



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JANNETH JOSEFINA ESCOBAR ARCOS

**AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO POR PARACOCCIDIOIDES
BRASILIENSIS (PB-18) E PARACOCCIDIOIDES LUTZII
(LDR-2) NO MODELO DE GALLERIA MELLONELLA**

Londrina
2018

JANNETH JOSEFINA ESCOBAR ARCOS

**AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO POR PARACOCCIDIOIDES
BRASILIENSIS (PB-18) E PARACOCCIDIOIDES LUTZII
(LDR-2) NO MODELO DE GALLERIA MELLONELLA**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eiko Nakagawa Itano
Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Sergio Couto
de Almeida

Londrina
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

ESCOBAR ARCOS, JANNETH .

AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO POR *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb-18) e *Paracoccidioides lutzii* (LDR-2) NO MODELO DE *Galleria mellonella* / JANNETH ESCOBAR ARCOS. - Londrina, 2018.
62 f.

Orientador: Eiko Itano.

Coorientador: Ricardo Sergio Couto de Almeida.

Dissertação (Mestrado Profissional em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2018.

Inclui bibliografia.

1. PARACOCCIDIOIDOMICOSE - Tese. 2. Fatores de Virulência - Tese. 3. MODELO ALTERNATIVO ANIMAL: GALLERIA MELLONELLA - Tese. 4. Resposta Imune Celular - Tese. I. Itano, Eiko . II. Couto de Almeida, Ricardo Sergio . III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. IV. Título.

JANNETH JOSEFINA ESCOBAR ARCOS

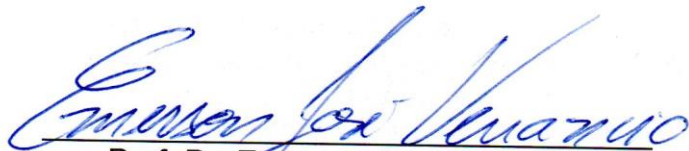
**AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO POR *Paracoccidioides brasiliensis*
(Pb-18) e *Paracoccidioides lutzii* (LDR-2) NO MODELO DE
*Galleria mellonella***

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

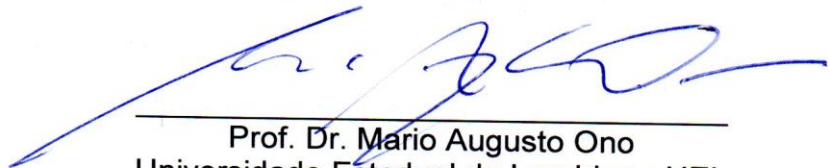
BANCA EXAMINADORA



Orientador: Prof^ª Dr^ª. Eiko Nakagawa Itano
Universidade Estadual de Londrina - UEL



Prof. Dr. Emerson José Venâncio
Universidade Estadual de Londrina - UEL



Prof. Dr. Mario Augusto Ono
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 27 de abril de 2018.

Ao meu anjo da guarda, Luis Felipe, Deus chamou você na plenitude
da vida e quando ainda te precisava,
mas sua partida não significa meu olvido,
a lembrança do teu sorriso viverá eternamente em meu coração,
hoje dedico esta conquista para você meu pai,
meu herói, meu grande amore.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente à Deus pela maravilhosa obra da vida, por me conceder sabedoria, fortaleza e iluminar meu caminho, por não ter me deixado desistir nos meus momentos de fraqueza e instabilidade, Obrigada meu Deus!

Agradeço a minha orientadora, prof^a Dr^a Eiko Nakagawa Itano, por me ter aceitado no seu laboratório de Imunologia Aplicada, pela paciência, amizade, dedicação, ensinamentos e contribuição para meu crescimento científico. Sou grata pela oportunidade e confiança em mim depositada. Manifesto minha admiração, respeito e reconhecimento.

Ao prof. Dr. Ricardo Sergio Couto de Almeida, pela co-orientação, por oferecer um ótimo modelo alternativo animal para o desenvolvimento de minha pesquisa, por suas dicas, pelos ensinamentos, e por ter me acompanhado durante minha defesa de plano e durante as análises estatísticas dos resultados.

Ao programa de Pós-graduação em Microbiologia da UEL e a todos os professores do Departamento de Microbiologia (UEL), pelo muito que contribuíram à minha formação.

Aos professores da banca, por terem aceitado, tão prontamente, o convite para participarem da minha defesa de dissertação.

Agradeço à coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior (CAPES) e PROPPG/UEL pelo auxílio financeiro recebido.

Aos meus colegas do laboratório, Adriane Lenhard Vidal, Franciele Chiyoda Rodini, Bianca Dorana Oliveira, Gabriele Oliveira, Máisa Casoni, Carol Martins, Jean Myamoto pelas palavras de apoio, amizade, companheirismo e incentivo em todos os momentos. À Bianca Dorana Oliveira pela sua infinita ajuda e disponibilidade na obtenção da hemolinfa das larvas, não teria conseguido fazê-lo sozinha, obrigada pela convivência diária, desejo muito sucesso para você.

Ao laboratório de métodos alternativos ao uso de animais (Nip 9), Carla Caloni Custódio, Tatiany Moniqui Nunes e Patricia Canteri Souza pela sua infinita disposição no fornecimento de larvas de *Galleria mellonella* para o desenvolvimento do meu trabalho, pela paciência e por todas as inúmeras dicas e

explicações que me deram para o sucesso de meus experimentos.

Ao meu anjo da guarda, meu pai Luis Felipe, que mesmo de longe sempre compartilhou minhas alegrias e tristezas e hoje eu sei que você fica feliz pela minha conquista. A minha mãe Josefina por acreditar na realização dos meus sonhos e trabalhar muito para que eu pudesse realizá-los, reconheço que sem seu apoio afetivo e investimento econômico e não teria chegado até aqui. Obrigada, amo muito vocês.

Aos meus irmãos Camilo, Omaira e Karen, e minhas sobrinhas Nathalia e Camila, obrigada por serem meu porto seguro, pelas palavras de conforto na distância, pelo carinho e pelo infinito amor que vocês me oferecem.

Ao meu namorado e companheiro, David Santiago, pelo apoio incondicional neste sonho e em minha vida, pelo carinho, amor e proteção, por me ajudar com as aulas de português, muito obrigada!

Aos amigos da Colômbia que moram em Londrina, vocês foram muito especiais, e que me deram força, apoio e continuam torcendo por mim. À Laura Perez, pela amizade, apoio e pelo incentivo para que eu prestasse a seleção do mestrado, foi possível por você...muito obrigada!

As minhas amigas de apartamento, Patrícia Yoshie Shinohara, Monyse Nóbrega, Marcela Nóbrega, Luana Cossentini e Vanessa Almeida pelas conversas, pela convivência diária, pelo carinho, vocês foram muito legais comigo. Abraço e sucesso!

A todos que contribuíram de alguma maneira para a realização desse trabalho. Muito obrigada!

ARCOS, Janneth Josefina Escobar. **Avaliação da infecção por paracoccidioides brasiliensis (pb-18) e paracoccidioides lutzii (ldr-2) no modelo de galleria mellonella**. 2018. 68 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR. 2018.

RESUMO

A Paracoccidioidomicose (PCM) causada pelo fungo dimórfico do gênero *Paracoccidioides*, é uma das micoses sistêmicas mais importantes da América Latina. Por muito tempo, o fungo *Paracoccidioides brasiliensis* foi considerado como único agente causal da PCM, mas recentemente foi introduzida a nova espécie *P. lutzii* também como agente da doença. Vários modelos foram empregados na tentativa de simular a PCM humana, e o mais empregado tem sido o modelo murino. Modelos invertebrados como as larvas de *G. mellonella* foram introduzidas recentemente como uma alternativa para investigar esta infecção. Com o objetivo de avaliar as interações patógeno-hospedeiro na infecção por *P. brasiliensis* e *P. lutzii* no modelo de *G. mellonella*, foram analisadas curvas de sobrevivência, quantificação de melanização, densidade de hemócitos e ensaio de fagocitose. Investigamos a capacidade de leveduras da espécie *P. lutzii* para formar biofilme *in vitro*. O presente trabalho é o primeiro estudo de biofilme *in vivo* de *P. brasiliensis* e *P. lutzii* em infecções experimentais entre células de biofilmes e células planctônicas. As curvas de sobrevivência foram determinadas com três diferentes concentrações (5×10^6 , 2.5×10^6 , 1×10^6 células/larva) de *P. brasiliensis* (Pb18) e *P. lutzii* (LDR2). Para a determinação da densidade de hemócitos na hemolinfa, as larvas foram inoculadas com (5×10^6 células/larva) e a hemolinfa foi recolhida 2, 4 e 8 h após infecção, seguida de contagem de hemócitos totais. Para biofilmes, foi utilizada uma placa de microtutulação de 24 poços com *P. brasiliensis* (Pb18) e *P. lutzii* (LDR2) na concentração de 1×10^8 células/mL durante 7 h, 48, 96 e 144 h e, a biomassa total determinada pela coloração de cristal violeta. Para a quantificação da melanização, a hemolinfa das larvas foi coletada 4 e 12 horas pós-infecção. Para o ensaio de fagocitose *in vitro*, os hemócitos e as leveduras foram coradas com MayGrünwald-Giemsa após 1 h de incubação a 37 ° C com 5% de CO₂. A análise da curva de sobrevivência mostrou que, para *P. brasiliensis* e *P. lutzii*, 2 a 3 dias foram o tempo necessário para atingir 50% de morte (TD_{50%}), e diferentes níveis de virulência de ambas espécies foram encontrados neste modelo ($p < 0,05$). A morte das larvas foi dependente do número de células/larva injetadas. A quantificação da melanização indicou diferenças significativas entre as larvas inoculadas com *P. brasiliensis* (Pb-18) e *P. lutzii* (LDR2) após 4 e 12 h pós-infecção, e o acúmulo de melanina na hemolinfa aumentou ao longo do tempo. A densidade de hemócitos diminuiu após 2 horas de infecção e esta diminuição permaneceu quase inalterada após 4 e 8 h de infecção em relação ao grupo controle, porém sem diferença significativa entre os dois fungos. O ensaio de fagocitose *in vitro* mostrou que as células granulares e os plasmatócitos foram capazes de fagocitar estas células de levedura. As infecções experimentais entre células planctônicas e biofilmes demonstraram que as células do biofilme de ambas espécies de fungos induziram a morte de 100% das larvas no período de observação. Nossos dados confirmam diferentes níveis de virulência de ambas espécies com base nas curvas de sobrevivência e na quantificação da melanização. As leveduras das duas espécies foram fagocitadas pelas células

granulares e os plasmatócitos *in vitro*. Demostramos a capacidade de leveduras do gênero *P. lutzii* para formar biofilme *in vitro*. As infecções experimentais em larvas de *G. mellonella* com células de biofilme mostraram-se mais virulentas do que as células planctônicas. Estudos adicionais são necessários para determinar o papel desses biofilmes *in vivo* envolvidos na morte prematura das larvas.

Palavras-chave: Hemócitos. Virulência. Resposta imune. Biofilme. Paracoccidiodomicose. Fagocitose. *G. mellonella*. *P. brasiliensis*. *P. lutzii*

ARCOS, Janneth Josefina Escobar. **Evaluation of the infection by paracoccidioides brasiliensis (pb-18) and paracoccidioides lutzii (ldr-2) in the model of galleria mellonella.** 2018. 68p. Dissertation (Master's degree in Microbiology) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR. 2018.

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis (PCM) caused by the dimorphic fungus of the genus *Paracoccidioides*, is one of the most important systemic mycoses in Latin America. For a long time, the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* was known as the agent of PCM, but recently the new species *P. lutzii* was also introduced as agent of the disease. Several models were employed in the attempt to simulate human PCM, and the most used model has been the murine model. Invertebrate models such as *G. mellonella* larvae were recently introduced as an alternative to investigate this infection. With the aim of evaluated host-pathogen interactions in *P. brasiliensis* and *P. lutzii* infection in *G. mellonella* model, was assessed by survival curves, melanization quantification, hemocytes density, and phagocytosis assay. We investigated the ability of *P. lutzii* yeasts to form biofilm *in vitro*. The current paper is the first study of *Paracoccidioides* spp. biofilms *in vivo* experimental infections between biofilms and planktonic cells. The survival curves were determined with three different concentrations (5×10^6 , 2.5×10^6 , 1×10^6 yeast cells/larva) of *P. brasiliensis* (Pb18) and *P. lutzii* (LDR2). For the determination of the hemocyte density in the hemolymph, the larvae were inoculated with (5×10^6 cells/larvae) and the haemolymph collected 2, 4 and 8 h after infection, followed by counts of total hemocytes. For biofilms, a 24-well polystyrene microtiter plate was used with *P. brasiliensis* (Pb18) and *P. lutzii* (LDR2) at the concentration of 1×10^8 yeast cells/mL for 7 h, 48, 96 and 144 h and, the total biomass determined by the crystal violet staining. For melanization quantification the haemolymph of larvae was collected at 4 and 12 h post-infection. For *in vitro* phagocytosis assay the hemocytes and yeast cells were stained with MayGrünwald-Giemsa after 1 h of incubation at 37°C with 5% CO₂. An analysis of the survival curve showed that, for *P. brasiliensis* and *P. lutzii*, 2 to 3 days were the time necessary to reach 50% killing (TD_{50%}), and different virulence levels of both species were found in this model ($p < 0.05$). The killing of the larvae depended on the number of cells/larva injected. The quantification of melanization indicated significant differences between larvae inoculated with *P. brasiliensis* (Pb-18) and *P. lutzii* (LDR2) after 4 and 12 h post-infection, and the accumulation of melanin in the haemolymph has increased over time. The hemocytes density decreased after 2 hours of infection and this decrease was remained almost unchanged after 4 and 8 h of infection in relation to the control group, however with no significant difference between the two fungi. The *in vitro* phagocytosis assay showed that granular cells and plasmatocytes were able to phagocytize this yeast cells. The experimental infections between biofilms and planktonic cells, demonstrated that biofilm cells induced the 100% larvae death within the observation period for both strains. Our data confirm different virulence levels of both species based on the survival curves and the melanization quantification. The yeast cells of both species were phagocytosed by granular cells and plasmatocytes *in vitro*. We demonstrated the ability of *P. lutzii* yeasts to form biofilm *in vitro*. The experimental infections in *G. mellonella* larvae with biofilm cells showed more virulent than

planktonic cells. Additional studies are needed to determine the role of these biofilms *in vivo* involved in the premature death of the larvae.

Keywords: Hemocytes. Virulence. Immune response. Biofilm. Paracoccidioidomycosis. Phagocytosis. *G. mellonella*. *P. brasiliensis*. *P. lutzii*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – *Paracoccidioides* spp. (Pb 18 e LDR2) cultivado in vitro à 35°C18

Artigo científico

Figure 1 – Survival curves of *G. mellonella* infected with *P. brasiliensis* (Pb-18) and *P. lutzii* (LDR2)56

Figure 2 - Hemocyte density in *G. mellonella* larvae infected with *P. brasiliensis* (Pb-18) and *P. lutzii* (LDR2) were assessed at different times (2, 4 and 8 hours).....57

Figure 3 - Melanization of *G. mellonella* larvae infected with *P. brasiliensis* (Pb-18) and with *P. lutzii* (LDR2) after 4 h post infection. Optical Density (O.D) of the haemolymph of *G. mellonella* infected with 5×10^6 cells/larva of *P. brasiliensis* (Pb-18) and *P. lutzii* (LDR2) after 4 and 12 h at 35°C58

Figure 4 - Analysis of the phagocytic assay. Photomicrograph of infected hemocytes after 1-h incubation, and Phagocytosis percentage of *P. brasiliensis* (Pb-18) and *P. lutzii* (LDR2) after 1 h of incubation at 37°C59

Figure 5 - Kinetics of biofilm formation by *P. brasiliensis* (Pb-18) e *P. lutzii* (LDR2) on polystyrene microtiter plates60

Figure 6 - Comparison of virulence from planktonic and biofilm cells of *P. brasiliensis* (Pb-18) and *P. lutzii* (LDR2) in the *G. mellonella* model61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus célsius
µL	Microlitros
mL	Mililitros
kDa	Quilodaltons
BC	Biofilm cells
CFU	Unidades formadoras de colônias
CO ₂	Dióxido de carbono
ECM	Matriz extracelular especializada
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GCPSR	Método de concordância genealógica de reconhecimento de espécies filogenéticas (Genealogical concordance phylogenetic species recognition)
GmCP8	Proteína catiônica 8 de <i>G. mellonella</i>
gp43	Glicoproteína de 43 kDa
gp70	Glicoproteína de 70 kDa
IPS	Solução salina fisiológica de inseto
LPS	Lipopolissacarídeos
PbHAD32	Hidrolase de 32 kDa
PbMLS	Malate sintase de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
PC	Planktonic cells
PBS	Tampão salino fostato (phosphate buffered saline)
PCM	Paracoccidioidomicose
PPO	Cascata de profenoloxidase
PRRs	Receptores de reconhecimento padrão
GNBPs	Proteína de reconhecimento de bactérias Gram-negativas
GRPs	Proteína de reconhecimento de peptidoglicano
PS2	Espécie filogenética 2 do <i>P. brasiliensis</i> (Phylogenetic Species 2)
PS3	Espécie filogenética 3 do <i>P. brasiliensis</i> (Phylogenetic Species 3)
PS4	Espécie filogenética 4 do <i>P. brasiliensis</i> (Phylogenetic Species 4)
O.D	Optical density
S1	Espécie 1 do <i>P. brasiliensis</i> (Species 1)
TPI	Triose-fosfato isomerase de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	PARACOCCIDIOIDOMICOSE	17
2.1.1	Evolução Taxonômica de <i>Paracoccidioide</i> spp.	19
2.1.2	Ecologia de Paracoccidioides spp.	21
2.1.3	Fatores de Virulência.....	22
2.1.4	Formas Clínicas.....	24
2.1.5	Implicações clínicas e diagnósticas causadas por diferentes espécies do gênero Paracoccidioides	26
2.2	MODELO ALTERNATIVO ANIMAL: GALLERIA MELLONELLA	27
2.2.1	Resposta Imune Celular	29
2.2.1.1	Fagocitose	29
2.2.1.2	Formação de nódulos.....	30
2.2.1.3	Encapsulamento.....	30
2.2.2	Resposta Imune Humoral	31
2.2.2.1	Melanização	31
2.2.2.2	Coagulação da hemolinfa.....	31
2.2.2.3	Síntese de peptídeos antimicrobianos.....	32
3	OBJETIVOS	33
3.1	GERAL	33
3.2	ESPECÍFICOS.....	33
4	REFERÊNCIA	
	BIBLIOGRÁFICA	34
5	ARTIGOCIENTÍFICO	40
	CONCLUSÕES	68

1 INTRODUÇÃO

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica causada por fungos do gênero *Paracoccidioides* (FRANCO, 1987; TEIXEIRA et al., 2009). A doença está geograficamente restrita às áreas subtropicais da América Latina (do sul do México até o norte da Argentina) com uma alta prevalência no Brasil, Colômbia e Venezuela. Os casos importados diagnosticados na América do Norte, Europa e Ásia representam pacientes que viviam anteriormente em áreas reconhecidamente endêmicas para PCM (BRUMMER; CASTANEDA; RESTREPO, 1993; RESTREPO; GÓMEZ; TOBÓN, 2012; SAN-BLAS; NIÑO-VEGA; ITURRIAGA, 2002).

