*. **Veterinary Microbiology**. v. 149, p. 415-421, 2011.

WARR, G. W., et al. IgY: clues to the origins of modern antibodies. **Immunology Today**. v. 16, p. 392–398, 1995.

WELLINGTON M., KOSELYN, K., KRYSAN, D. J. *Candida albicans* Morphogenesis Is Not Required for Macrophage Interleukin 1 β Production. **MBio**. v. 26, p.412-433, 2012.

ZHEN, Y. H., et al. Characterization of specific egg yolk immunoglobulin (IgY) against mastitis-causing *Escherichia coli*. **Vet Microbiol**. v. 130, p. 126-133, 2008.

ZHEN, Y. H., et al. Characterization of specific egg yolk immunoglobulin (IgY) against mastitis-causing *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**. v. 105, p. 1529–1535, 2008.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Artigo para publicação

Este é um trabalho realizado no Laboratório de Imunologia IV da Universidade Estadual de Londrina, fruto de resultados obtidos em parte por um colaborador do nosso laboratório de pesquisa, desta forma não foi incluído no corpo da dissertação. Formado pelo artigo científico: *In vitro* and *in vivo* antifungal activity of IgY antibody against *Candida albicans*.

As formatações do artigo seguem as normas da revista *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* (Anexo 1). No qual fornecem às comunidades científicas e profissionais informações especializadas produzidos por autores em diferentes culturas sobre os mais diversos avanços científicos.

In vitro* and *in vivo* antifungal activity of IgY antibody against *Candida albicans

Sandmary D. Chambó¹; Narciso Junior Vieira¹; Ionice Felipe¹; Gabriel Marcondes Castanheira²; Ricardo Sergio Couto de Almeida²; Emerson Jose Venancio¹.

ABSTRACT

Introduction: This study evaluated the *in vitro* and *in vivo* activity of specific antibodies from egg yolk (IgY) of laying hens against the fungus *Candida albicans* (*C. albicans*).

Materials and Methods: Specific IgY was produced in laying hens by inoculation of *C. albicans* (CR-15). After the partial purification, the activity of specific IgY antibodies was analyzed by indirect ELISA and growth inhibition assay. *In vivo* assessment of anti-*C. albicans* activity of IgY antibodies was performed using two invertebrate models of infection (*Galleria mellonella* and *Tenebrio molitor*).

Results: The antibodies produced from egg yolk of immunized hens are specific against the fungus *C. albicans*. ELISA demonstrated that IgY was specific to the antigen; this was confirmed by western blotting. Additionally, *in vitro* experiments demonstrated that the egg yolk immunoglobulin inhibited the growth of *C. albicans*. Also, *in vivo* results showed that specific IgY against *C. albicans* protected *Galleria mellonella* and *Tenebrio molitor* larvae from *C. albicans* infection.

Conclusion: These results demonstrate that the antibodies produced present *in vitro* and *in vivo* protective activity against *C. albicans* infection, suggesting that specific IgY might be a promising alternative in passive immunity.

Keywords: Chicken egg yolk antibody. *Candida albicans*. *Galleria mellonella*. *Tenebrio molitor*. Immunotherapy.

INTRODUCTION

Candida albicans is the most common human fungal pathogen. It is normally a harmless commensal organism, however if the host microbiota balance is disrupted (for example, during antibiotic therapy over long periods time) or immune system is compromised, *C. albicans* is capable of causing infections. There are two main types of *C. albicans* infection: superficial skin and mucosal infection and invasive infection, in which the fungus can spread throughout the host's bloodstream and infect several organs (Calderone 2002).

¹ Departamento de Ciências Patológicas - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Rod. Celso Garcia Cid, Pr 445, Km 380, Caixa Postal 6001, Londrina, Paraná 86051-970, Brazil

² Departamento de Microbiologia - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná 86051-970, Brazil.

The pathogenicity and virulence of fungi reside in the cell wall, since it is the location of host-fungus interaction and is a rich source of antigens (Martínez et al. 1998; Lopez-Ribot et al. 2004).

C. albicans expresses many virulence factors, such as adhesion to host cells, phenotypic switching, and germ tube formation that contribute to the colonization of the host and culminates in disease development (LOPEZ-RIBOT et al., 2004). During the host-fungus interaction many molecules present in the cell wall of the fungus can activate innate and adaptive immunity.

Patients with neutropenia or cellular immune deficiency often develop fungal infections and may present serious fungal diseases (Machado et al. 2004). Similarly, patients with lymphoma, leukemia, chronic granulomatous disease or that are undergoing chemotherapy present innate immune deficiencies and are more susceptible to disseminated *Candida spp.* infection. Therefore, innate immunity and cell response are an important line of defense against candidiasis (Lopez-Ribot et al. 2004).

Specific antibodies are extremely important for host defense during mucosal or systemic fungi infection (Lopez-Ribot et al. 2004). *In vitro* and *in vivo* study have demonstrated the effectiveness of anti-*C. albicans* antibody (Ibrahim 2008). It was observed that anti-*C. albicans* IgY significantly reduces the adherence capacity of *C. albicans* to FaDu cells (human pharynx carcinoma cells) in a dose-dependent manner and oral administration of the antibody also reduces *C. albicans* dissemination and the number of lesions in the oral mucosa of mice with experimentally induced oral candidiasis. Additionally, *in vitro* studies conducted by Wang et al. (2008) showed growth inhibition of *C. albicans* by IgY antibody.

IgY antibodies present advantageous features in comparison to mammalian IgG in result of the phylogenetic distance between birds and mammals. IgY does not activate the complement system of mammals or exhibit cross-reactivity with their Fc receptors and rheumatoid factor, which reduces false positive results in immune assays. The use of this immunoglobulin is justified by the fact that it is found in high concentrations in egg yolk and can be purified by low cost methods (MATHEIS; SCHADE, 2011).