Com os avanços das técnicas moleculares, o gênero *Paracoccidioides* foi classificado no filo Ascomycota, ordem Onygenales, família Onygenaceae stricto sensu que engloba o grupo monofilético Ajellomyces, que inclui os gêneros anamorfos *Blastomyces*, *Emmonsia*, *Histoplasma* e *Paracoccidioides* (BAGAGLI et al., 2008; UNTEREINER et al., 2004). *Paracoccidioides* spp. apresenta duas formas: a forma micelial, encontrada na natureza a uma temperatura de 25°C; e a forma leveduriforme encontrada em culturas e nos tecidos do hospedeiro a 37°C (LACAZ et al., 2002).

Quando os propágulos infecciosos (fragmentos de hifas ou conídios) são inalados, são depositados nos pulmões e se diferenciam para forma de levedura devido à temperatura de 37°C do hospedeiro (SAN-BLAS; NIÑO-VEGA; ITURRIAGA, 2002). A PCM pode comprometer qualquer órgão, aparelho ou sistema, sendo os locais anatômicos mais afetados os pulmões, mucosa oral, órgãos linfóides, pele, laringe, intestino, baço, sistema nervoso central, ossos e articulações (BELLISSIMO-RODRIGUES et al., 2013; BRUMMER; CASTANEDA; RESTREPO, 1993). Baseada na história natural, a PCM é classificada como PCM infecção e PCM doença. A PCM doença está subdividida em forma aguda/subaguda juvenil; sendo responsável por 3 a 5% dos casos da doença, predominando em crianças e adolescentes, mas podendo eventualmente, acometer indivíduos até os 35 anos de idade, e forma crônica na qual se reportam a maioria dos casos de 74% a 96%, o que tipicamente se manifesta em adultos entre 30 e 60 anos de idade (proporção entre homens e mulheres: 22:1); e a forma residual que são manifestações clínicas

das alterações anatômicas e funcionais observadas após o tratamento com PCM (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

A PCM representou a oitava causa de mortalidade por doença crônica, entre as infecciosas e parasitárias, e a mais elevada taxa de mortalidade 1,45/milhão de habitantes entre as micoses sistêmicas no Brasil, no período de 1980-1995 (COUTINHO et al., 2002). Sendo assim considerado um importante problema de saúde pública, embora não seja uma doença de notificação obrigatória, e não existam dados precisos sobre sua incidência. A espécie *Paracoccidioides brasiliensis* foi considerado como o único agente causal da PCM, mas uma nova espécie foi identificada dentro do gênero *Paracoccidioides* e foi denominada; *Paracoccidioides lutzii* (Pb01- like). Essa espécie é endêmica para a região Centro-Oeste do Brasil, mais especificamente, para os estados de Mato Grosso e Goiás (TEIXEIRA et al., 2009, 2013), mostrando assim a necessidade de conhecer a interação patógeno-hospedeiro que finalmente leva ao desenvolvimento da infecção.

Consequentemente, modelos murinos foram utilizados para estudar as interações fungo-hospedeiro de *P. brasiliensis* e *P. lutzii*, demonstrando uma diferença nos seus padrões de virulência (MOLINARI-MADLUM; FELIPE; SOARES, 1999), diferenças na morfologia, resposta imune induzida e patologia (SIQUEIRA et al., 2016). Estes resultados abriram perspectivas para novos estudos clínicos, incluindo mais isolados deste gênero que podem resultar em consequências significativas para as manifestações clínicas, diagnóstico e tratamento desta doença.

Os hospedeiros não mamíferos têm sido usados para estudar as interações fungo-hospedeiro, e *Galleria mellonella* proporciona mais vantagens em comparação com outros hospedeiros invertebrados que justificam seu uso como modelo de infecção: as larvas podem ser mantidas sob várias condições de temperatura variando de 25°C a 37°C, múltiplas opções para inoculação do patógeno, e o estudo da patogênese fúngica produz resultados comparáveis àqueles obtidos em camundongos (BORGHI et al., 2014; BRENNAN et al., 2002; FUCHS; MYLONAKIS, 2006). Quando comparados com hospedeiros mamíferos, as larvas de *G. mellonella* apresentam baixo custo, fácil reprodução em grande escala, manutenção relativamente simples em laboratório, representa uma redução significativa no tempo de obtenção de resultados e sem as restrições legais ou éticas (KAVANAGH; FALLON, 2010; MYLONAKIS, 2008).

Em contraste com os mamíferos, *G. mellonella* possui um complexo

sistema imune inato dividido em respostas de defesa celular e humoral (HOFFMANN, 1995; LAVINE; STRAND, 2002). A primeira resposta é baseada em células sanguíneas ou hemócitos, que estão envolvidos na fagocitose, nodulação e encapsulação (HILLYER, 2016; KAVANAGH; REEVES, 2004; LAVINE; STRAND, 2002). Nos processos de resposta humoral, três reações imediatas são desencadeadas: melanização, coagulação da hemolinfa e síntese de peptídeos antimicrobianos (LAVINE; STRAND, 2002; VILMOS; KURUCZ, 1998).

A forma larval do inseto *Galleria mellonella* foi empregada para estudar fungos patogênicos como *Aspergillus fumigatus* (REEVES et al., 2004), *Aspergillus terreus* (MAURER et al., 2015), *Candida* spp. (BRENNAN et al., 2002), *Cryptococcus neoformans* (MYLONAKIS et al., 2005), *Fusarium* spp. (COLEMAN et al., 2011) *P. lutzii* e *Histoplasma capsulatum* (THOMAZ et al., 2013), e *Paracoccidioides* spp. (SCORZONI et al., 2015), substituindo o uso de mamíferos; para analisar mecanismos de virulência e resposta imune aos patógenos humanos.

No presente trabalho, usamos larvas de *G. mellonella* como um modelo *in vivo* para estudar as interações patógeno-hospedeiro na infecção por *P. brasiliensis* e *P. lutzii*, investigamos a capacidade de formação de biofilme por *P. brasiliensis* como já descrito, e por leveduras de *P. lutzii* ainda não relatado. A formação de biofilme foi avaliada como fator de virulência em infecções experimentais entre células planctônicas e biofilme. Além disso, a resposta imune deste modelo foi avaliada pela curva de sobrevivência, densidade de hemócitos, quantificação de melanização e ensaio de fagocitose.

2 REVISÃO DE LITERATURA

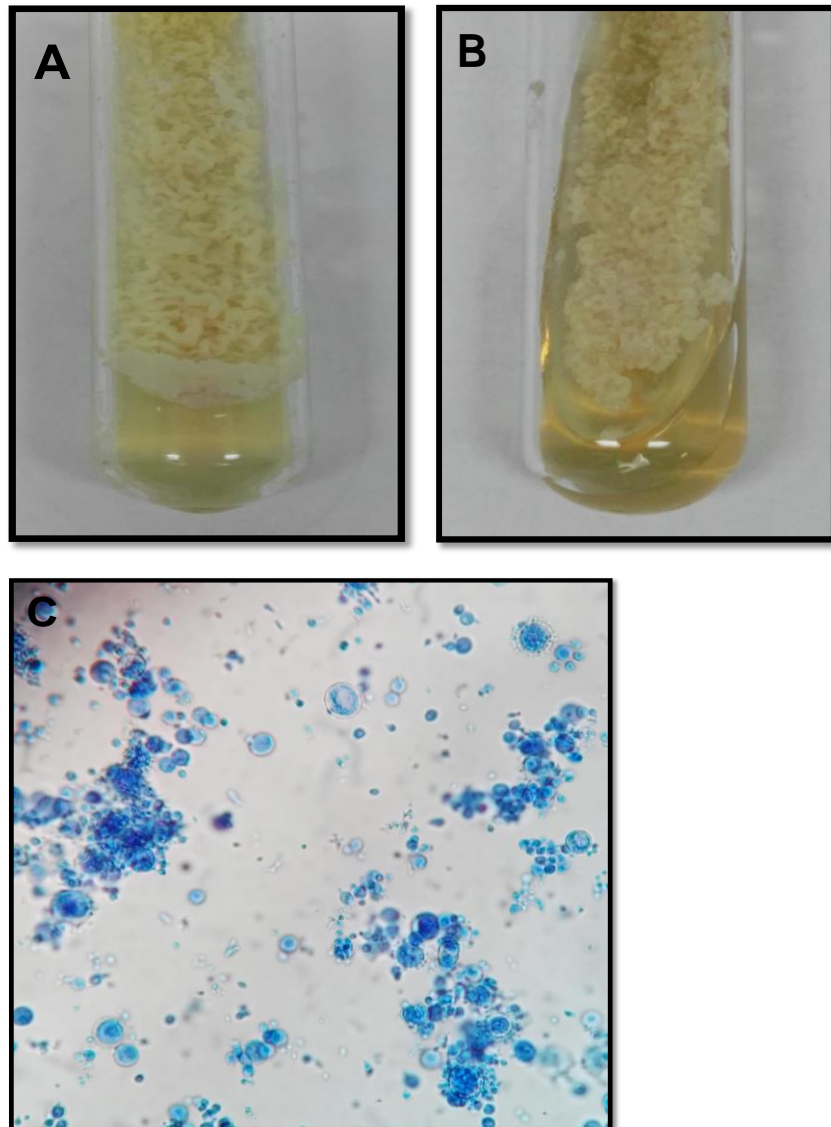
2.1 PARACOCCIDIOIDOMICOSE

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica causada por fungos do gênero *Paracoccidioides* (FRANCO, 1987; TEIXEIRA et al., 2009). A doença está geograficamente restrita às áreas subtropicais da América Latina (do sul do México até o norte da Argentina) com uma alta prevalência no Brasil, Colômbia e Venezuela. Os casos importados diagnosticados na América do Norte, Europa e Ásia representam pacientes que viviam anteriormente em áreas reconhecidamente endêmicas para PCM (BRUMMER; CASTANEDA; RESTREPO, 1993; RESTREPO; GÓMEZ; TOBÓN, 2012; SAN-BLAS; NIÑO-VEGA; ITURRIAGA, 2002)

Paracoccidioides spp. é considerado fungo dimórfico porque apresenta duas formas: a forma micelial ou filamentosa, encontrada na natureza a uma temperatura de 25°C; e a forma de levedura encontrada em culturas e nos tecidos do hospedeiro a 37°C. Quando cultivado em meio ágar Sabouraud, apresenta crescimento lento (20 a 30 dias a 20 a 26°C), produzindo colônias brancas aderentes ao meio e ao exame microscópico, encontram-se filamentos micelianos finos, septados com esporos terminais ou intercalados. Quando cultivado a 37°C, apresenta colônias chamadas cerebriformes ou leveduriformes, de cor creme e o crescimento torna-se aparente após 10 a 15 dias de incubação, e ao exame microscópico apresenta células arredondadas, de dupla parede bem refringente, com ou sem múltiplos brotamentos (LACAZ et al., 2002), como visualizado na figura 1.

O habitat natural dos fungos *Paracoccidioides* spp. provavelmente seja solo das diversas áreas úmidas tropicais e subtropicais das regiões endêmicas da América Latina (BRUMMER; CASTANEDA; RESTREPO, 1993). O principal fator de risco para a aquisição de PCM infecção é uma profissão ou atividade relacionada ao manejo do solo, tais como agricultura, terraplanagem, preparação do solo, jardinagem e transporte de produtos vegetais (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006, 2017). Embora, na infância, a frequência de casos de PCM seja uniformemente distribuída entre os dois sexos, com uma ligeira predominância em jovens adultos do sexo masculino. Na idade adulta, a proporção varia entre vinte e dois homens para

uma mulher. A PCM pode comprometer qualquer órgão, aparelho ou sistema, os locais anatômicos mais afetados são os pulmões, mucosa oral, órgãos linfóides, pele, laringe, intestino, baço, sistema nervoso central, ossos e articulações (BELLISSIMO-RODRIGUES et al., 2013; BRUMMER; CASTANEDA; RESTREPO, 1993).



Fonte: o próprio autor

Figura 1 – *Paracoccidioides* spp. cultivados in vitro a 35°C. (A) *P. brasiliensis* (Pb-18) e (B) *P. lutzii* (LDR2). (C) Células leveduriformes com multibrotamentos (LDR2), coradas com azul-algodão, vistas ao microscópio ótico (40x).

Coutinho et al., 2002 analisaram 3.181 óbitos por PCM no Brasil com

base em 16 anos de dados sequenciais (1980-1995), e detectaram que a PCM representou a oitava causa de mortalidade por doença crônica, entre as infecciosas e parasitárias, e a mais elevada taxa de mortalidade entre as micoses sistêmicas, no período. A taxa de mortalidade média anual foi de 1,45/milhão de habitantes, predominando em indivíduos do sexo masculino, com 84,75% dos óbitos e razão de masculinidade de 562 homens/100 mulheres. O grupo etário entre 30-59 anos foi o mais atingido, seguido dos indivíduos com 60 anos ou mais; o estudo mostrou que a taxa de mortalidade justifica a classificação da doença como um importante problema de saúde no Brasil.

2.1.1 Evolução Taxonômica de *Paracoccidioide* spp.

Com os avanços das técnicas moleculares, o gênero *Paracoccidioides* foi classificado no filo Ascomycota, ordem Onygenales, família Onygenaceae stricto sensu que engloba o grupo monofilético *Ajellomyces*, que inclui os gêneros anamorfos *Blastomyces*, *Emmonsia*, *Histoplasma* e *Paracoccidioides* (BAGAGLI et al., 2008; UNTEREINER et al., 2004).

Com base na análise filogenética de 65 isolados de *P. brasiliensis*, Matute et al., (2006) revelaram a existência de pelo menos três espécies filogenéticas: S1 (espécie 1, composta por 38 isolados do Brasil, Argentina, Paraguai, Peru e Venezuela); PS2 (espécie filogenéticas 2, composta de seis isolados, cinco deles do Brasil e um da Venezuela); e PS3 (espécie filogenéticas 3 contendo 21 isolados Colombianos. Os autores consideraram que o processo de especiação da PS3 restrito geograficamente à Colômbia, pode ser atribuído à dispersão ou a algum outro evento levando ao isolamento genético da S1, que tem uma ampla gama de habitats nas áreas endêmicas. Adicionalmente *P. brasiliensis* PS4 foi recentemente identificado e é composto por uma população monofilética de isolados clínicos da Venezuela (SALGADO-SALAZAR et al., 2010; THEODORO et al., 2012).

As genealogias de múltiplos genes sugeriram que isolados "Pb01" (CARRERO et al., 2008) e "IFM 54648" (TAKAYAMA et al., 2010) se separaram de quaisquer grupos filogenéticos de *P. brasiliensis*, provavelmente representando um novo clado no complexo de espécies de *Paracoccidioides*. Neste contexto Carrero et al., (2008) propuseram uma nova espécie com base em dados genômicos,

filogenéticos, análise de recombinação e características morfológicas de 21 isolados de *P. brasiliensis* (catorze dos quais foram previamente identificados como pertencentes a S1 ou PS3), mostrando um isolado atípico, Pb01, que foi altamente divergente de todos os outros e claramente distante das três espécies filogenéticas já descritas.

Usando o método de concordância genealógica de reconhecimento de espécies filogenéticas ou *Genealogical concordance phylogenetic species recognition* (GCPSR) identificou-se uma nova espécie dentro de *P. brasiliensis*, composta por isolados atípicos "Pb01-like", que foram altamente divergentes das três espécies identificadas anteriormente (S1, PS2 e PS3) (TEIXEIRA et al., 2009). Os autores sugeriram que as novas espécies filogenéticas que compõem os isolados "Pb01-like" fossem denominadas *Paracoccidioides lutzii*, como homenagem ao micologista médico brasileiro, Adolpho Lutz. Além disso a análise morfológica de um membro escolhido de cada um dos grupos filogenéticos do gênero *Paracoccidioides* revelou características exclusivas do isolado representativo do grupo "Pb01-like" em relação aos representantes do grupo S1/PS2/PS3, corroborando os dados filogenéticos e ainda motivando a postulação de uma linhagem evolutiva não descrita anteriormente. Os dados obtidos sugeriram que o grupo "Pb01-like" é endêmico para a região Centro-Oeste do Brasil, mais especificamente, para os estados de Mato Grosso e Goiás, e um caso detectado em Guayaquil, no Equador provavelmente seja resultado da migração humana (TEIXEIRA et al., 2009, 2013). No entanto, uma ocorrência foi relatada em Londrina, Paraná (TAKAYAMA et al., 2010).

Recentemente Turissini et al., (2017) descreveram que os cinco grupos genéticos de *Paracoccidioides* (*P. lutzii* e as quatro espécies no complexo de *P. brasiliensis*) são de fato espécies bem separadas baseados em estudos de taxonomia molecular e morfologia da levedura. Seus resultados indicam que quatro dessas espécies filogenéticas devem ser reconhecidas taxonomicamente como três novas espécies de *Paracoccidioides*; propondo assim de forma convencional, adotar os nomes *P. americana* para PS2, *P. restrepiensis* para PS3 e *P. venezuelensis* para PS4, além de restringir o uso de *P. brasiliensis* para S1.

2.1.2 Ecologia de *Paracoccidioides* spp.

Os organismos Onygenales (Ascomycota) tipicamente evoluíram por adaptação em dois nichos ecológicos distintos, o primeiro representado por condições de saprofíticas no solo e o segundo pelos tecidos vivos de animais hospedeiros (TEIXEIRA et al., 2013). O habitat natural de *Paracoccidioides* e fungos relacionados provavelmente consiste em solo das diversas áreas úmidas tropicais e subtropicais das regiões endêmicas da América Latina (BRUMMER; CASTANEDA; RESTREPO, 1993). Esta evidência vem de isolamentos esporádicos do fungo de amostras de solo (DE ALBORNOZ, 1971; SHOME; BATISTA, 1963; SILVA-VERGARA et al., 1998).

No entanto, o nicho ecológico de *Paracoccidioides* é encontrado em associação com animais de sangue quente, onde o fungo foi repetidamente isolado no tatu de nove-bandas *Dasyurus novemcinctus* e *Cabassous centralis* em áreas endêmicas de PCM (BAGAGLI et al., 1998; CORREDOR et al., 1999) e em cães (DE FARIAS et al., 2011; HEADLEY et al., 2017; RICCI et al., 2004) e preguiça real (TREJO-CHÁVEZ et al., 2011).

Bagagli et al., (2008) apresentaram o ciclo biológico hipotético de *P. brasiliensis*, mencionando que durante sua fase saprofítica filamentosa, os fungos estão sob a influência de diferentes condições, como mudanças freqüentes na temperatura, umidade e, além disso, experimentam competição com outros microorganismos; durante a fase patogênica de levedura, esses fungos devem se adaptar a um habitat diferente, onde podem invadir diferentes órgãos, sistemas ou tecidos do corpo, de acordo com a tolerância do fungo para várias condições, como aumento de temperatura, influências hormonais e resposta ao sistema imunológico do hospedeiro.

Quando os propágulos infecciosos são inalados, são depositados nos pulmões e se diferenciam para forma de levedura devido à temperatura de 37°C do hospedeiro, estabelecendo assim a infecção (SAN-BLAS; NIÑO-VEGA; ITURRIAGA, 2002). As atividades relacionadas ao manejo do solo, tais como agricultura, terraplanagem, preparação do solo, jardinagem e transporte de produtos vegetais, entre outros constituem o grande fator de risco para aquisição da infecção (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006, 2017).

2.1.3 Fatores de Virulência

Os fungos patogênicos que causam micoses sistêmicas conservam vários fatores que permitem seu crescimento em condições adversas proporcionadas pelo hospedeiro, levando ao estabelecimento da relação parasitária e contribuindo para o desenvolvimento da doença. Esses fatores são conhecidos como fatores de virulência que favorecem o processo de infecção e a patogênese das micoses (KUROKAWA; SUGIZAKI; PERAÇOLI, 1998).

A transição dimórfica de *Paracoccidioides spp.* promove mudanças na composição da parede celular, essa característica está relacionada à síntese de glucana, o complexo de polissacarídeos inclui α -1,3-glucana, presente nas células leveduriformes, que decresce drasticamente quando o fungo estabelece forma miceliana, a qual apresenta predominantemente β -glucana (KANETSUNA et al., 1972; KANETSUNA; CARBONELL, 1970). Estudos realizados em isolados deste fungo patogênico sugeriram que a α -1,3-glucana apresenta um papel importante na patogenicidade, uma vez que protege o fungo contra enzimas digestivas dos leucócitos e macrófagos hospedeiros (SAN-BLAS et al., 1977).

A glicoproteína de 43 kDa (gp43) de *P. brasiliensis*, secretada exocelularmente, é um antígeno imunodominante durante a infecção (PUCCIA et al., 1986). Apresenta atividade inibitória da fagocitose, mediando um mecanismo de evasão do fungo, facilitando assim o estabelecimento da infecção no hospedeiro suscetível (POPI; LOPES; MARIANO, 2002). Na parede celular a gp43 é parcialmente responsável pela adesão da levedura aos componentes da matriz extracelular (ECM), ajudando a mediar a interação célula-célula em alvéolos pulmonares pela ligação à laminina e fibronectina (TORRES et al., 2013; VICENTINI et al., 1994).

A glicoproteína de 70 kDa (gp70) também é um dos principais antígenos expressos pelo fungo *P. brasiliensis*, sendo reconhecido por 96% dos pacientes com PCM (CAMARGO; UNTERKIRCHER; TRAVASSOS, 1989). Esta glicoproteína apresenta atividade imunossupressora *in vitro*, com capacidade de inibir resposta linfoproliferativa e de inibir a função de macrófagos (fagocitose e produção de NO e H₂O₂) (BENARD et al., 1997; DE MATTOS GROSSO et al., 2003).

Em adição alguns estudos no gênero *Paracoccidioides* foram

conduzidos para caracterizar o processo de adesão, revelando que *Paracoccidioides* spp. sintetiza várias moléculas, conhecidas como adesinas superficiais, que estão envolvidas, direta ou indiretamente, na interação com células hospedeiras e na formação de biofilmes *in vitro* (HERNANDEZ et al., 2010; MENDES-GIANNINI et al., 2000; SARDI et al., 2015).

A hidrolase de 32 kDa (PbHAD32) foi encontrada em *Paracoccidioides* spp. em extratos de proteína da parede celular na forma micelial e de levedura; e tem capacidade de se ligar às proteínas da matriz extracelular especializada (ECM), incluindo laminina, fibronectina e fibrinogênio e está envolvida na aderência inicial dos conídios às células epiteliais pulmonares. Um aumento da hidrolase de 32 kDa é observado durante a transição da forma micelial para levedura (GONZALEZ et al., 2005; HERNANDEZ et al., 2010; HERNÁNDEZ et al., 2012).

Triose-fosfato isomerase (TPI) é uma enzima glicolítica descrita como uma proteína que é capaz de reagir com o soro de pacientes com PCM (DE OLIVEIRA et al., 2015). A proteína, é predominantemente expressa na fase de levedura, localiza-se na parede celular e no compartimento citoplasmático sendo capaz de interagir com proteínas da ECM do hospedeiro, estudos feitos indicaram TPI e seu respectivo anticorpo policlonal (anti-TPI) produzido contra esta proteína inibiram a adesão de *P. brasiliensis* com células epiteliais cultivadas *in vitro* (PEREIRA et al., 2007) .

Barbosa et al., (2006) indicaram que a proteína GAPDH (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase) associada à parede celular em *P. brasiliensis* poderia estar envolvida na mediação da ligação de células fúngicas à fibronectina, colágeno tipo I e laminina, contribuindo assim para a adesão do microorganismo aos tecidos hospedeiros e ao disseminação da infecção. Tanto o tratamento de pneumócitos com GAPDH como a incubação de células de levedura deste fungo com o anticorpo policlonal anti-GAPDH promoveram a inibição da adesão e internalização de *P. brasiliensis* às células cultivadas *in vitro*.

Da Silva Neto et al., (2009) indicaram que a malate sintase (PbMLS) de *P. brasiliensis* está localizada na parede celular e poderia estar mediando a ligação das células fúngicas à ECM do hospedeiro, contribuindo assim para a adesão dos fungos aos tecidos do hospedeiro e para a disseminação da infecção, comportando-se como uma adesina. A redução da adesão de *P. brasiliensis* às células epiteliais foi evidenciada por um anticorpo específico (anti-PbML) sugerindo

que o PbMLS poderia contribuir para a interação fúngica ativa e a progressão da doença em seres humanos.

Outro fato importante é que *P. brasiliensis* é capaz de formar biofilme *in vitro* sob condições hipóxicas, e sua presença está associada com um aumento na expressão de adesinas e enzimas, o que pode favorecer a infecção disseminada do fungo e que finalmente conferir resistência antimicrobiana e evasão das defesas do hospedeiro (SARDI et al., 2015). Biofilme é uma comunidade estruturada complexa de microrganismos embebidos em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares aderentes a uma superfície inerte ou viva, essa matriz extracelular providencia proteção contra mecanismos de defesa do hospedeiro e antifúngicos (COSTERTON, 1999; HURLOW et al., 2015). A formação de biofilme é um processo de diferentes estágios que começa com a adesão microbiana com subsequente produção e acúmulo de uma matriz extracelular, composta por uma ou mais substâncias poliméricas como proteínas, polissacarídeos, substâncias húmicas e DNA extracelular (FLEMMING; WINGENDER, 2010).

2.1.4 Formas Clínicas

Diversas classificações das formas clínicas da PCM foram publicadas desde a descrição da doença com base em diferentes critérios tais como topografia das lesões, gravidade da doença, resultados de reações sorológicas e história natural, entre outros. Com o objetivo de propor uma classificação de formas clínicas e gravidade da doença, o "Consenso Brasileiro para abordagem clínica de PCM" (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017) adotou a classificação apresentada no "International Colloquium on Paracoccidioidomycosis" realizado em fevereiro de 1986 em Medellín, Colômbia (FRANCO et al., 1987), onde se estabeleceu a relação entre aspectos clínicos e história natural da doença, sendo classificada como:

PCM infecção: A infecção por PCM é contraída quando um indivíduo saudável entra em contato com a forma infectante de *Paracoccidioides* spp., ao longo deste período, não pode haver sinais ou sintomas aparentes, a sensibilização do hospedeiro pode ocorrer com o desenvolvimento de uma resposta imune-específica e positividade no teste intradérmico com paracoccidioidina.

Paracoccidioidomicose doença, subdividida em:

Forma aguda/subaguda (tipo juvenil): Esta forma clínica caracteriza-se por evolução mais rápida (semanas a meses) e por envolvimento marcado do sistema retículo endotelial (baço, fígado, linfonodos e medula óssea). Em ordem de frequência, se destaca a presença de linfadenomegalia, manifestações digestivas, hepatoesplenomegalia, envolvimento ósteo-articular e lesões cutâneas como as principais formas de apresentação desta forma da micose. Esta forma de apresentação clínica é responsável por 3 a 5% dos casos da doença, predominando em crianças e adolescentes, mas podendo eventualmente, acometer indivíduos até os 35 anos de idade.

Forma crônica (tipo adulto): A maioria (74% a 96%) dos casos de PCM são de forma crônica, o que tipicamente se manifesta em adultos entre 30 e 60 anos de idade (proporção entre homens e mulheres: 22:1). A doença progride lentamente e pode levar meses ou mesmo anos para se tornar plenamente estabelecida. As manifestações pulmonares estão presentes em 90% dos pacientes. Os sintomas respiratórios não são específicos e incluem tosse, expectoração e falta de ar; perda de peso, febre e anorexia (BRUMMER; CASTANEDA; RESTREPO, 1993). A PCM crônica pode ser classificada como leve, moderada ou grave. Os casos graves são definidos por três ou mais dos seguintes critérios: a) perda de peso superior a 10% do peso corporal normal; b) envolvimento pulmonar intenso; c) envolvimento de outros órgãos, como glândulas supra-renais, sistema nervoso central e ossos; d) a presença de linfonodos afetados em múltiplas cadeias em forma superficial ou profunda; e) títulos elevados de anticorpos.

Forma residual ou sequela: As formas residuais, também referidas como sequelas, são manifestações clínicas das alterações anatômicas e funcionais observadas após o tratamento com PCM. As sequelas são observadas em múltiplos órgãos, mas têm uma maior taxa de incidência nos pulmões, pele, laringe, traqueia, glândulas suprarenais, mucosa do trato digestivo, sistema nervoso central e sistema linfático, explicando a diversidade da apresentação clínica (TOBÓN et al., 2003; VALLE et al., 1995). A fibrose pulmonar foi descrita em 50% dos casos de doença crônica, seguida de doença pulmonar obstrutiva crônica e suas complicações, cerca de 3% dos pacientes apresentam doença de Addison necessitando reposição hormonal e o sistema nervoso central é comprometido em cerca de 6 a 25% dos casos de PCM (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

2.1.5 Implicações clínicas e diagnósticas causadas por diferentes espécies do gênero *Paracoccidioides*

Todas as espécies do gênero *Paracoccidioides* detectadas até agora são agentes causais da PCM. O conhecimento adquirido nos últimos anos sobre a especiação e evolução de *Paracoccidioides* teve uma grande influência no diagnóstico, manifestações clínicas e tratamento da doença que afeta severamente à população rural na América Latina (TEIXEIRA et al., 2013).

A primeira variação regional relacionada entre as patologias de PCM foi relatada por Barbosa; Daher e Oliveira (1968) que observaram a presença freqüente de formas linfático-abdominais de PCM em pacientes do estado de Goiás. Existe a possibilidade de que estas formas menos comuns da doença estejam associadas à patologia causada por *P. lutzii* e não por *P. brasiliensis*; esta possibilidade não deve ser descartada e deve ser investigada para verificar possíveis associações de espécies de *Paracoccidioides* spp. e diferentes manifestações clínicas de PCM (TEIXEIRA et al., 2013, 2014).

Molinari-Madlum; Felipe; Soares, (1999) estudaram a capacidade de quinze isolados de *Paracoccidioides* spp. para invadir tecidos em um modelo experimental utilizando camundongos sensíveis B10, onde observou-se que isolados atípicos Pb01 e 7455 (atualmente classificado como *P. lutzii*) causaram peritonites intensa progressiva seguida de uma rápida disseminação do baço, fígado, linfonodos e mesentério intestinal, as mesmas características não foram produzidas por isolados de *P. brasiliensis*.

Siqueira et al., (2016) investigaram interações fungo-hospedeiro provocadas pelas cepas Pb01 e Pb18 como principais representantes de *P. lutzii* e *P. brasiliensis*, respectivamente, foram avaliadas as diferenças na morfologia das células de levedura, através de microscopia eletrônica de transmissão e de varredura, mostrando que Pb18 exibe células filhas significativamente maiores sem variação significativa no tamanho e forma das células mãe quando comparadas com Pb01. Em relação com a patologia; a reação inflamatória no tecido pulmonar em resposta à infecção por *P. lutzii* não mostrou formação de granuloma, como observado em camundongos BALB/c infectados com *P. brasiliensis*, a contagem de CFU nos pulmões de camundongos infectados com *P. lutzii* e *P. brasiliensis* apresentou os mesmos níveis durante os primeiros cinco dias após a infecção, no

entanto, após 10, 15 30 e 60 dias de infecção por *P. brasiliensis*, o crescimento do fungo foi sustentado, enquanto os animais infectados com *P. lutzii* mostraram uma gradual eliminação de fungos no local da infecção.

Além da manifestação clínica, também surgiram questões em relação ao tratamento Hahn et al., (2003) observaram que os pacientes cujos isolados foram de *P. lutzii* tiveram uma melhor resposta à terapia com fármaco de trimetoprim-sulfametoxazol do que aqueles pacientes cujos isolados foram de *P. brasiliensis* (S1).

Apesar da percepção comum de variabilidade significativa nos isolados de *P. brasiliensis*, por muito tempo esse patógeno foi considerado uma única entidade, principalmente por causa de seus aspectos microscópicos característicos, tanto sob condições parasitárias como da cultura. Mais estudos que incluem um maior número de isolados das duas espécies ainda são necessários para a identificação das características morfológicas, moleculares, fisiológicas, clínicas e ecológicas associadas aos genótipos específicos de espécies de *P. brasiliensis* (BAGAGLI et al., 2008).

2.2 MODELO ALTERNATIVO ANIMAL: *GALLERIA MELLONELLA*

Os modelos murinos foram utilizados para estudar as interações fungo-hospedeiro de *P. brasiliensis* e *P. lutzii*, demonstrando uma diferença nos seus padrões de virulência (MOLINARI-MADLUM; FELIPE; SOARES, 1999), diferenças na morfologia, resposta imune induzida e patologia (SIQUEIRA et al., 2016). Estes resultados abriram perspectivas para novos estudos clínicos, incluindo mais isolados deste gênero que podem resultar em consequências significativas para as manifestações clínicas, diagnóstico e tratamento desta doença.