Antibody production process usually does not cause suffering to animals. Several studies indicate that IgY antibodies produced in laying hens are effective against bacteria, parasites, viruses, and fungi (Wang et al. 2008; Matheis

and Schade 2011; Spillner et al. 2012). In this context, the present study was conducted to investigate the *in vitro* and *in vivo* efficacy of IgY antibody against *C. albicans* (CR15). The anti-CR15 IgY antibody inhibited the growth of the fungus and protected *Galleria mellonella* and *Tenebrio molitor* larvae against *C. albicans* infection by maintaining 100% of the larvae alive. Considering the characteristics presented by anti-CR15 IgY antibody, the use of IgY may be a promising alternative in passive immunotherapy (Carlander et al. 2000).

MATERIALS AND METHODS

Fungal strains, culture conditions, and antigen preparation

C. albicans strain CR15 (Custódio et al. 2011), was cultured in solid YPD medium (1% yeast extract, 1% peptone, 2% dextrose, and 2% agar) at 4°C with subcultures every 15 days.

To prepare the anti- CR15 IgY antibodies, a sample of *C. albicans* maintained on YPD solid was transferred to YPD broth and incubated for 16 h at 37°C under shaking at 160 rpm. Hereafter, the cells were washed in PBS buffer pH 7.4 (PBS) by centrifugation at 2600 g for 5 minutes. The cell pellet was resuspended in PBS containing 0.1% of thimerosal and incubated for 2 h at room temperature under shaking. After incubation yeast cells were washed and resuspended in PBS. The cell concentration of the suspension was estimated using Neubauer chamber. The inoculum was adjusted to 5×10^7 cells/mL. The complete inactivation of yeast by thimerosal was checked by plating the final suspension on solid YPD medium and incubated for two days at 37 °C.

Immunization of hens

Two White Leghorns hens in the posture phase were used for the production of specific IgY antibodies against *C. albicans*. The hens were obtained from the Farm School of Universidade Estadual de Londrina (UEL) and were kept without restriction to food and water. Hens were immunized by intramuscular injection at the pectoral muscle. 400 µL of a suspension of 1×10^7 cells/ml with Freund's incomplete adjuvant was inoculated in each animal. Two reinforcement doses were

inoculated 15 and 45 days after the first immunization. Egg and serum samples were collected before and 7 days after immunization.

The animals were kept under strict ethical conditions, according to animal well-being guidelines. The project was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the Universidade Estadual de Londrina.

Isolation of antibodies from egg yolk

#

Eggs from immunized and non-immunized (control group) hens were collected daily, starting a week after the first inoculation and ending 30 days after the last inoculation. The eggs were stored under refrigeration for up to 30 days and after the egg yolk was separated from the egg white it was stored at -20°C until processing. For IgY extraction an ammonium sulfate precipitation protocol was performed with some modifications to the protocol previously described by Akita & Nagai (1992). The collected yolks, devoid of the protective pellicle, were diluted in six parts of distilled acid water and incubated for 18 h at 4°C. After incubation, the solution was filtered by a Whatmann filter paper number 1 at 4°C. Ammonium sulfate was added to the filtrate until a concentration of 35% was achieved before long solution was homogenized and incubated for 1 hour at room temperature. After the incubation period, the solution was centrifuged for 20 minutes at 1500 g. The precipitate was resuspended in 2 mL of distilled water and dialyzed. The purified IgY was filtered in a sterile Millipore filter of 0.22 microns in order to obtain the sterile-IgY. The IgY concentration was determined by the method described by Bradford (1976) and BSA was used as standard.

Specific activity of IgY against *C. albicans*

#

Indirect enzyme immunoassay (ELISA) was used to determine the levels of anti-*C. albicans* antibodies present in the yolk serum from the eggs of immunized hens. The antigens (5 µg/mL) were diluted in carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6) and 100 µL/well of somatic antigen were added to ELISA plates and incubated overnight at 4°C. After incubation three washes were performed using 150 µL/well of PBS- Tween 20 at 0.05% and 150 µL PBS-5% skim milk solution was added to each well. The plates were incubated for 1 h and washed three times with

PBST, as previously described. Next, 100 μ L of the samples of purified egg yolk IgY diluted in PBS-1% skim milk (1: 5000) were added to each well for incubation during 1 h at room temperature. Samples were washed three times and 100 μ L/well of rabbit anti-IgY immunoglobulin conjugate with peroxidase was added (1: 40000), followed by an incubation of 1 h at room temperature. Substrate solution (10 mL of buffer 0.1 M sodium acetate, 100 μ L H₂O₂ 0,05%, and 100 μ L TMBZ pH 5.0) (150 μ L/well) was added and plates were incubated for 15 minutes at room temperature in the absence of light. The reaction was interrupted by adding 50 μ L/well of 1M sulfuric acid. The reading of absorbance/well was carried out in a spectrophotometer for microplates with a 450 nm filter.

Electrophoresis and Western blot analysis

#

C. albicans antigen (5 μ g) samples were mixed in sample buffer (50 mM Tris, pH 6.8, 1% SDS, 0.025% bromophenol blue, 10% glycerol, and 20 mM DTT) and (SDS-PAGE). The antigens separated by electrophoresis were transferred to nitrocellulose membranes at 30 V overnight at 4°C. Nitrocellulose membranes were incubated for 1 h in PBS-5% skim milk solution in an agitator at room temperature. Next, the membranes were washed two times and then incubated with IgY antibodies (1: 5000) for 1 h at room temperature. After the washes, the membranes were incubated with rabbit anti-IgY (Sigma, St. Louis, USA) immunoglobulin in peroxidase diluted in PBS- 1% skim milk (1: 5000) for 1 h at room temperature in an agitator. After the washes, the membranes were incubated with 16 mL of 1X PBS containing 5 mg of DAB (3,3-4HCl-diaminobenzidine) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), pH 7.2, and 5% H₂O₂. The membranes were washed several times in distilled water to block the reaction. In order to estimate the molecular weight of the antigens a standard molecular mass was used (New England BioLabs Inc.).

Candidacidal activity and Growth inhibition assay

For candidacidal activity evaluation, an inoculum of *C. albicans* in PBS (10⁶ cells/mL) was mixed with 3 different concentrations of anti- *C. albicans* IgY and IgY control (pre-immune) antibodies (2, 0.2, 0.02mg/mL). At 0; 6 and 12 h, aliquots were removed, diluted in PBS, and plated in culture medium YPD for the

determination of CFU (colony forming unit). A growth curve was constructed according to the number of CFU and time.

For the growth inhibition test, an inoculum of *C. albicans* containing YPD (10^6 cells/mL) was mixed with anti- *C. albicans* IgY and IgY control (pre-immune) antibodies (7,5 mg/mL) and the following steps of the protocol was performed as previously described. Three independent assays were performed.

Invertebrate models of infection

Galleria mellonella and *Tenebrio molitor* larvae were used to test the *in vivo* effectiveness of anti-CR15 IgY antibodies. Briefly, 1×10^6 and 5×10^5 of yeast in 10 μ L of PBS were inoculated in *Galleria mellonella* and *Tenebrio molitor* larvae, respectively. Larvae in the experimental group received 10 μ L of PBS containing anti-CR15 IgY antibodies (50 μ g/larvae) and larvae in the infected control group received only PBS. The different groups were incubated at 37°C and insects were checked twice a day. Three independent experiments were performed.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using Graph Pad Prism 4.0 (La Jolla, 5 CA). The results were compared by one-way analysis of variance (one-way ANOVA). Student's *t* test was used to check the differences between the experimental and control group. Differences were considered significant when $P < 0.05$. Survival rates were estimated by the Kaplan–Meier method and statistical analysis was carried out by the log-rank test to test for equality of the survival curves.

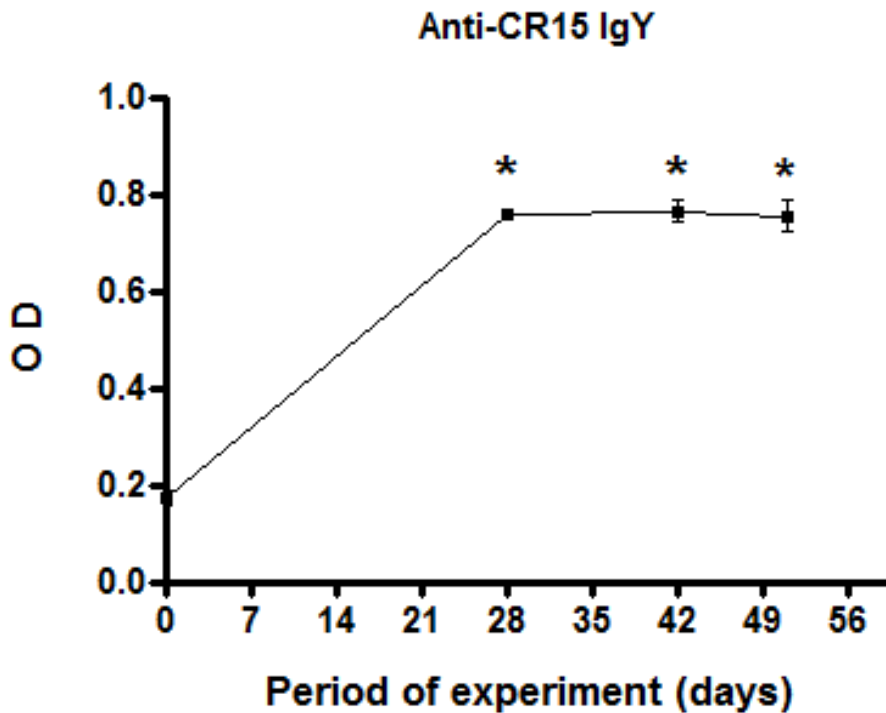
RESULTS

Specific activity of anti-CR15 IgY

In order to determine levels of anti-CR15 antibodies produced after successive immunizations, yolk samples obtained throughout the experiment, were analyzed using indirect ELISA (Figure 1). Elevated levels of these antibodies were

observed on the 30th day after first immunization, remaining constant until the end of the experiment.

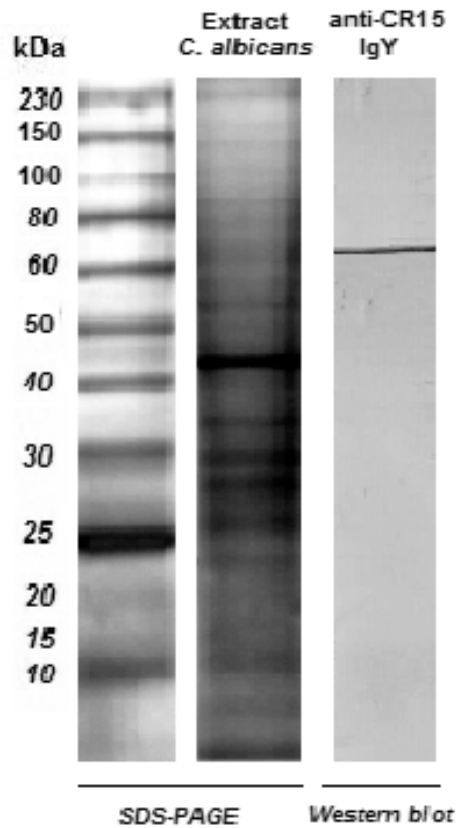
Figure 1 - Indirect ELISA. Levels of IgY antibody obtained from the egg yolk of hens immunized against the antigen of *C. albicans* (strain CR15). * $P < 0.05$ compared to pre-immune antibody.



Characterization of the antigens recognized by anti-CR15 IgY antibodies using Western blot

Western blot analysis was carried out to determine which components of *C. albicans* antigens were recognized by anti-CR15 IgY antibodies obtained from egg yolks of immunized hens.

Figure 2 - Electrophoretic profile (SDS-PAGE 15%) of *C. albicans* and western blot analysis of extract components recognized by IgY antibodies present in the aqueous solution extracted from the egg yolks of immunized laying hens.