Para fornecer boas alternativas para o estudo de fungos patogênicos a comunidade científica internacional colaborou no desenvolvimento e validação de métodos alternativos, “mini hospedeiros” como amebas (*Acanthamoeba castellanii* e *Dictyostelium discoideum*) (STEENBERGEN et al., 2003; STEENBERGEN; SHUMAN; CASADEVALL, 2001), nematóides (*Caenorhabditis elegans*) (MYLONAKIS et al., 2002), e insetos (*Drosophila melanogaster* e *Galleria mellonella*) (LIONAKIS, 2011). Os hospedeiros não mamíferos têm sido usados para estudar as interações fungo-hospedeiro, e *Galleria mellonella* proporciona mais vantagens em

comparação com outros hospedeiros invertebrados que justificam seu uso como modelo de infecção: as larvas podem ser mantidas sob várias condições de temperatura variando de 25°C a 37°C, múltiplas opções para inoculação do patógeno, e o estudo da patogênese fúngica produz resultados comparáveis àqueles obtidos em camundongos (BORGHI et al., 2014; BRENNAN et al., 2002; FUCHS; MYLONAKIS, 2006). Quando comparados com hospedeiros mamíferos, as larvas de *G. mellonella* apresentam baixo custo, fácil reprodução em grande escala, manutenção relativamente simples em laboratório, representa uma redução significativa no tempo de obtenção de resultados e sem as restrições legais ou éticas (KAVANAGH; FALLON, 2010; MYLONAKIS, 2008).

G. mellonella pertence à ordem Lepidoptera e à família Pyralidae, vive na maioria dos casos em colméias, dentro de ninhos de abelhas e se alimenta com cera e pólen. Seu ciclo de vida é de aproximadamente 7-8 semanas: após a eclosão do ovo, as larvas passam por 6 estádios larvais antes do último instar. Isso leva aproximadamente 5-6 semanas a 25-28°C. Em seguida, pre-pupa e pupa são formadas e, após 2 semanas adicionais, aparecem mariposas adultas. (KAVANAGH; FALLON, 2010; WOJDA, 2016).

A forma de larva do inseto *G. mellonella* foi empregada para estudar fungos patogênicos como *Aspergillus fumigatus* (REEVES et al., 2004), *Aspergillus terreus* (MAURER et al., 2015), *Candida* spp. (BRENNAN et al., 2002), *Cryptococcus neoformans* (MYLONAKIS et al., 2005), *Fusarium* spp. (COLEMAN et al., 2011) *Paracoccidioides lutzii* e *Histoplasma capsulatum* (THOMAZ et al., 2013), e *P. brasiliensis* e *P. lutzii* (SCORZONI et al., 2015).

Em contraste com os mamíferos, os insetos possuem um sistema imune inato, dividido em respostas de defesa celular e humoral (HOFFMANN, 1995; LAVINE; STRAND, 2002). A primeira resposta é baseada em células de sangue de insetos; hemócitos que podem englobar partículas estranhas no processo de fagocitose ou capturá-los em estruturas multicelulares denominadas nódulos ou cápsulas. A resposta humoral envolve a síntese e moléculas de defesa, que incluem peptídeos antimicrobianos, cascatas que regulam a coagulação e a melanização da hemolinfa e a produção de intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio (LAVINE; STRAND, 2002).

A primeira linha de defesa em insetos contra a maioria de patógenos é a cutícula que apresenta uma função análoga à pele em mamíferos porque

constitui uma barreira mecânica eficaz contra a invasão microbiana (VILMOS; KURUCZ, 1998). A cavidade do corpo do inseto ou também chamado hemocelo contém hemolinfa, que apresenta uma função análoga ao sangue em mamíferos, na medida em que transporta nutrientes, produtos de resíduos e moléculas de sinal (MATHA; MRACEK, 1984), embora não desempenhe nenhum papel na respiração. A hemolinfa é o principal local da resposta imune contra microorganismos. A resposta imune inata consiste em mecanismos celulares e humorais bem interligados (KAVANAGH; REEVES, 2004).

2.2.1 Resposta Imune Celular

A hemolinfa dos insetos contém hemócitos, que funcionam de forma semelhante aos fagócitos de mamíferos. A maioria dos hemócitos circula livremente dentro da hemolinfa, mas um número significativo (até 30% em algumas espécies de insetos) pode ser encontrado associado a órgãos internos como o corpo adiposo, a traquéia ou o sistema digestivo (RATCLIFFE, 1985).

Essas células, que estão presentes no hemocelo, conduzem processos imunes celulares, como a fagocitose, e produzem fatores imunológicos humorais que levam à morte de patógenos via lise ou melanização (HILLYER, 2016). As larvas da ordem Lepidoptera contêm cinco tipos distintos de hemócitos: pró-hemócitos, plasmatócitos que estão envolvidos na formação da cápsula, granulócitos que dirigem a fagocitose, oenocitóides que produzem enzimas envolvidas na cascata de melanização, e células esféricas cuja função é o transporte de componentes cuticulares (LAVINE; STRAND, 2002; STRAND, 2008).

Nas reações celulares, os microorganismos ou as células apoptóticas são fagocitadas, aprisionadas pela formação de nódulos, ou encapsuladas por hemócitos, e acredita-se que os receptores na superfície de plasmatócitos e granulócitos são semelhantes aos receptores de fagócitos em mamíferos (VILMOS; KURUCZ, 1998).

2.2.1.1 Fagocitose

G. mellonella produz várias proteínas plasmáticas que atuam como opsoninas; como a apolipoproteína III, proteínas de reconhecimento de peptidoglicano

(PGRPs), proteína catiônica 8 de *G. mellonella* (GmCP8) e hemolina que reconhecem e se ligam aos componentes microbianos, semelhantes aos receptores de reconhecimento padrão (PRRs) em mamíferos (TSAI; LOH; PROFT, 2016). Uma cascata intracelular resulta na internalização do corpo estranho (KAVANAGH; REEVES, 2004). A ativação da cascata de profenoloxidase (PPO) é necessária para que as células granulares se liguem ao agente estranho e realizem a fagocitose, enquanto o cálcio é necessário para a aderência dos plasmatócitos. A fagocitose é um processo mediado por lectinas que são encontradas na hemolinfa de insetos juntamente com a lisozima um peptídeo antimicrobiano geralmente associado à resposta humoral. A lisozima foi encontrada no interior dos hemócitos e os níveis na hemolinfa da lisozima e da lectina aumentam após a infecção, indicando que estes agem de maneira sinérgica no processo de fagocitose (WILSON; RATCLIFFE, 2000). Tojo et al., (2000) demonstraram em estudos *in vitro* de *G. mellonella*, que células granulares e plasmatócitos estão envolvidos nesta reação.

2.2.1.2 Formação de nódulos

A nodulação envolve a aderência coordenada dos hemócitos, formando agregados ao redor de microorganismos, e isso geralmente é seguido por melanização (GAGEN; RATCLIFFE, 1976; RATCLIFFE; GAGEN, 1976). Nesse processo imunológico, os granulócitos aderem uns aos outros e formam camadas que envolvem densos agregados microbianos. Os plasmatócitos, em seguida, agregam em torno da superfície do nódulo e, geralmente, toda a estrutura se torna melanizada (HILLYER, 2016).

2.2.1.3 Encapsulamento

O encapsulamento é um mecanismo de defesa multicelular onde uma cápsula de camadas sobrepostas de hemócitos é formada em torno de protozoários, nematóides e ovos ou larvas de insetos parasitos. A formação de cápsulas começa dentro de 30 min da entrada de um patógeno e inicialmente envolve a ligação de células granulares ao alvo seguido pela ligação de plasmatócitos que são atraídos para o sítio por peptídeos de reconhecimento de plasmatócitos que são liberados por granulócitos e induzem agregação

(KAVANAGH; REEVES, 2004; STRAND, 2008; VILMOS; KURUCZ, 1998).

2.2.2 Resposta Imune Humoral

Nos processos de defesa humoral três reações imediatas são desencadeadas: melanização, coagulação da hemolinfa e a síntese de peptídeos antimicrobianos (VILMOS; KURUCZ, 1998).

2.2.2.1 Melanização

O processo de melanização é fundamental para a defesa contra agentes patogênicos e resulta na deposição de melanina no micróbio na hemolinfa (RATCLIFFE, 1985), e está envolvido na morte de bactérias, fungos, protozoários, e nematoides (HILLYER, 2016). Os PRRs ativam o sistema complemento em vertebrados e o sistema profenoloxidase em insetos, vários PRRs humorais foram identificados em Lepidóptera e se ligam a lipopolissacarídeos (LPS), peptidoglicana e glucana associados a bactérias e/ou fungos. Estes incluem hemolina, proteína de ligação a LPS, proteína de reconhecimento de bactérias Gram-negativas (GNBPs), proteínas de reconhecimento de peptidoglicana (PGRPs) e proteínas de reconhecimento de glucana (GRPs) (KAVANAGH; REEVES, 2004; LAVINE; STRAND, 2002; STRAND, 2008).

2.2.2.2 Coagulação da hemolinfa

A homologia estrutural entre as enzimas de coagulação da hemolinfa, sistema do complemento e coagulação do sangue de mamíferos levanta a possibilidade de uma origem comum de todas estas cascatas proteolíticas (VILMOS; KURUCZ, 1998). Existem dois mecanismos de coagulação característicos dos insetos; o primeiro envolve a polimerização de proteínas coagulantes e é catalisado por uma transglutaminase dependente de cálcio. O segundo mecanismo de coagulação é a cascata de coagulação derivada dos hemócitos, onde as proteínas coagulantes são liberadas dos grânulos citoplasmáticos dos hemócitos para a hemolinfa em resposta à ativação por componentes da parede celular dos microorganismos invasores, onde as bactérias Gram negativas ativam o fator C e os

fungos ativam o fator G (SRITUNYALUCKSANA; SODERHALL, 2000).

2.2.2.3 Síntese de peptídeos antimicrobianos

A última linha de defesa é a síntese de uma gama de peptídeos antimicrobianos (AMPs), que são liberados de hemócitos e órgãos internos para a hemolinfa, onde atacam componentes da parede celular bacteriana ou fúngica (RATCLIFFE, 1985). O modo de ação de AMPs envolve, na maioria dos casos, a desestabilização de membranas celulares através da formação de poros (WOJDA, 2016). Os principais sítios de síntese de peptídeos antimicrobianos no inseto são corpo adiposo, hemócitos, trato digestivo, glândulas salivares e o trato reprodutivo, e sua difusão é feita através da hemolinfa para neutralizar os patógenos invasores. (KAVANAGH; REEVES, 2004).

Schuhmann et al., (2003) encontraram uma defensina, denominada gallerimicina, sua proteína recombinante exibiu atividade contra o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae*, mas não foi ativo contra leveduras *Saccharomyces cerevisiae* ou bactérias testadas (*Micrococcus luteus* e *Bacillus subtilis*). Galiomicina foi descrita por Lee et al., (2004), quem mostrou atividade antifúngica contra os fungos filamentosos e levedura: *Trichoderma viride*, *Pyricularia grisea*, *Geotrichum candidum* e *C. albicans*. Mas não exibiu atividade contra as bactérias *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*.

Moricinas também foram descritas em *G. mellonella*, e são particularmente ativas contra fungos filamentosos, mas também, até certo ponto, contra leveduras, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (BROWN et al., 2008).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar a infecção de *P. brasiliensis* e *P. lutzii* no modelo alternativo animal de *G. mellonella*.

3.2 ESPECÍFICOS

- Determinar $TD_{50\%}$, morte do 50% das larvas de *G. mellonella* infectadas com *P. brasiliensis* (Pb-18) e *P. lutzii* (LDR2).
- Determinar a densidade de hemócitos das larvas de *G. mellonella* infectadas com *P. brasiliensis* (Pb-18) e *P. lutzii* (LDR2) em diferentes tempos.
- Avaliar a resposta imune de *G. mellonella* através da quantificação de melanização por *P. brasiliensis* (Pb-18) e *P. lutzii* (LDR2) em diferentes tempos.
- Avaliar a resposta fagocitária dos hemócitos de *G. mellonella* contra *P. brasiliensis* (Pb-18) e *P. lutzii* (LDR2).
- Avaliar a formação de biofilme de *P. lutzii* (LDR2), e comparar a virulência entre células planctônicas e biofilme de *P. brasiliensis* (Pb-18) e *P. lutzii* (LDR2) no modelo de *G. mellonella*.

REFERÊNCIAS

- BAGAGLI, E. et al. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 58, n. 4, p. 505–512, may. 1998.
- BAGAGLI, E. et al. *Paracoccidioides brasiliensis*: Phylogenetic and ecological aspects. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4–5, p. 197–207, apr. 2008.
- BARBOSA, S. M. et al. Glycerinaldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* Is a Cell Surface Protein Involved in Fungal Adhesion to Extracellular Matrix Proteins and Interaction with Cells. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 1, p. 382–389, jan. 2006.
- BARBOSA, W.; DAHER, R.; OLIVEIRA, A. R. Forma Linfático abdominal da Blastomicose Sul-Americana. **Rev Inst Med trop São Paulo**, v. 10, n. 1, p. 16–27, jan. 1968.
- BELLISSIMO-RODRIGUES, F. et al. Endemic paracoccidioidomycosis: Relationship between clinical presentation and patients' demographic features. **Medical Mycology**, v. 51, n. 3, p. 313–318, apr. 2013.
- BENARD, G. et al. Immunosuppression in Paracoccidioidomycosis: T Cell Hyporesponsiveness to Two *Paracoccidioides brasiliensis* Glycoproteins that Elicit Strong Humoral Immune Response. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 175, n. 5, p. 1263–1267, may. 1997.
- BORGHI, E. et al. Correlation between *Candida albicans* biofilm formation and invasion of the invertebrate host *Galleria mellonella*. **Future Microbiology**, v. 9, n. 2, p. 163–173, feb. 2014.
- BRENNAN, M. et al. Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae. **FEMS immunology and medical microbiology**, v. 34, n. 2, p. 153–7, 11 oct. 2002.
- BROWN, S. E. et al. The discovery and analysis of a diverged family of novel antifungal moricin-like peptides in the wax moth *Galleria mellonella*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, n. 2, p. 201–212, feb. 2008.
- BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: An update. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, n. 2, p. 89–117, apr. 1993.
- CAMARGO, Z. P.; UNTERKIRCHER, C.; TRAVASSOS, L. R. Identification of antigenic polypeptides of *Paracoccidioides brasiliensis* by immunoblotting. **Medical Mycology**, v. 27, n. 6, p. 407–412, jan. 1989.
- CARRERO, L. L. et al. New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. **Fungal Genetics and Biology**, v. 45, n. 5, p. 605–612, feb. 2008.
- COLEMAN, J. J. et al. *Fusarium* pathogenesis investigated using *Galleria mellonella* as a heterologous host. **Fungal Biology**, v. 115, n. 12, p. 1279–1289, dec. 2011.
- CORREDOR, G. G. et al. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from the nine-banded armadillo *Dasypus novemcinctus*, in an endemic area for paracoccidioidomycosis in Colombia. **Revista iberoamericana de micología**, v. 16, n. 4, p. 216–20, sep. 1999.
- COSTERTON, J. W. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318–1322, may. 1999.
- COUTINHO, Z. F. et al. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Cadernos de Saúde Pública**, v. 18, n. 5, p. 1441–1454, oct. 2002.

- DA SILVA NETO, B. et al. The malate synthase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a linked surface protein that behaves as an anchorless adhesin. **BMC Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 272, dec. 2009.
- DE ALBORNOZ, M. B. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. **Medical Mycology**, v. 9, n. 3, p. 248–253, 1971.
- DE FARIAS, M. R. et al. Paracoccidioidomycosis in a Dog: Case Report of Generalized Lymphadenomegaly. **Mycopathologia**, v. 172, n. 2, p. 147–152, mar. 2011.
- DE MATTOS GROSSO, D. et al. Characterization of gp70 and Anti-gp70 Monoclonal Antibodies in *Paracoccidioides brasiliensis* Pathogenesis. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 11, p. 6534–6542, nov. 2003.
- DE OLIVEIRA, H. C. et al. Paracoccidioides-host interaction: An overview on recent advances in the paracoccidioidomycosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1–20, nov. 2015.
- FLEMMING, H.-C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 623–633, sep. 2010.
- FRANCO, M. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. **Medical Mycology**, v. 25, n. 1, p. 5–18, 1987.
- FRANCO, M. et al. Paracoccidioidomycosis: A Recently Proposed Classification of Its Clinical Forms. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 20, n. 2, p. 129–132, 1987.
- FUCHS, B. B.; MYLONAKIS, E. Using non-mammalian hosts to study fungal virulence and host defense. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, n. 4, p. 346–351, aug. 2006.
- GAGEN, S. J.; RATCLIFFE, N. A. Studies on the *in vivo* cellular reactions and fate of injected bacteria in *Galleria mellonella* and *Pieris brassicae* larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 28, n. 1, p. 17–24, jul. 1976.
- GONZALEZ, A. et al. Purification and Partial Characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* Protein with Capacity To Bind to Extracellular Matrix Proteins. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 4, p. 2486–2495, apr. 2005.
- HAHN, R. C. et al. Randomly amplified polymorphic DNA as a valuable tool for epidemiological studies of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 7, p. 2849–2854, jul. 2003.
- HEADLEY, S. A. et al. *Paracoccidioides brasiliensis*-associated dermatitis and lymphadenitis in a dog. **Mycopathologia**, v. 182, n. 3–4, p. 425–434, oct. 2017.
- HERNANDEZ, O. et al. A 32-Kilodalton Hydrolase Plays an Important Role in *Paracoccidioides brasiliensis* Adherence to Host Cells and Influences Pathogenicity. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 12, p. 5280–5286, dec. 2010.
- HERNÁNDEZ, O. et al. The hydrolase PbHAD32 participates in the adherence of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to epithelial lung cells. **Medical Mycology**, v. 50, n. 5, p. 533–537, jul. 2012.
- HILLYER, J. F. Insect immunology and hematopoiesis. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 58, p. 102–118, dec. 2016.
- HOFFMANN, J. A. Innate immunity of insects. **Current Opinion in Immunology**, v. 7, n. 1, p. 4–10, feb. 1995.
- HURLOW, J. et al. Clinical Biofilms: A Challenging Frontier in Wound Care. **Advances in Wound Care**, v. 4, n. 5, p. 295–301, jul. 2015.
- KANETSUNA, F. et al. Biochemical Studies on the Thermal Dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Bacteriology**, v. 110, n. 1, p. 208–218, apr. 1972.