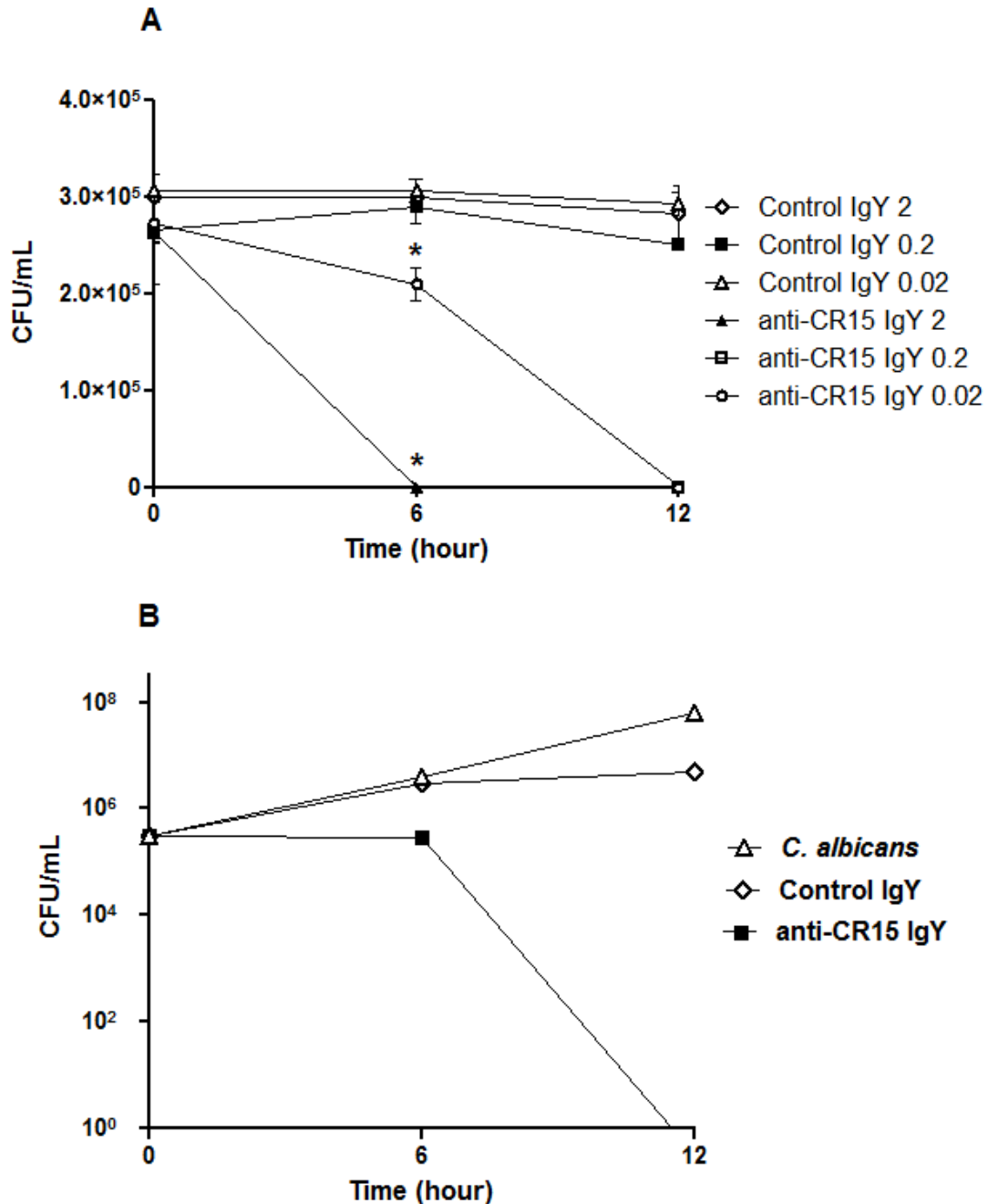
The immunoglobulin present in the egg yolk of immunized hens recognized a single fraction of the antigens of approximately 60 kDa (Fig. 2).

In vitro candidacidal activity and Growth inhibition of *C. albicans*

To evaluate the death of the fungus, *C. albicans* was incubated with the specific antibodies and after 0; 6 and 12 h growth and death curves were constructed.

As shown in figure 3A, the candidacidal activity of the anti-CR15 IgY and control IgY antibodies on *C. albicans* was assessed. Various concentrations of *C. albicans* were incubated in PBS and at 0, 6 e 12 h samples were plated. In figure 3B it can be observed that specific and control IgY antibodies inhibited the growth of *C. albicans* in YPD medium. Samples were processed as previously described.

Figure 3 - Candidacidal activity (A). *C. albicans* co-incubated with anti-CR15 and control IgY antibodies (2, 0.2; 0.02 mg/mL). * $P < 0,05$ compared to IgY control in all concentrations. Growth inhibition of *C. albicans* (B). *C. albicans* co-incubated with anti-CR15 and control IgY antibodies (7,5 mg/mL). * $P < 0.001$ compared to IgY control in all concentrations * $P < 0.0001$.



As shown in Figure 3A, anti-CR15 IgY or control IgY antibodies were incubated with *C. albicans* and plated at 0, 6, and 12 h. The inhibition of growth rate varied according to the concentration of the antibodies (2, 0.2, or 0.02 mg/mL). The

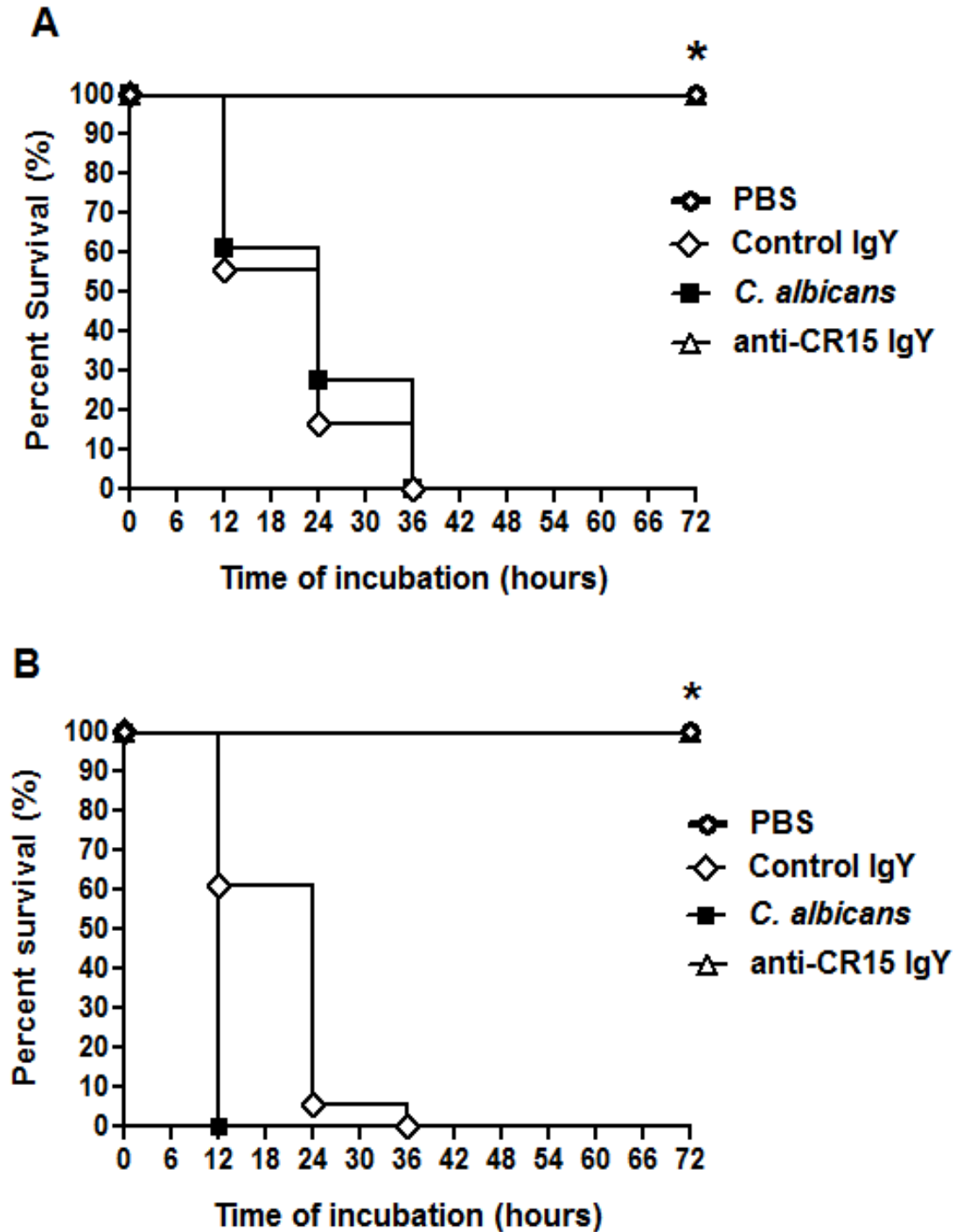
concentration of 2 mg/mL of anti-CR15 IgY antibodies induced the highest inhibiting of growth rate , a drastic decrease in the number of viable cells, and complete inhibition of *C. albicans* in 6 h. The concentration of 0.2 mg/mL of anti-CR15 IgY antibodies also induced significant inhibition in the growth rate of *C. albicans* in 12 h. The concentration of 0.02 mg/mL anti-CR15 IgY antibodies and all concentrations of the control IgY antibodies did not inhibit the growth of *C. albicans* in any of the observed times.

To assess the growth inhibition of *C. albicans* by anti-CR15 IgY antibodies, anti-CR15 IgY or control IgY antibodies, these antibodies were incubated with *C. albicans* in YPD medium and plated at 0, 6, and 12 h (figure 3B). Anti-CR15 IgY antibodies had the greatest ability to inhibit the growth of *C. albicans*, there was significant decrease in the number of viable cells, and complete inhibition growth in 6 h. IgY control antibodies did not inhibit fungus growth. In fact, significant increase in fungus levels was observed after six hours of incubation. When only *C. albicans* was incubated in YPD medium, significant increase in fungus levels was observed at all times of the experiment.

Survival assay (*Galleria mellonella* and *Tenebrio molitor* larvae)

To evaluate the *in vivo* activity of anti-CR15 IgY two invertebrate models of infection were used, *Galleria mellonella* (Fig. 4A) and *Tenebrio molitor* (Fig. 4B).

Figure 4 - Survival curve (*Galleria mellonella*) (A). *Galleria mellonella* larvae were inoculated with 5×10^5 of yeast or PBS and anti-CR15 IgY or control IgY antibodies ($50 \mu\text{g}/\text{larva}$), $n = 18$. Survival curve (*Tenebrio molitor*) B. *Tenebrio molitor* larvae were inoculated with 5×10^5 of yeast or PBS and anti-CR15 IgY or control IgY antibodies ($50 \mu\text{g}/\text{larva}$), $n = 18$. The larvae were incubated at 37°C and were observed every 12 h. Survival was plotted on a Kaplan-Meier curve and log rank test was used to compare pairs of survival. $*P < 0,0001$ anti-CR15 IgY antibody group compared to *C. albicans* and control IgY antibody groups