- KANETSUNA, F.; CARBONELL, L. M. Cell wall glucans of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Bacteriology**, v. 101, n. 3, p. 675–680, mar. 1970.
- KAVANAGH, K.; FALLON, J. P. *Galleria mellonella* larvae as models for studying fungal virulence. **Fungal Biology Reviews**, v. 24, n. 1–2, p. 79–83, apr. 2010.
- KAVANAGH, K.; REEVES, E. P. Exploiting the potential of insects for *in vivo* pathogenicity testing of microbial pathogens. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 28, n. 1, p. 101–112, 2004.
- KUROKAWA, C. S.; SUGIZAKI, M. F.; PERAÇOLI, M. T. S. Virulence factors in fungi of systemic mycoses. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 40, n. 3, p. 125–136, may. 1998.
- LACAZ, C.S. et al. Paracoccidioidomycose. In _____. **Tratado de Micologia médica Lacaz**. 9. ed. São Paulo: Sarvier, 2002. cap.27, p. 647-648.
- LAVINE, M. D.; STRAND, M. R. Insect hemocytes and their role in immunity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 32, n. 10, p. 1295–1309, oct. 2002.
- LEE, Y. S. et al. Purification, cDNA cloning and expression of an insect defensin from the great wax moth, *Galleria mellonella*. **Insect Molecular Biology**, v. 13, n. 1, p. 65–72, feb. 2004.
- LIONAKIS, M. S. *Drosophila* and *Galleria* insect model hosts. **Virulence**, v. 2, n. 6, p. 521–527, nov. 2011.
- MATHA, V.; MRACEK, Z. Changes in haemocyte counts in *Galleria mellonella* (L) (Lepidoptera: Galleriidae) larvae infected with *Steinernema* sp. (Nematoda: steinernematidae). **Nematology**, v. 30, p. 86–89, jul. 1984.
- MATUTE, D. R. et al. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 23, n. 1, p. 65–73, 2006.
- MAURER, E. et al. *Galleria mellonella* as a host model to study *Aspergillus terreus* virulence and amphotericin B resistance. **Virulence**, v. 6, n. 6, p. 591–598, 18 aug. 2015.
- MENDES-GIANNINI, M. J. S. et al. Pathogenesis II: Fungal responses to host responses: interaction of host cells with fungi. **Medical Mycology**, v. 38, n. 1, p. 113–123, dec. 2000.
- MOLINARI-MADLUM, E. E. W. I.; FELIPE, M. S. S.; SOARES, C. M. A. Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates can be correlated to groups defined by random amplified polymorphic DNA analysis. **Medical Mycology**, v. 37, n. 4, p. 269–276, aug. 1999.
- MYLONAKIS, E. et al. Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Cryptococcus neoformans* as a model of yeast pathogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 24, p. 15675–15680, nov. 2002.
- MYLONAKIS, E. et al. *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. **Infection and immunity**, v. 73, n. 7, p. 3842–2850, jan. 2005.
- MYLONAKIS, E. *Galleria mellonella* and the Study of Fungal Pathogenesis: Making the Case for Another Genetically Tractable Model Host. **Mycopathologia**, v. 165, n. 1, p. 1–3, jan. 2008.
- PEREIRA, L. A. et al. Analysis of the *Paracoccidioides brasiliensis* triosephosphate isomerase suggests the potential for adhesin function. **FEMS Yeast Research**, v. 7, n. 8, p. 1381–1388, dec. 2007.
- POPI, A. F.; LOPES, J. D.; MARIANO, M. GP43 from *Paracoccidioides brasiliensis* inhibits macrophage functions. An evasion mechanism of the fungus. **Cellular**

- Immunology**, v. 218, n. 1–2, p. 87–94, jul. 2002.
- PUCCIA, R. et al. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: Identification of a specific antigen. **Infection and Immunity**, v. 53, n. 1, p. 199–206, jul. 1986.
- RATCLIFFE, N. A. Invertebrate immunity — A primer for the non-specialist. **Immunology Letters**, v. 10, n. 5, p. 253–270, jan. 1985.
- RATCLIFFE, N. A.; GAGEN, S. J. Cellular defense reactions of insect hemocytes *in vivo*: Nodule formation and development in *Galleria mellonella* and *Pieris brassicae* larvae. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 28, n. 3, p. 373–382, nov. 1976.
- REEVES, E. P. et al. Correlation between Gliotoxin Production and Virulence of *Aspergillus fumigatus* in *Galleria mellonella*. **Mycopathologia**, v. 158, n. 1, p. 73–79, jul. 2004.
- RESTREPO, A.; GÓMEZ, B. L.; TOBÓN, A. Paracoccidioidomycosis: Latin America's own fungal disorder. **Current Fungal Infection Reports**, v. 6, n. 4, p. 303–311, oct. 2012.
- RICCI, G. et al. Canine paracoccidioidomycosis. **Medical Mycology**, v. 42, n. 4, p. 379–383, jan. 2004.
- SALGADO-SALAZAR, C. et al. The human fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* (Onygenales: Ajellomycetaceae) is a complex of two species: phylogenetic evidence from five mitochondrial markers. **Cladistics**, v. 26, n. 6, p. 613–624, dec. 2010.
- SAN-BLAS, G. et al. Cell wall analysis of an adenine-requiring mutant of the yeast-like form of *Paracoccidioides brasiliensis* strain IVIC Pb9. **Medical Mycology**, v. 15, n. 3, p. 297–303, jan. 1977.
- SAN-BLAS, G.; NIÑO-VEGA, G.; ITURRIAGA, T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: Molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Medical Mycology**, v. 40, n. 3, p. 225–242, 2002.
- SARDI, J. DE C. O. et al. *In vitro* *Paracoccidioides brasiliensis* biofilm and gene expression of adhesins and hydrolytic enzymes. **Virulence**, v. 6, n. 6, p. 642–651, aug. 2015.
- SCHUHMANN, B. et al. Cloning and expression of gallerimycin, an antifungal peptide expressed in immune response of greater wax moth larvae, *Galleria mellonella*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 53, n. 3, p. 125–133, jul. 2003.
- SCORZONI, L. et al. Comparison of virulence between *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii* using *Galleria mellonella* as a host model. **Virulence**, v. 6, n. 8, p. 766–776, nov. 2015.
- SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. Guidelines in paracoccidioidomycosis. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, v. 39, n. 3, p. 297–310, 2006.
- SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 5, p. 715–740, jul. 2017.
- SHOME, S. K.; BATISTA, A. C. Occurrence of *Paracoccidioides brasiliensis* in the soil of Recife, Brazil. **Rev Fac Med Fed Ceará**, v.3, p. 90–94, 1963.
- SILVA-VERGARA, M. L. et al. Isolation of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil of a coffee plantation in Ibiá, State of Minas Gerais, Brazil. **Medical mycology**, v. 36, n. 1, p. 37–42, oct. 1998.
- SIQUEIRA, I. M. et al. Distinct patterns of yeast cell morphology and host responses induced by representative strains of *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb18) and

- Paracoccidioides lutzii* (Pb01). **Medical Mycology**, v. 54, n. 2, p. 177–188, 2016.
- SRITUNYALUCKSANA, K.; SODERHALL, K. The proPO and clotting system in crustaceans. **Aquaculture**, v. 191, n. 1–3, p. 53–69, may. 2000.
- STEENBERGEN, J. N. et al. *Cryptococcus neoformans* Virulence Is Enhanced after Growth in the Genetically Malleable Host *Dictyostelium discoideum*. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 9, p. 4862–4872, jun. 2003.
- STEENBERGEN, J. N.; SHUMAN, H. A.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 26, p. 15245–15250, dec. 2001.
- STRAND, M. R. The insect cellular immune response. **Insect Science**, v. 15, n. 1, p. 1–14, jan. 2008.
- TAKAYAMA, A. et al. An atypical *Paracoccidioides brasiliensis* clinical isolate based on multiple gene analysis. **Medical Mycology**, v. 48, n. 1, p. 64–72, feb. 2010.
- TEIXEIRA, M. D. M. et al. *Paracoccidioides lutzii* sp. nov.: biological and clinical implications. **Medical Mycology**, v.52, n.1,p. 1–10, jun. 2013.
- TEIXEIRA, M. M. et al. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 52, n. 2, p. 273–283, apr. 2009.
- TEIXEIRA, M. M. et al. *Paracoccidioides* Species Complex: Ecology, Phylogeny, Sexual Reproduction, and Virulence. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 10, p. 4–7, oct. 2014.
- THEODORO, R. C. et al. Genus *Paracoccidioides*: Species recognition and biogeographic aspects. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, may. 2012.
- THOMAZ, L. et al. *Galleria mellonella* as a model host to study *Paracoccidioides lutzii* and *Histoplasma capsulatum*. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 139–46, feb. 2013.
- TOBÓN, A M. et al. Residual pulmonary abnormalities in adult patients with chronic paracoccidioidomycosis: prolonged follow-up after itraconazole therapy. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 37, n. 7, p. 898–904, oct. 2003.
- TOJO, S. et al. Involvement of both granular cells and plasmatocytes in phagocytic reactions in the greater wax moth, *Galleria mellonella*. **Journal of Insect Physiology**, v. 46, n. 7, p. 1129–1135, 2000.
- TORRES, I. et al. Inhibition of PbGP43 Expression May Suggest that gp43 is a Virulence Factor in *Paracoccidioides brasiliensis*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, jul. 2013.
- TREJO-CHÁVEZ, A. et al. Disseminated Paracoccidioidomycosis in a Southern Two-Toed Sloth (*Choloepus didactylus*). **Journal of Comparative Pathology**, v. 144, n. 2–3, p. 231–234, 2011.
- TSAI, C. J.-Y.; LOH, J. M. S.; PROFT, T. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. **Virulence**, v. 7, n. 3, p. 214–229, apr. 2016.
- TURISSINI, D. A. et al. Species boundaries in the human pathogen *Paracoccidioides*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 106, n. june, p. 9–25, set. 2017.
- UNTEREINER, W. A. et al. The Ajellomycetaceae, a New Family of Vertebrate-Associated Onygenales. **Mycologia**, v. 96, n. 4, p. 812, jul. 2004.
- VALLE, A. C. F. DO et al. Clinical and endoscopic findings in the mucosae of the upper respiratory and digestive tracts in post-treatment follow-up of paracoccidioidomycosis patients. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 37, n. 5, p. 407–413, out. 1995.
- VICENTINI, A. P. et al. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through

surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 4, p. 1465–1469, apr. 1994.

VILMOS, P.; KURUCZ, E. Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. **Immunology Letters**, v. 62, n. 2, p. 59–66, jun. 1998.

WILSON, R.; RATCLIFFE, N. . Effect of lysozyme on the lectin-mediated phagocytosis of *Bacillus cereus* by haemocytes of the cockroach, *Blaberus discoidalis*. **Journal of Insect Physiology**, v. 46, n. 5, p. 663–670, may. 2000.

WOJDA, I. Immunity of the greater wax moth *Galleria mellonella*. **Insect Science**, v. 24, n. 3, p. 342–357, jun. 2016.

***Paracoccidioides brasiliensis* (Pb-18) and *Paracoccidioides lutzii* (LDR-2) host-pathogen interaction in *G. mellonella* larvae model.**

Escobar Arcos, J.J.², Caloni Custódio C.², Moniqui Nunes T.², Oliveira Souza B.D.¹, Couto de Almeida R.S.², Itano E.N.¹.

¹ Department of Pathologic Sciences, State University of Londrina, UEL, Londrina, PR, Brazil;

² Department of Microbiology, State University of Londrina, UEL, Londrina, PR, Brazil.

Abstract

Paracoccidioidomycosis (PCM) caused by the dimorphic fungus of the genus *Paracoccidioides* is one of the most important systemic mycoses in Latin America. Considering the new PCM agents as *P. lutzii*, in addition to *P. brasiliensis*, the present work evaluated their host-pathogen interaction in *G. mellonella* larvae model. The larvae survival curves, the innate immune response (melanization, hemocytes density, and phagocytosis) and biofilm formation and experimental infections between biofilms and planktonic cells from *P. brasiliensis* (Pb-18) and *P. lutzii* (LDR-2), were evaluated. Our data confirm different virulence levels of both species based on the survival curves and the melanization. The granular cells and plasmatocytes were able to phagocytize the yeast cells and also both yeasts formed biofilm *in vitro* with progressive growth over time. The current paper is the first study of *Paracoccidioides* spp. biofilms experimental infections between biofilms and planktonic cells and, shows early larvae death with biofilm cells, mainly with *P. lutzii* (LDR2). In conclusion, *P. lutzii* (LDR2) may be more virulent than *P. brasiliensis* (Pb18) by *G. mellonella* larvae model. Additional studies are needed to determine the role of these biofilms *in vivo* involved in the premature death of the larvae.

Key words: hemocytes, virulence, immune response, biofilm, paracoccidioidomycosis, phagocytosis, *G. mellonella*, *P. brasiliensis*, *P. lutzii*.

1. Introduction

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis caused by pathogenic fungi of the *Paracoccidioides* genus (1,2) The disease is geographically

restricted to subtropical areas of Latin America (from south of Mexico to north Argentina) with a high prevalence in Brazil, Colombia and Venezuela. Imported cases diagnosed in North America, Europe and Asia represent patients who had previously lived in recognized endemic areas (3–5). PCM represented the eighth cause of death from chronic infectious and parasitic diseases in Brazil, and the mean mortality rate was 1.45 per million inhabitants per year, showing that the mortality rate justifies classifying this disease as a major public health problem in Brazil (6).

The *Paracoccidioides* spp. virulence retain several factors which allow their growth in adverse conditions provided by the host, such as dimorphism (7,8), cell surface proteins called adhesins that play a fundamental role in the colonization and are capable of mediating fungi-host interactions during infection (9–15), and biofilm formation (16,17).

The thermodimorphic fungus *P. brasiliensis* was considered the only etiologic agent of PCM, however, in recent years several studies showed significant genetic diversity among different strains of the genus *Paracoccidioides*, leading to the recognition of four new species *P. lutzii* (2), *P. americana*, *P. restrepiensis* and *P. venezuelensis* (18). Consequently, murine models have been used to study fungus-host interactions of *P. brasiliensis* and *P. lutzii* demonstrated a marked difference in their virulence patterns, (19) differences in morphology, induced immune response, and pathology (20). These results opened perspectives for new clinical studies including more isolates of this genus which may result in significant consequences for clinical manifestations, diagnosis, and treatment of this disease.

Non-mammalian hosts have been used to study host–fungal interactions and *Galleria mellonella* provides some benefits as a model host in comparison with other invertebrate hosts that support its use as an infection model:

the larvae can be maintained under various temperature conditions ranging from 25°C to 37°C, multiple options for facile delivery of the pathogen, the study of fungal pathogenesis yielding results comparable with those obtained from mice (21–23), and when compared with mammalian hosts the invertebrates are inexpensive, easy breeding in large numbers, relatively simple maintenance in the laboratory, represents a significant reduction in time to obtain results and without the legal or ethical restrictions (24,25). In contrast to mammals, the insects only possess complex innate immune system divided into cellular and humoral defense responses (26,27). The former is based on blood cells or hemocytes, which mediate important cellular immune responses, including phagocytosis, nodulation, and encapsulation (27–29). In humoral response processes three immediate reactions are triggered: melanization, clotting of the hemolymph and the synthesis of antimicrobial peptides (27,30) .

The larval form of this insect has been employed to study pathogenic fungi such *Aspergillus fumigatus* (31), *Aspergillus terreus* (32), *Candida* spp. (22), *Cryptococcus neoformans* (33), *Fusarium* spp. (34) *Paracoccidioides lutzii* and *Histoplasma capsulatum* (35), and *Paracoccidioides* spp (36).

In the present work, we to utilize *G. mellonella* larvae as an *in-vivo* model to study host-pathogen interactions in *P. brasiliensis* and *P. lutzii* infection, investigating the ability of *P. brasiliensis* and *P. lutzii* yeasts to form biofilm *in vitro*. This biofilm formation was evaluated as a virulence factor in experimental infections between biofilms and planktonic cells. Furthermore, innate immune response of *G. mellonella* was assessed by survival curves, haemocytes density, melanization quantification, and phagocytosis assay.