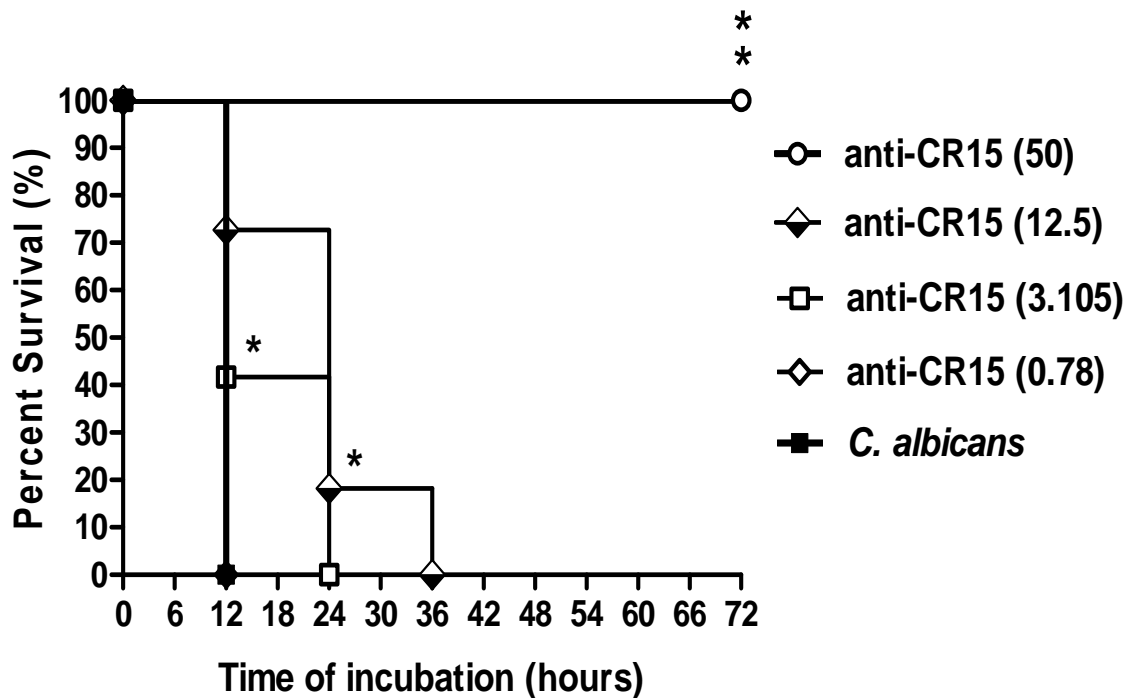


For survival assessment, *Galleria mellonella* and *Tenebrio molitor* larvae were inoculated with *C. albicans*, 10^6 and 5×10^5 of yeast, respectively. *Galleria mellonella* larvae inoculated only with yeast presented 100% mortality within 36 h of incubation at 37°C (figure 4A), while the control group that received only PBS presented 100% of survival, confirming that larvae were healthy and did not die at the time of inoculation. When 50µg/larva of control IgY antibodies were co-inoculated, 100% mortality was observed in 36 h of study. However, when 50 µg/larva of anti-CR15 IgY antibodies were co-inoculated, 100% survival was observed after 72 h of study. The difference in survival between these two groups was significantly different ($P < 0.0001\%$).

Tenebrio molitor larvae inoculated only with yeast presented 100% mortality within the first 12 h of incubation at 37°C (figure 4B), while the control group that received only PBS presented 100% of survival, confirming that larvae were healthy and did not die at the time of inoculation. The group that received pre-immune IgY antibodies presented 100% mortality in 36 h of study, while the group that received anti-CR15 IgY antibodies presented 100% survival. Significant difference in the survival was observed when *C. albicans* group was compared to anti-CR15 IgY, control IgY, and PBS groups ($P < 0.05\%$). Although the survival of the control IgY and anti-CR15 IgY groups were significantly different when compared with *C. albicans* group ($P < 0.005\%$), the anti-CR15 IgY group presented significantly higher survival rate when compared to control IgY group ($P < 0.0001\%$), demonstrating that anti-CR15 IgY antibodies are highly efficient in protecting the larvae.

The survival assay with *Tenebrio molitor* larvae was conducted using various concentrations of the antibody (50 µg, 12.5 µg, 3.105 µg, and 0.78 µg/larva).

Figure 5 - Survival curve (*Tenebrio molitor*). *Tenebrio molitor* larvae were inoculated with 5×10^5 of yeast and anti-CR15 IgY and contrl IgY antibodies (50; 12.5; 3.105; and $0.78 \mu\text{g}/\text{larva}$), $n = 12$. The *C. albicans* group received only 5×10^5 of yeast. In the control group, the larvae received only PBS. These groups were incubated at 37°C and observed every 12 h. * $P < 0.0001$ anti-CR15 IgY antibody groups receiving 12.5 μg and 3.10 $\mu\text{g}/\text{larva}$ of antibodies compared to *C. albicans* group. ** $P < 0.0001$ anti-CR15 IgY antibody group receiving 50 $\mu\text{g}/\text{larva}$ of antibodies compared to *C. albicans* group and anti-CR15 IgY groups receiving 12.5 μg ; 3.105 μg , and $0.78 \mu\text{g}/\text{larva}$.



We conducted a survival assay with *Tenebrio molitor* larvae in various concentrations of the antibody (50 μg , 12.5 μg , 3.105 μg and 0.78 $\mu\text{g}/\text{larva}$) (Figure 5). We observed that antibody protected larvae by a dose-dependent effect, in the concentration of 50 μg shown 100% of survival at 72 hours of infection in 12.5 μg concentration, shown 16.66% at 72 hours and in 3.105 μg concentration at 24 hours of incubation reached 100% of death and at the concentration of 0.78 $\mu\text{g}/\text{larva}$, no difference was observed when compared with *C. albicans* group, with 100% of death within 12 hours of the experiment.

DISCUSSION

C. albicans is the most important human fungal pathogen. When there is an imbalance in the microbiota or if the host immune system is impaired, a wide range of infections can occur (Ibrahim 2008; Calderone 2002 and Martínez 1998). Treatment with antifungal drugs during long periods of time can favor the onset of drug-resistant strains. Therefore, there is an urgent need for developing new preventive strategies and alternative forms of treatment. The use of antibodies in passive immunotherapy has been widely and effectively used against a variety of micro-organisms in the past years (Ibrahim 2008; Wang 2008).