2. Materials and methods

2.1 Fungal strains and growth conditions

P. brasiliensis S1 (Pb-18) a highly virulent and of reference strain, and *P. lutzii* LDR2 (Pb01-like; IFM 54648) (37), strain was initially recovered from a 64-year-old Brazilian man with PCM chronic multi-focal, the patient lived in Botucatu, São Paulo, Brazil, and at the time of diagnosis lived in Londrina, PR, Brazil, which are endemic areas of this disease. The fungi were maintained in yeast form on Sabouraud dextrose agar at 35°C, subcultured every 5–7 days.

2.2 Preparation of inoculum

For inoculum, yeast cells of *Paracoccidioides* spp. were harvested from 6-day-old cultures on Sabouraud dextrose medium, suspended in a sterile phosphate buffered saline solution (PBS: NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,76 mM, pH 7.4). The suspensions were washed twice in PBS and then were passed through a syringe with layers of sterile gauze to eliminate clumps of fungal cells. The yeast cells were counted in a Neubauer chamber and the suspensions adjusted to different cell concentrations by dilution in PBS.

2.3 *G. mellonella* larvae

Final instar *G. mellonella* larvae were obtained from the laboratory of alternative methods to the use of animals, Department of Microbiology, Center of Biological Sciences, State University of Londrina, Londrina, PR, Brazil. *G. mellonella* were reared on an artificial diet as described by Tomiotto-Pellissier et al. (38), at 28°C in the dark. The larvae were selected according to the following criteria: weight of 160-240 mg, showing a clear and uniform color, without dark spots or gray marks.

2.4 *G. mellonella* survival assay

For determination of $TD_{50\%}$, yeast suspensions ($10\ \mu\text{L}$ of a 5×10^8 , 2.5×10^8 or 1×10^8 yeast cells/mL) were injected in the haemocoel through the last left pro-leg of the larvae as described by Fuchs et al (39). Therefore, the resulting final inoculum concentration for each group was 5×10^6 , 2.5×10^6 , 1×10^6 yeast cells/larva. In all experiments two control groups of uninfected larvae were inoculated with $10\ \mu\text{L}$ of PBS and $10\ \mu\text{L}$ of yeasts heat-inactivated for 6 h at 60°C . For each group, a total of 10 larvae were chosen for each assay, and were performed on three independent occasions. After infection, all *G. mellonella* larvae were placed in sterile Petri dishes and were incubated at 35°C , and the survival of the larvae were evaluated every day for 7 days. Larval death was determined by visual inspection and by the lack of movement to physical stimulation.

2.5 Haemocytes density determination in the haemolymph

Groups of three larvae were inoculated with 5×10^6 yeast cells/larva of *P. brasiliensis* (Pb-18) or *P. lutzii* (LDR2) as described above, and then incubated at 35°C for 2, 4 and 8 h. After the infection period, $40\ \mu\text{L}$ of haemolymph were collected in a sterile microtube containing the same volume of Insect Physiological Saline Buffer (IPS; 150 mM sodium chloride, 5 mM potassium chloride, 10 mM Tris-HCl pH 6.9, 10 mM EDTA and 30 mM sodium citrate plus 10mMN-ethylmaleimide (anticoagulant) and were placed on ice and sample collection was carried out immediately to avoid cell melanization. Subsequently a 1:10 dilution in IPS, density was assessed by counting the haemocytes using a Neubauer chamber. Group inoculated with PBS was included as control. All determinations were performed on three independent experiments. The results were expressed as haemocytes/mL.

2.6 Melanization quantification

Larvae were inoculated with 5×10^6 yeast cells/larva of *P. brasiliensis* (Pb-18) or *P. lutzii* (LDR2) as described above, and incubated at 35°C, before the haemolymph of each larva was collected at 4 and 12 h post-infection. Haemolymph was diluted 1:10 in IPS buffer and 200 μ L of each sample were placed in 96 well microdilution plates and quantification of melanization assay was performed as described by Scorzoni et al. (40) Then, the OD at 405 nm was measured using microtiter plate reader (LabSystems Multiskan EX). The experiment was performed in triplicate and independently repeated at least three times.

2.7 Phagocytic assay for microscopy analysis

The phagocytic capacity of the hemocytes was performed based on the protocol described by Tomiotto-Pellissier et al. (38) with slight modifications. In a 24-well plate, 1×10^5 hemocytes were added in 100 μ L IPS without anticoagulant on 13-mm round coverslips treated with acetic acid, and the plates were incubated for 30 min at 37°C with 5% CO₂ to allow cell adherence. Then, non-adherent hemocytes were removed and the adhered cells were co-incubated with yeast cells of *P. brasiliensis* (Pb-18) or *P. lutzii* (LDR2), or latex beads (control, 1 μ m diameter, Sigma-Aldrich) in a 1:10 ratio in RPMI 1640 medium (Gibco by life technologies, USA) with a final volume adjusted to 500 μ L, the phagocytosis was analyzed after 1 h of incubation at 37°C.

The samples were then washed with IPS without anticoagulant to remove non-adherent yeast cells/beads and the samples fixed with 1 mL methanol (Anidrol) for 20 min. Then, cells were stained with MayGrünwald (Laborclin, Brazil) for 20 min, washed with Sorenson's buffer [0.133 M Na₂HPO₄ (F. Maia, Brazil), 0.133

M KH₂PO₄ (F. Maia, pH 7.2)] and immersed in Giemsa dye (Laborclin) for 20 min. Finally, the coverslips were again washed with Sorenson's buffer, air dried, and mounted on glass slides.

To quantify the rate of phagocytosis for each cover slip, ten fields that contained at least 50 hemocytes were examined. The rate of phagocytosis was calculated according to the following formula: Phagocytic rate = [(phagocytic hemocyte)/ (total hemocyte)] × 100%.

2.8 Analysis of biofilm formation

The ability of *Paracoccidioides* spp. strains to form biofilms was performed according to with Sardi et al. (16) some modifications. Initially, 500 µL of a culture of 1x10⁸ cells/mL of *P. brasiliensis* (Pb-18) and *P. lutzii* (LDR2) in PBS was added to the wells of a 24-well plate (TPP, Trasadingen, Switzerland) and incubated at 37°C for 7 h in 5% CO₂ for biofilm pre-adhesion. After pre-adhesion for 7 h, the supernatant was removed from each well to remove non adherent cells. Then 1000 µL of RPMI 1640 (Gibco by life technologies, USA) that contained L-glutamine, but not sodium bicarbonate supplemented with 2% glucose and 10% fetal bovine serum, was added to each well and the plates were further incubated under the same conditions. The culture medium was renewed every 48 hours. After biofilm formation for 48, 96 and 144 h, the medium and planktonic cells were removed and the biofilms were washed twice with 400 µL of PBS using gentle pipetting.

2.8.1 Measurement of biofilm biomass

Based on the protocol described by Brilhante et al. (41), the wells were then washed three times with 400 µL of PBS, followed by fixation with 200 µL

100% methanol. After removing the methanol, the wells were left to dry at room temperature. Afterwards, 0.1% crystal violet solution was added and incubated for 20 min. The wells were then washed four times with 400 μ L of PBS and a 33% solution of acetic acid was added to the previously coloured wells. Subsequently, the content of each plate was transferred to another 96-well plate, and was measured in a microtiter plate reader (LabSystems Multiskan EX) at 570 nm. Three independent experiments were carried out with three replicates for each strain. Wells containing only RPMI 1640 supplemented with 2% glucose and 10% fetal bovine serum were included as negative controls in all experiments. Biofilm formation was evaluated at the following times: 7, 48, 96 and 144 h.

2.9 Virulence of Planktonic and Biofilm Cells in *Galleria mellonella*

After biofilm formation for 144 h, the planktonic cells and the medium were removed. The biofilms cells were washed twice with 400 μ L of PBS using gentle pipetting, and these cells were destroyed with a scraper, planktonic cells and biofilms were counted using a Neubauer chamber and adjusted to the final concentration of 5×10^8 yeast cells/mL, the resulting the final inoculum concentration was 5×10^6 yeast cells/larva. *G. mellonella* larvae were injected and monitored as previously described. For each condition, a total of 10 larvae were used, and each experiment was repeated at three times.

2.10 Statistical analysis

Graphs and statistical analyses were performed with Graph-Pad Prism 6 (Graph Pad Software Inc., CA, USA). Survival curves were analyzed by Log-rank (Mantel-Cox) test. Analysis of changes in hemocyte density and melanization

quantification were performed by Two-way ANOVA and Tukey's multiple comparison post test. Results of phagocytosis assay were analyzed using One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's post test. All experiments were performed on three independent occasions and results are expressed as the mean \pm S.D. *P* values of < 0.05 were considered significant.

3.0 Results

3.1 Survival of *G. mellonella* after infection with *P. brasiliensis* and *P. lutzii*.

The results of survival of infected larvae with three different concentrations 5×10^6 , 2.5×10^6 , 1×10^6 cells/larva of *P. brasiliensis* (Pb-18) or *P. lutzii* (LDR2) in *G. mellonella*, within 7 days of infection are shown in Figure 1 A and 1 B. An analysis of the survival curve showed that the killing of the larvae depended on the number of cells/larva injected, differences between the strains in the virulence and that the 50% survival mark varied according to inoculum size.

With the higher inoculum levels (5×10^6), the time necessary to result in 50% killing ($TD_{50\%}$) ranged from 2 to 3 days for *P. brasiliensis* and for *P. lutzii*, and different virulence levels of both species based on the survival curves profiles was found in this model ($p < 0.05$). The 1×10^6 , 2.5×10^6 and 5×10^6 cells/larva concentration of *P. brasiliensis* was able to kill 40%, 56.7% and 90% of the larvae respectively. These same doses with *P. lutzii* induced 60%, 93.33% and 100% larvae death within the observation period. Each concentration of *P. brasiliensis* ($p = 0.0001$) and *P. lutzii* ($p < 0.0001$) tested significantly reduced the survival of *G. mellonella* compared with the control groups (PBS-infected larvae and yeasts heat-inactivated infected larvae). There was a significant difference between low inoculum levels (1×10^6 cells/larva)

and the higher inoculum levels (5×10^6 cells/larva) in the larval survival for *P. brasiliensis* ($p=0.0005$) and for *P. lutzii* ($p<0.0001$). In addition, a significant difference was observed between low inoculum levels (1×10^6 cells/larva) and the average inoculum levels (2.5×10^6 cells/larva) in the larval survival for *P. lutzii* ($p=0,0009$).

3.2 Hemocyte density after infection with *P. brasiliensis* and *P. lutzii*.

The infection with 5×10^6 cells/larva of *P. brasiliensis* (Pb-18) and *P. lutzii* (LDR2) significantly reduced the hemocyte density after 2 hours of infection and this decrease was remained almost unchanged after 4 and 8 h of infection compared with the control group larvae injected with PBS as shown in figure 2.

Statistically, significant differences in hemocytes density were observed between larvae inoculated with *P. brasiliensis* (Pb-18) and *P. lutzii* (LDR2) with the control group ($p<0,0001$). The number of hemocytes present in the haemolymph of infected larvae with both strains tested revealed comparable hemocyte numbers at different times (2, 4 and 8 h) ($p>0,05$).

3.3 Melanization quantification

A melanization of pathogens is controlled by the enzyme phenoloxidase (PO), and activation of the PO cascade in the haemolymph results in the deposition of melanin around invading yeast (42). Progression of *P. brasiliensis* (Pb-18) and *P. lutzii* (LDR2) infection resulted in an increase in *G. mellonella* larvae pigmentation after 4 h post infection (Figure 3 A-C). Quantification of melanization indicated significant differences ($p<0,0001$) between larvae inoculated with *P. brasiliensis* (Pb-18) and *P. lutzii* (LDR2) compared with the control group (larvae inoculated with PBS) after 4 and 12 h post-infection, and the accumulation of melanin

in the haemolymph has increased over time as shown in Figure 3 D.

Larvae infected with *P. lutzii* (LDR2) showed higher melanization than *P. brasiliensis* (Pb-18) after of 4 h ($p=0,0047$) and 12 h ($p<0,0001$). These data suggest this *P. lutzii* induce higher levels of melanization as a mechanism of immune responses in *G. mellonella* larvae that might contribute to virulence potential and faster larval mortality.

3.4 Phagocytosis assay

The phagocytosis assay *in vitro* by light microscope evaluated if *G. mellonella* haemocytes had the ability to phagocyte *P. brasiliensis* (Pb-18) and *P. lutzii* (LDR2) yeast cells. Both granular cells and plasmatocytes were able to phagocytize this yeast cells (Fig. 4), however, spherule cells and oenocytoids did not phagocytize these cells.

The *P. brasiliensis* and *P. lutzii* phagocytic rate by granular cells and plasmatocytes were higher than control treated with beads (Figure 4D). *P. lutzii* ($p<0,01$) and the control with latex beads ($p=0,415$) showed higher phagocytic rate, for granular cells 25,7% and 6,5% than for plasmatocytes 16,4% and 4,1% respectively.

3.5 In vitro biofilm formation by *Paracoccidioides* spp.

The ability of the *P. brasiliensis* (Pb-18) and *P. lutzii* (LDR2) strains to form biofilms *in vitro* was evaluated. The kinetics of biofilm formation was measured on 24-well polystyrene microtiter plates using the crystal violet staining to determine the total biomass.

The biofilm growth curve showed that both strains adhered to the

plastic surface after 7 hours of incubation, which included the adhesion period. Over a period of 48, 96 and 144 h, an increasingly larger biofilm was observed, the optical density values of biomass increased with time, reflecting the increased number of cells that constituted the mature biofilm (Figure 5). The kinetics of biofilm formation was similar in both strains analyzed and did not show statistically significant differences ($p=0,5861$).

3.6 Virulence of Planktonic and Biofilm Cells in *Galleria mellonella*

The virulence of the planktonic (PC) and biofilm cells (BC) of *P. brasiliensis* (Pb-18) and *P. lutzii* (LDR2) were compared in the *G. mellonella in vivo* model. The survival curve profile of infected larvae showed a statistically significant difference between BC and PC for *P. brasiliensis* ($p=0,0078$), and for *P. lutzii* ($p=0,008$) as shown in Figure 6 A and 6 B. After 3 and 5 days post-infection, all larvae with 5×10^6 biofilm cells/larva of *P. lutzii* (LDR2) or *P. brasiliensis* (Pb-18) were dead. These doses induced the 100% larvae death within the observation period for both strains showing cells from biofilms are more virulent.

4. Discussion

The positive correlation between the virulence of *Candida albicans* and *Pseudomonas aeruginosa* in larvae and in the mouse infection system suggests that *G. mellonella* may provide a convenient and inexpensive model for the *in vivo* screening (22,43). In recent years, *G. mellonella* has been successfully employed in studies comparing virulence of yeasts, dimorphic fungi, and filamentous fungi (31,33,44,45), including yeast *Paracoccidioides* spp (35,36).

In the present study, we study host-pathogen interactions of *P.*

brasiliensis and *P. lutzii* in an invertebrate model, the killing of the larvae was inoculum-dependent, which correlates with data found in previous studies, although the concentrations tested were different (35,36). As demonstrated by Scorzoni et al. (36), with the concentration (5×10^6 cells/larva) of *P. brasiliensis* (Pb-18) was observed the death of the larvae in 3 days ($TD_{50\%}$). However, our strain *P. lutzii* (LDR2) with the same dose caused larval death faster (2-3 days) than the strain (Pb01-like ATCC MYA-826/ Goiania, Brazil) that induced death in 4-5 days. The survival curve profiles found in *G. mellonella* larvae shown different virulence levels of both species, also differing from the data of this study.

The discrepancy in larval death for *P. lutzii* could be related to the divergence of pathogenicity within the species as described by Molinari-Madlum et al. (19), who observed that *P. lutzii* (Pb01 and 7455) caused intense progressive peritonitis in B10.A mice, followed by a rapid dissemination to spleen, liver, lymph nodes; features were not produced by *P. brasiliensis* isolates, validating the *G. mellonella* model for infections by *Paracoccidioides* spp.

Bergin et al. (46) showed the correlation between changes in haemocyte density and fungal load and pathogenicity, the isolates highly pathogenic overcome the cellular response, leading to a decline in haemocyte numbers and an increase in yeast cells in the haemolymph. Also in our study, the reduced haemocyte density was detected in larvae infected by *P. brasiliensis* (Pb-18) or *P. lutzii* (LDR2), after 2 hours that remained at similar levels in the other periods analyzed.

The reduction in the number of haemocytes after fungal infections has been described and correlated with the mortality of *G. mellonella* caused by yeasts and fungi such as *C. tropicalis*, *C. krusei*, *Aspergillus terreus* and *Paracoccidioides* spp (32,36,40,45). Here, the haemocyte density was similar

between fungi, even with the early death of larvae infected with *P. lutzii* (LDR2). Then another virulence factor may be involved in early larvae death due to *P. lutzii* (LDR2) infection.

A major innate defense system in invertebrates is the melanization of pathogens, and this important process is controlled by the enzyme phenoloxidase (PO) that in turn is regulated in a highly elaborate manner for avoiding unnecessary production of highly toxic and reactive compounds. The proPO-activating system (proPO system) is triggered by the presence of compounds of microbial origins, such as β -1,3-glucans, which ensures that the system will become active in the presence of potential pathogens (42). We observed that the high levels of melanization at 4 and 12 hours post-infection can be correlated with the higher mortality rate of the larvae infected with both strains of *Paracoccidioides* spp., as demonstrated previously with *A. terreus* isolates (32).

Phagocytosis is an evolutionarily conserved cellular immune process that is used by both vertebrate and invertebrate animals for the destruction of small foreign organisms (29). Siqueira et al. (20) reported that *P. brasiliensis* was internalized by peritoneal macrophages at a higher rate (22.9%) compared to *P. lutzii* (5.58%) after 2 h of co-culture. Also, phagocytosis *in vivo* by hemocyte cells from *G. mellonella* larvae was described after 3 h of infection with this fungus, found 5% of the hemocyte cells from *G. mellonella* were able to phagocytize *P. brasiliensis* or *P. lutzii*, without differentiating the type of hemocyte involved in this reaction (36). In this study, the *in vitro* phagocytosis assay revealed (48,7%) and (42.2%) phagocytosis with *P. brasiliensis* and *P. lutzii* respectively. In addition, granular cells and plasmatocytes of *G. mellonella* larvae were able to phagocytize yeast cells of *Paracoccidioides* spp, and the granular cells showed the higher phagocytic ability

than the plasmatocytes for *P. lutzii* (LDR2). Tojo et al. (47) and Tomiotto-Pellissier et al. (38) using *in vitro* assays demonstrated that, both granular cells and plasmatocytes are involved in phagocytosis.

A wide variety of yeasts and fungi of medical importance have the ability to colonize surfaces and produce biofilms, including *Aspergillus* spp. (48,49), *Candida albicans* (50), *Coccidioides immitis* (51), *Cryptococcus neoformans* (52), *Histoplasma capsulatum* (41), *Trichosporon asahii* (53), and *P. brasiliensis* (16). In this study, both *P. brasiliensis* and *P. lutzii* (LDR2) yeast cells presented the ability to form biofilm *in vitro*. According to Sardi et al. (16), the *Paracoccidioides* spp. biofilm may be associated with an increase in the expression of adhesins and enzymes related with the spreading infection and attribute antimicrobial resistance and avoidance of host defenses.

In our *in vivo* experimental *G. mellonella* larvae infections between biofilms and planktonic cells investigations, the faster larval death with biofilms, as expected, and even faster with *P. lutzii* (LDR2) than *P. brasiliensis* were observed. These results suggest a higher virulence of *P. lutzii* (LDR2) in relation to *P. brasiliensis* (Pb18), however, the factors involved in early death by *P. lutzii* biofilms require further study. This invertebrate model with various clinical isolates of *C. albicans* (21,54), *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* (55) has been evidenced higher rates of *G. mellonella* larvae mortality with biofilms compared to planktonic cells.

In conclusion, different virulence levels of both species were observed in the survival curves and the melanization degree, and the granular cells and plasmatocytes of *G. mellonella* larvae presented ability to phagocytize this yeast cells. Both *P. brasiliensis* (Pb18) and *P. lutzii* (LDR2) yeasts can form biofilm *in vitro*

and the first study of *Paracoccidioides* spp. biofilms *in vivo* experimental infections evidenced the higher virulence of biofilm than planktonic cells, and that *P. lutzii* (LDR2) is more virulent than *P. brasiliensis* (Pb18), in *G. mellonella* larvae model. Additional studies are needed to determine the role of these biofilms *in vivo* involved in the premature death of the larvae.

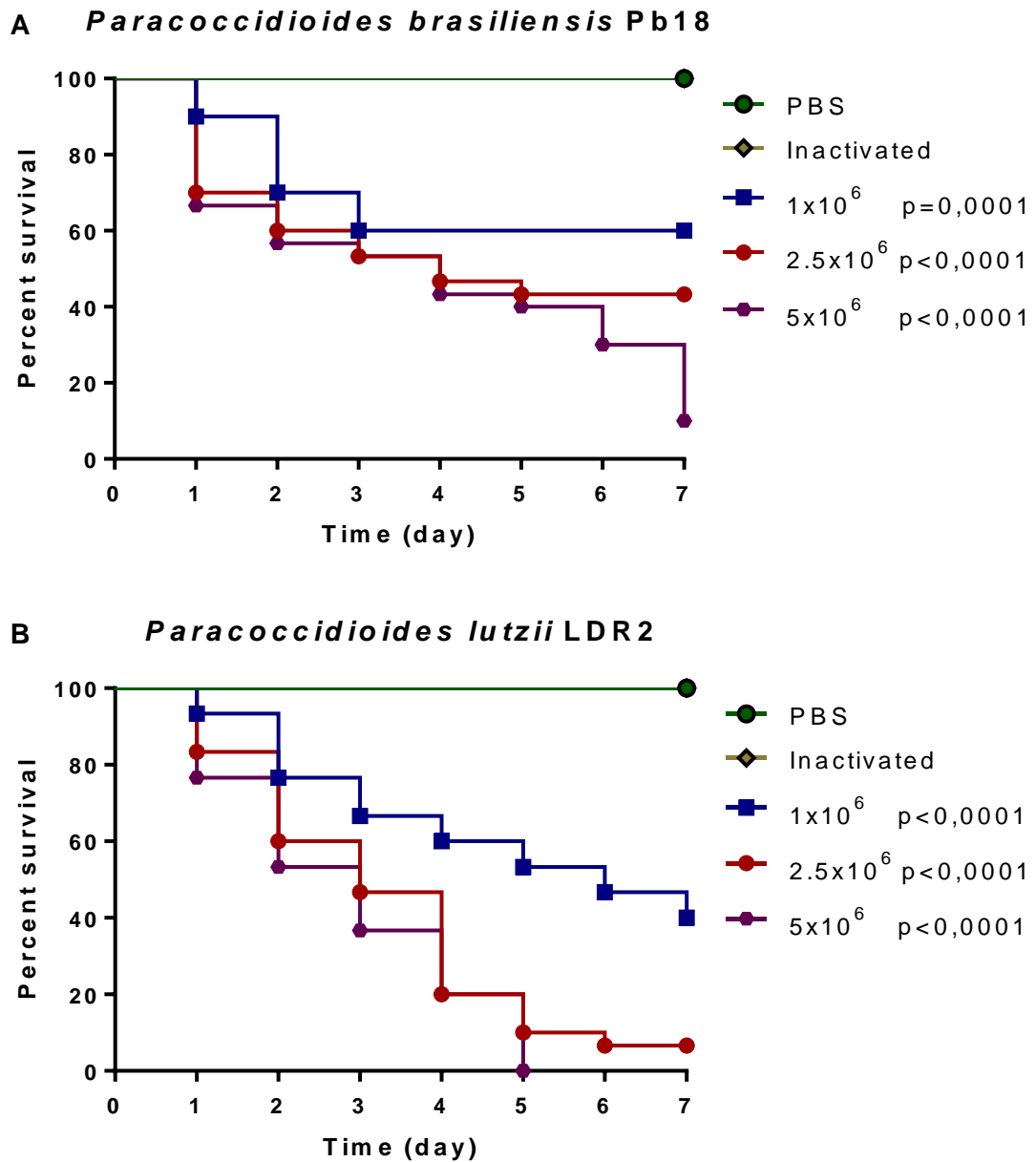


Fig. 1. Survival curves of *G. mellonella* infected with *P. brasiliensis* (Pb-18) (A) and *P. lutzii* (LDR2) (B) with three different concentrations. Statistical significance ($p<0.05$) in relation to control groups (PBS-infected larvae and yeasts heat-inactivated infected larvae).

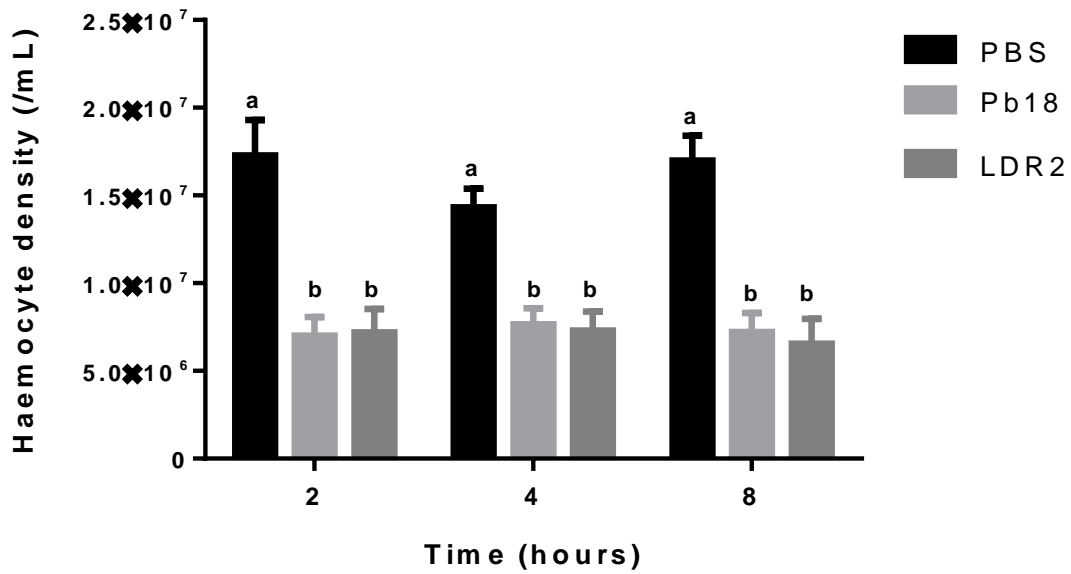


Fig. 2. Hemocyte density in *G. mellonella* larvae infected with *P. brasiliensis* (Pb-18) and *P. lutzii* (LDR2) were assessed at different times (2, 4 and 8 hours). Letter b denotes differences statistically significant ($p < 0,0001$) relative to the PBS group control (a), calculated by two-way ANOVA and Tukey's multiple comparison post test.

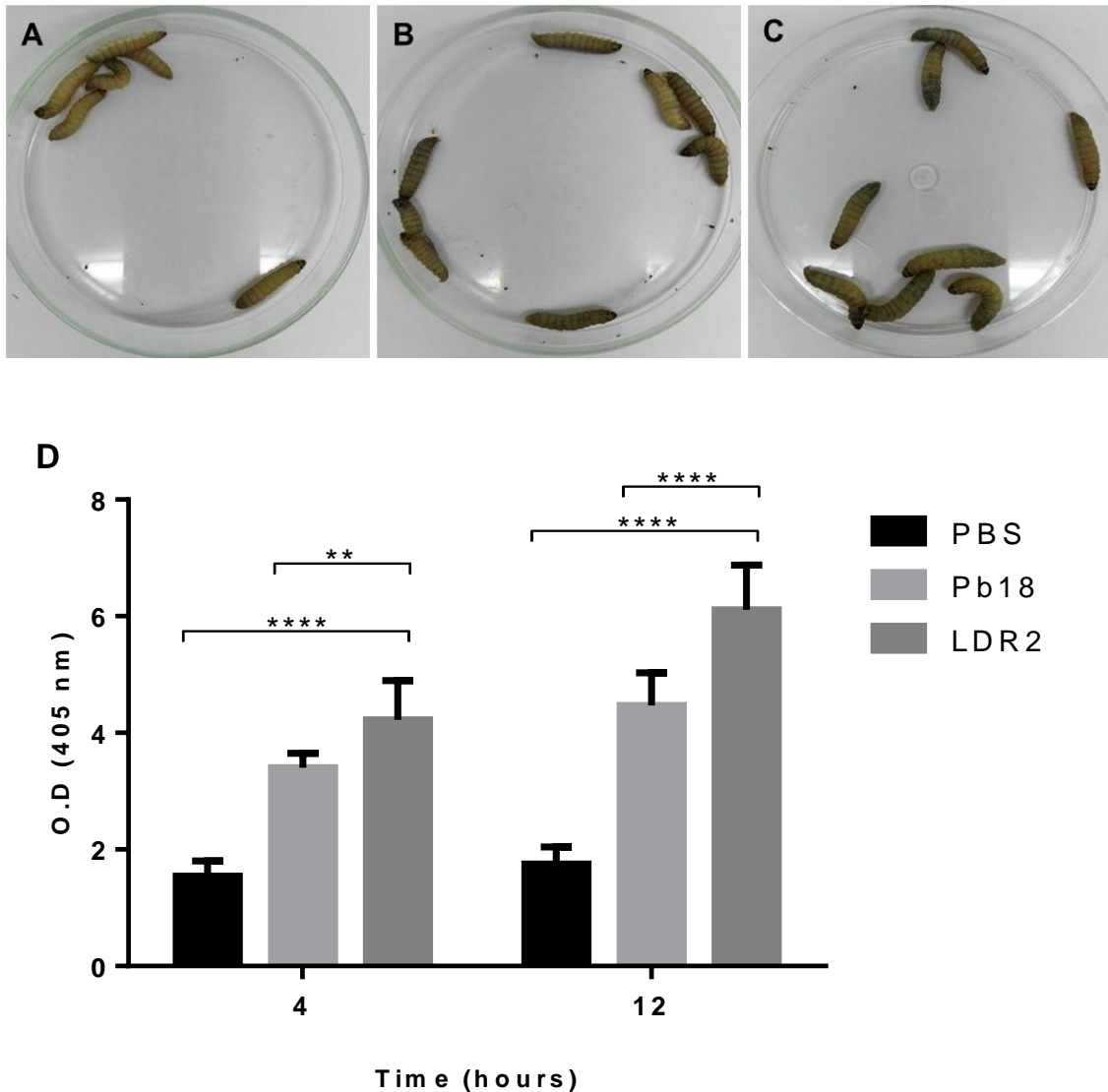


Fig. 3. Melanization Analysis. Melanization of *G. mellonella* larvae: A) Control inoculated with PBS, B) Infected with *P. brasiliensis* (Pb-18) and C) Infected with *P. lutzii* (LDR2) after 4h. D) Melanization levels determined by Optical Density (O.D) of the haemolymph of *G. mellonella* infected with 5×10^6 cells/larva of *P. brasiliensis* (Pb-18) and *P. lutzii* (LDR2) after 4 and 12 h at 35°C. The asterisks denote differences statistically significant (**** $p < 0,0001$) relative to the PBS group control and between Pb 18 and LDR2 12 h post-infection, (** $p = 0,0047$) between Pb 18 and LDR2 4 h post-infection, calculated by the two-way ANOVA and Tukey's multiple comparison post test.

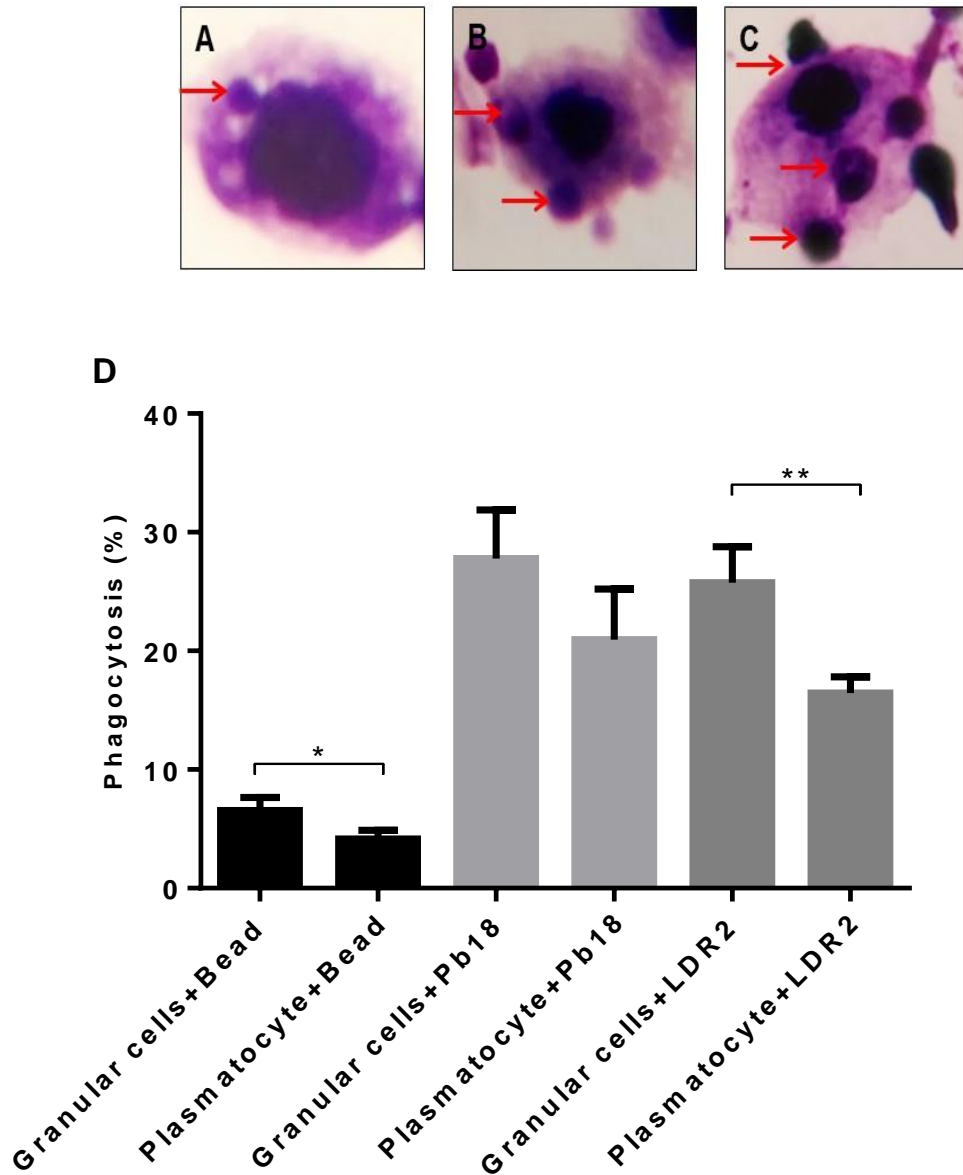


Fig. 4. Analysis of the phagocytic assay. Photomicrograph of infected hemocytes after 1-h incubation. The red arrows indicate the yeast cell within the host cell A, B) Granular cells and C) Plasmatocyte. D) Phagocytosis rate of different types of hemocytes with *P. brasiliensis* (Pb-18) and *P. lutzii* (LDR2) after 1 h of incubation at 37°C. The asterisks denote differences statistically significant (* $p=0,0415$) and (** $p=0,0100$) calculated by one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison post test.