Passive immunization therapies against pathogens have been extensively studied. The present study was conducted to investigate the candidacidal activity of specific IgY against *C. albicans*. The levels of antibodies produced were assessed by ELISA. Antibody levels increased one week after the first inoculation and with subsequent doses. Selvan et al. (2012) showed that high levels of specific IgY antibodies against *Propionibacterium acnes* are produced. Accordingly, Guimarães et al. (2012) observed the production of IgY antibodies against *Staphylococcus aureus*. These studies demonstrate that the production of specific IgY can be efficiently induced in chickens by using simple protocols of immunization and extraction.

In the present study, anti-CR15 IgY effectively inhibited the growth of *C. albicans* and presented candidacidal activity when added to the *C. albicans* culture. Similarly, Guimarães (2009) observed that there was an absence of growth of *S. aureus* when it was incubated with specific IgY. In addition, it has been reported that the monoclonal antibody (MAb C7) directed against *C. albicans* cell wall mannoprotein exhibits potent candidacidal effect and can reduce *C. albicans* growth in 73.4% (Morangues 2003). Studies have demonstrated that IgY antibodies can act directly on microorganisms such as *Cryptosporidium parvum*, *Salmonella enteritidis* e *Salmonella typhimurium* by mechanisms that are still unknown. IgY antibodies specific for Salmonella can bind to the antigens expressed on its surface and result in structural alterations of the bacteria's surface (KOBAYASHI et al. 2004; LEE et al. 2002).

Although the exact mechanisms of how antibodies protect the host against infections by Candida are still unknown, some probable explanations include

the inhibition of fungi adherence, inhibition of the germ tube, opsonization, neutralization of enzymes related to virulence, and direct candidacidal activity (Polonelli et al. 2000; Morangues 2003).

Murine models are the most commonly used models for studying fungal infections, due to the similarity of murine and human immune system. However, the use of invertebrate models to study the virulence of pathogenic organisms that can cause disease in humans, such as *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*, has increased extensively (Jackson et al 2009; Arvanitis et al. 2013).

The use invertebrate host to study microorganism infection has increased, however there is no evidence of antibody administration in this infection models. In this study two invertebrate models of infection (*Galleria mellonella* and *Tenebrio molitor*) were used to test *in vivo* effectiveness of anti-CR15 IgY antibodies. It was demonstrated that these antibodies had a protective effect in larvae; infected larvae treated with 50µg/larva of specific IgY presented 100% of survival. Thus, these insects are an attractive model for studying the pathogenicity of the fungus *C. albicans* compared to commonly used mammalian models, being easy to handle and to obtain fast results.

In a study using mice, it was demonstrated that animals treated with sera from patients with systemic candidiasis and in the recovery phase thirty minutes before the inoculation of *C. albicans* (1×10^8 cells) presented a survival rate of 50%, while mice treated with normal human serum presented a mortality rate of 100% (Mathews et al. 1991). This effect was probably due to the presence of antibodies against heat shock protein 90 (hsp90) in the sera, suggesting that this antibody could confer protection against systemic candidiasis in an animal model. Also, in an experimental model of *C. albicans* vaginitis in rats, Cassone et al. (1995) observed that immunity could be passively transferred by vaginal fluid from immune animals.

Ibrahim et al. (2008) obtained satisfactory results with IgY against *C. albicans* in *in vitro* and *in vivo* studies. IgY antibodies against *C. albicans* reduced the adhesion capacity of *C. albicans* in FaDu cells in a dose-dependent manner and oral administration of the antibodies significantly decreased the dissemination of the fungus and the number of lesions in the oral mucosa of mice.

The *in vitro* and *in vivo* efficacy of *Solobacterium moorei* inhibition by IgY antibodies was demonstrated by Li et al. (2012). In addition, the high specificity of

the antibodies produced was confirmed by the ability of IgY to decrease the levels of bacteria in the oral cavity of mice.

In conclusion, the results of this study indicate that IgY antibodies produced from egg yolk of chickens immunized with a strain of *C. albicans* (CR15) had protective *in vitro* and *in vivo* effects. The invertebrate models used in this study provide an attractive model to investigate the pathogenicity of the fungus *C. albicans*, suggesting that treatment with anti-*C. albicans* IgY may be considered an alternative for immunotherapy.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil).

REFERENCES

- Arvanitis M, Glavis-Bloom J, Mylonakis E (2013): Invertebrate models of fungal infection. . *Biochim.Biophys.Acta*
- Calderone RA (2002): *Candida* and Candidiasis. Press A, editor: ASM Press.
- Carlander D, Kollbergh H, Larsson A (2002): Retention of specific yolk IgY in the human oral cavity. *BioDrugs*.16:433-437
- Carlander D et al (2000): Peroral immunotherapy with yolk antibodies for the prevention and treatment of enteric infections. *Immunology Res*. 21: 1-6
- Cassone A et al (1995): Rats clearing a vaginal infection by *Candida albicans* acquire specific, antibody-mediated resistance to vaginal reinfection. *Infect Immun*. 63: 2619-2624
- Custódio et al (2011): Protective effect of Artin M from extract of *Artocarpus integrifolia* seeds by Th1 and Th17 immune response on the course of infection by *Candida albicans*. *Int Immunopharmacol*. 11(10):1510-5
- Guimarães MC et al (2009): Growth inhibition of *Staphylococcus aureus* by chicken egg yolk antibodies. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 57(5): 377-382
- Ibrahim EL-SM et al (2008): *In vitro* and *in vivo* effectiveness of egg yolk antibody against *Candida albicans* (anti-CA IgY). *Vaccine*. 26: 2073-2080

Jackson JC, Higgins LA, Lin X (2009): Conidiation Color Mutants of *Aspergillus fumigatus* Are Highly Pathogenic to the Heterologous Insect Host *Galleria mellonella*. Ploss One. v. 4

Kovacs-Nolan J, Mine Y (2012): Egg Yolk Antibodies for Passive Immunity. Annu. Rev. Food Sci. Technol. 3: 163–82

Li X et al (2012): Chicken Egg Yolk Antibody (IgY) Controls *Solobacterium moorei* Under *In Vitro* and *In Vivo* Conditions. Appl Biochem Biotechnol. 168: 1448-1458

López-Ribot JL et al (2004): Antibody response to *Candida albicans* cell wall antigens. FEMS Immunol Med Microbiol. 1: 87-96

Martinez JP et al (1998): Serologic Response to Cell Wall Mannoproteins and Proteins of *Candida albicans*. Clinical Microbiology reviews. 11: 121-141

Matheis W, Schade R (2011): Development of an IgY-based rocket-immunoelectrophoresis for identity monitoring of Pertussis vaccines. J Immunol Methods. 30: 125-32

Matthews RC et al (1991): Autoantibody to heat-shock protein 90 can mediate protection against systemic candidosis. Immunology. 74: 20–24

Morangues MD, et al (2003): A Monoclonal Antibody Directed against a *Candida albicans* Cell Wall Mannoprotein Exerts Three Anti-*C. albicans* Activities. Infect. Immun. 71: 5273-5279

Selvan K, Sentila R, Michael A (2012): Generation and Characterization of Chicken Egg Yolk Antibodies Against *Propionibacterium Acnes* for the Prevention of Acne Vulgaris. Indian J Dermatol. 1: 15-19

Spillner E et al (2012): Avian IgY antibodies and their recombinant equivalents in research, diagnostics and therapy. Biologicals. 40: 313-322

Tizard, I. (2002): Imunologia veterinária: uma introdução. 6.ed. São Paulo: Roca. 532

Wang XZ et al (2008): *In vitro* inhibition of oral *Candida albicans* by chicken egg yolk antibody (IgY). Mycopathologia. 381-387

ANEXOS

ANEXO A

Normas da revista *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*

Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis publishes papers containing original results which have not been published elsewhere (both as regular papers or chapters from books, except in the form of an abstract or preliminary note which should be indicated as a footnote in the acknowledgment) and which make a sufficient contribution to immunology or experimental therapy. Therefore, the Editorial Office requests a written statement, supplied by the first author or a head of laboratory, together with the manuscript, indicating the originality of the presented results. Submission of a manuscript implies that the authors agree to transfer the copyright to the Publisher automatically if and when the manuscript is accepted for publication.

Archivum publishes full papers, short communications, reviews and invited editorial reviews. **Full papers**, not exceeding 16 typed pages, should be presented in the form described below. **Short communications** should not exceed 10 typed pages, may not contain section headings and both the text and the number of Figures and Tables should be kept to a minimum. Reference citations should be the same as in full papers. **Reviews** should contain a title page, an abstract, the basic text of up to 20 typed pages, acknowledgment (if any) and references. Only manuscripts written in grammatically correct English will be accepted. The authors should submit to the Editorial Office one printed copy and electronic version (by e-mail), the concisely written double-spaced manuscript in Word format, including Tables, Figures and References. We need separate text file plus table and illustrations files.

Conflict of interest disclosure. AITE requires a declaration from the Authors of articles regarding any competing financial interests in relation to the presented work. Authors are required to include a statement at the end of their article and declare **whether or not** they have any competing financial interests. This includes employment, consultancies, stocks, honoraria, patents, grants and travel grants within three years of beginning the submitted work. In the case of more than one

author, the corresponding Author should provide the required declaration on behalf of all Authors.

Arrangement of the manuscript

1. **Title page:** This should bear (1) the title of the paper (concise, but informative), (2) the name(s) and surname(s) of the author(s), (3) the name(s) of the laboratory where the work was carried out, (4) a list of abbreviations (if any).
2. **Abstract:** Each paper should be preceded by an abstract, which for original papers should contain 200–250 words. The abstract should be intelligible in itself without reading the paper. It should be followed by specific key words (no more than six). The abstract of a review paper should contain 150–200 words.
3. **Introduction:** This should be brief and should state the purpose of the paper in relation to other works in the same field. The introduction should not present an extensive review of literature.
4. **Materials and Methods:** Sufficient information should be provided to permit repetition of the experiments. The methods should be described only if new or significantly modified procedures are used. Otherwise only references to previously described methods should be given.
5. **Results:** These should be presented concisely, possibly in the form of Tables and Figures which should not be described in detail in the text. Each experiment should be illustrated only once, either by a Table or by a Figure.
6. **Discussion:** This should present the interpretation of the results, not their recapitulation. Some results do not need discussion. It may be convenient to combine results and discussion in one section.
7. **Acknowledgment** (if any): These should be placed directly after the discussion and include the dedication (if any), thanks for financial support etc.
8. **References:** The list of references should only include those publications which are mentioned in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be

mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries **should be alphabetized by the last names of the first author of each work**. The references must be arranged as follows:

- for journal article:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999): Future of health insurance. N Engl J Med 965:325-329

- for article by DOI:

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. J Mol Med. Doi:10.1007/s001090000086

- for books:

South J, Blass B (2001) The future of modern genomics. Blackwell, London

- for books chapter:

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) The rise of modern genomics, 3rd edn. Wiley, New York

- for online document:

Doe J (1999) Title of subordinate document. In: The dictionary of substances and their effects. Royal Society of Chemistry. Available via DIALOG. [http://www.rsc.org/dose/title of subordinate document](http://www.rsc.org/dose/title%20of%20subordinate%20document). Accessed 15 Jan 1999

Citation:

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

- Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).
- This result was later contradicted (Backer and Seligman 1996).
- This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1993).

9. **Tables** should be typed on separate pages and numbered with Arabic numerals. They should be self-explanatory, without reference to the text.

10. **Figures** should be numbered with Arabic numerals. Drawings and glossy prints of sharp focus are acceptable. The back of each figure should be labeled in pencil with its number, author's name, the running title of the paper, and the top of the figure indicated. The brief but descriptive legends to figures should be typed in sequence on a separate sheet; they should make the figures comprehensible without reference to the text.

11. The manuscripts should be submitted using Editorial Manager under the link <https://www.editorialmanager.com/aite>