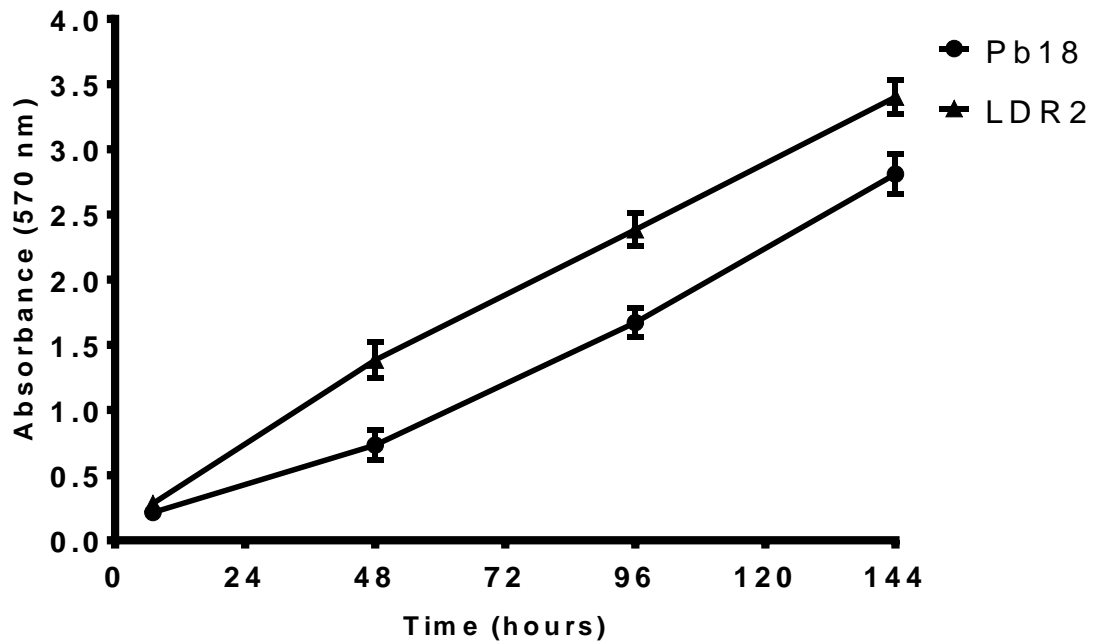


Fig. 5. Kinetics of biofilm formation by *P. brasiliensis* (Pb-18) e *P. lutzii* (LDR2) on polystyrene microtiter plates. Biofilm formation determined by crystal violet staining. Values represent the mean of three independent experiments for each strain.

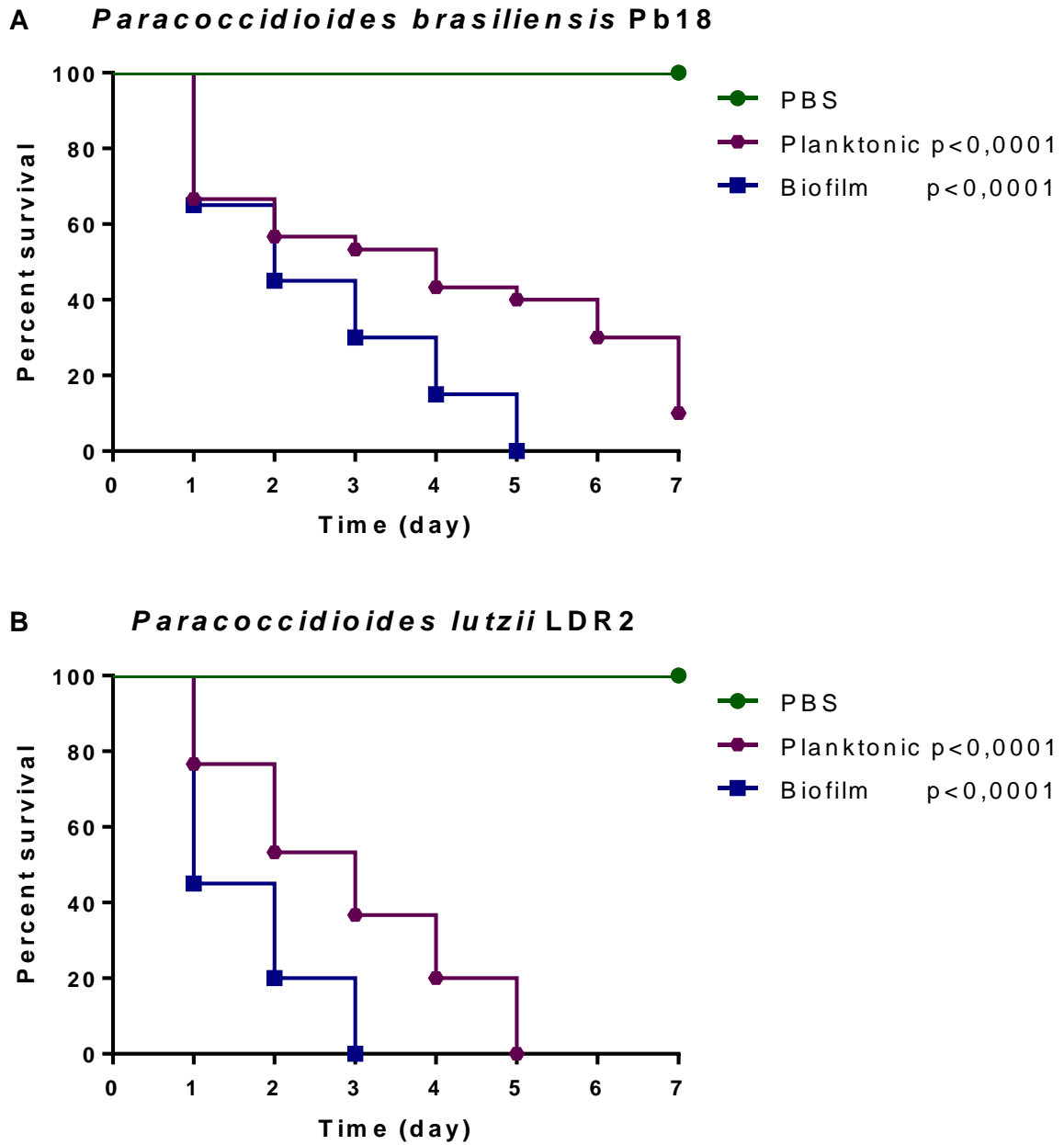


Fig. 6. Comparison of virulence from planktonic and biofilm cells of A) *P. brasiliensis* (Pb-18) and B) *P. lutzii* (LDR2) in the *G. mellonella* model. The differences were statistically significant ($p < 0.05$).

REFERENCES

1. Franco M, Montenegro MR, Mendes RP, Marques SA, Dillon NL, Mota NG da S. Paracoccidioidomycosis: A Recently Proposed Classification of Its Clinical Forms. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1987;20(2):129–32.
2. Teixeira MM, Theodoro RC, de Carvalho MJA, Fernandes L, Paes HC, Hahn RC, et al. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Mol Phylogenet Evol.* 2009;52(2):273–83.
3. Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: An update. *Clin Microbiol Rev.* 1993;6(2):89–117.
4. San-Blas G, Niño-Vega G, Iturriaga T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: Molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Med Mycol.* 2002;40(3):225–42.
5. Restrepo A, Gómez BL, Tobón A. Paracoccidioidomycosis: Latin America's own fungal disorder. *Curr Fungal Infect Rep.* 2012;6(4):303–11.
6. Coutinho ZF, Silva D da, Lazéra M, Petri V, Oliveira RM de, Sabroza PC, et al. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cad Saude Publica.* 2002;18(5):1441–54.
7. Kanetsuna F, Carbonell LM, Azuma I, Yamamura Y. Biochemical Studies on the Thermal Dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Bacteriol.* 1972;110(1):208–18.
8. San-Blas G, San-Blas F, Ormaechea E, Serrano LE. Cell wall analysis of an adenine-requiring mutant of the yeast-like form of *Paracoccidioides brasiliensis* strain IVIC Pb9. *Med Mycol.* 1977;15(3):297–303.
9. Vicentini AP, Gesztes J, Franco MF, De Souza W, De Moraes JZ, Travassos LR, et al. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. *Infect Immun.* 1994;62(4):1465–9.
10. Torres I, Hernandez O, Tamayo D, Muñoz JF, Leitão NP, García AM, et al. Inhibition of PbGP43 Expression May Suggest that gp43 is a Virulence Factor in *Paracoccidioides brasiliensis*. *PLoS One.* 2013;8(7).
11. Hernandez O, Almeida AJ, Gonzalez A, Garcia AM, Tamayo D, Cano LE, et al. A 32-Kilodalton Hydrolase Plays an Important Role in *Paracoccidioides brasiliensis* Adherence to Host Cells and Influences Pathogenicity. *Infect*

- Immun. 2010;78(12):5280–6.
12. Hernández O, Almeida AJ, Tamayo D, Torres I, Garcia AM, López A, et al. The hydrolase PbHAD32 participates in the adherence of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to epithelial lung cells. *Med Mycol.* 2012;50(5):533–7.
 13. Pereira LA, Bão SN, Barbosa MS, da Silva JLM, Felipe MSS, de Santana JM, et al. Analysis of the *Paracoccidioides brasiliensis* triosephosphate isomerase suggests the potential for adhesin function. *FEMS Yeast Res.* 2007;7(8):1381–8.
 14. Barbosa SM, Bão SN, Andreotti PF, Faria FP De, Felipe MSS, Feitosa LDS, et al. Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* Is a Cell Surface Protein Involved in Fungal Adhesion to Extracellular Matrix Proteins and Interaction with Cells. *Infect Immun.* 2006;74(1):382–9.
 15. da Silva Neto B, de Fátima da Silva J, Mendes-Giannini M, Lenzi H, de Almeida Soares C, Pereira M. The malate synthase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a linked surface protein that behaves as an anchorless adhesin. *BMC Microbiol.* 2009;9(1):272.
 16. Sardi J de CO, Pitangui N de S, Voltan AR, Braz JD, Machado MP, Fusco Almeida AM, et al. *In vitro* *Paracoccidioides brasiliensis* biofilm and gene expression of adhesins and hydrolytic enzymes. *Virulence.* 2015;6(6):642–51.
 17. Cattana ME, Tracogna MF, Marques I, Rojas F, Fernández M, de los Ángeles Sosa M, et al. *In Vivo* *Paracoccidioides* sp. Biofilm on Vascular Prosthesis. *Mycopathologia.* 2017;182(7–8):747–9.
 18. Turissini DA, Gomez OM, Teixeira MM, McEwen JG, Matute DR. Species boundaries in the human pathogen *Paracoccidioides*. *Fungal Genet Biol.* 2017;106:9–25.
 19. Molinari-Madlum EEWI, Felipe MSS, Soares CMA. Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates can be correlated to groups defined by random amplified polymorphic DNA analysis. *Med Mycol.* 1999;37(4):269–76.
 20. Siqueira IM, Fraga CLF, Amaral AC, Souza ACO, Jerônimo MS, Correa JR, et al. Distinct patterns of yeast cell morphology and host responses induced by representative strains of *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb18) and *Paracoccidioides lutzii* (Pb01). *Med Mycol.* 2016;54(2):177–88.
 21. Borghi E, Romagnoli S, Fuchs BB, Cirasola D, Perdoni F, Tosi D, et al.

- Correlation between *Candida albicans* biofilm formation and invasion of the invertebrate host *Galleria mellonella*. *Future Microbiol.* 2014;9(2):163–73.
22. Brennan M, Thomas DY, Whiteway M, Kavanagh K. Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2002;34(2):153–7.
 23. Fuchs BB, Mylonakis E. Using non-mammalian hosts to study fungal virulence and host defense. *Curr Opin Microbiol.* 2006;9(4):346–51.
 24. Mylonakis E. *Galleria mellonella* and the Study of Fungal Pathogenesis: Making the Case for Another Genetically Tractable Model Host. *Mycopathologia.* 2008;165(1):1–3.
 25. Kavanagh K, Fallon JP. *Galleria mellonella* larvae as models for studying fungal virulence. *Fungal Biol Rev.* 2010;24(1–2):79–83.
 26. Hoffmann JA. Innate immunity of insects. *Curr Opin Immunol.* 1995;7(1):4–10.
 27. Lavine MD, Strand MR. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem Mol Biol.* 2002;32(10):1295–1309.
 28. Kavanagh K, Reeves EP. Exploiting the potential of insects for *in vivo* pathogenicity testing of microbial pathogens. *FEMS Microbiol Rev.* 2004;28(1):101–12.
 29. Hillyer JF. Insect immunology and hematopoiesis. *Dev Comp Immunol.* 2016;58:102–18.
 30. Vilmos P, Kurucz E. Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. *Immunol Lett.* 1998;62(2):59–66.
 31. Reeves EP, Messina CGM, Doyle S, Kavanagh K. Correlation between Gliotoxin Production and Virulence of *Aspergillus fumigatus* in *Galleria mellonella*. *Mycopathologia.* 2004;158(1):73–9.
 32. Maurer E, Browne N, Surlis C, Jukic E, Moser P, Kavanagh K, et al. *Galleria mellonella* as a host model to study *Aspergillus terreus* virulence and amphotericin B resistance. *Virulence.* 2015;6(6):591–598.
 33. Mylonakis E, Moreno R, El JB, Idnurm A, Heitman J, Stephen B, et al. *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. *Infect Immun.* 2005;73(7):3842–3850.
 34. Coleman JJ, Muhammed M, Kasperkovitz P V., Vyas JM, Mylonakis E. *Fusarium* pathogenesis investigated using *Galleria mellonella* as a heterologous host. *Fungal Biol.* 2011;115(12):1279–1289.

35. Thomaz L, García-Rodas R, Guimarães AJ, Taborda CP, Zaragoza O, Nosanchuk JD. *Galleria mellonella* as a model host to study *Paracoccidioides lutzii* and *Histoplasma capsulatum*. *Virulence*. 2013;4(2):139–146.
36. Scorzoni L, de Paula e Silva ACA, Singulani J de L, Leite FS, de Oliveira HC, Moraes da Silva RA, et al. Comparison of virulence between *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii* using *Galleria mellonella* as a host model. *Virulence*. 2015;6(8):766–776.
37. Takayama A, Itano EN, Sano A, Ono MA, Kamei K. An atypical *Paracoccidioides brasiliensis* clinical isolate based on multiple gene analysis. *Med Mycol*. 2010;48(1):64–72.
38. Tomiotto-Pellissier F, Cataneo AHD, Orsini TM, Thomazelli APF dos S, Dalevedo GA, de Oliveira AG, et al. *Galleria mellonella* hemocytes: A novel phagocytic assay for *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *J Microbiol Methods*. 2016;131:45–50.
39. Fuchs BB, O'Brien E, El Khoury JB, Mylonakis E. Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. *Virulence*. 2010;1(6):475–82.
40. Scorzoni L, de Lucas MP, Mesa-Arango AC, Fusco-Almeida AM, Lozano E, Cuenca-Estrella M, et al. Antifungal Efficacy during *Candida krusei* Infection in Non-Conventional Models Correlates with the Yeast *In Vitro* Susceptibility Profile. *PLoS One*. 2013;8(3):e60047.
41. Brilhante RSN, de Lima RAC, Marques FJ d. F, Silva NF, Caetano EP, Castelo-Branco D d. SCM, et al. *Histoplasma capsulatum* in planktonic and biofilm forms: *in vitro* susceptibility to amphotericin B, itraconazole and farnesol. *J Med Microbiol*. 2015;64(4):394–399.
42. Cerenius L, Soderhall K. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunol Rev*. 2004;198(1):116–126.
43. Jander G, Rahme LG, Ausubel FM. Positive Correlation between Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* Mutants in Mice and Insects. *J Bacteriol*. 2000;182(13):3843–3845.
44. Cotter G, Doyle S, Kavanagh K. Development of an insect model for the *in vivo* pathogenicity testing of yeasts. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2000;27(2):163–169.
45. Mesa-Arango AC, Forastiero A, Bernal-Martínez L, Cuenca-Estrella M, Mellado

- E, Zaragoza O. The non-mammalian host *Galleria mellonella* can be used to study the virulence of the fungal pathogen *Candida tropicalis* and the efficacy of antifungal drugs during infection by this pathogenic yeast. *Med Mycol.* 2013;51(5):461–472.
46. Bergin D, Brennan M, Kavanagh K. Fluctuations in haemocyte density and microbial load may be used as indicators of fungal pathogenicity in larvae of *Galleria mellonella*. *Microbes Infect.* 2003;5(15):1389–1395.
 47. Tojo S, Naganuma F, Arakawa K, Yokoo S. Involvement of both granular cells and plasmatocytes in phagocytic reactions in the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *J Insect Physiol.* 2000;46(7):1129–35.
 48. Loussert C, Schmitt C, Prevost M-C, Balloy V, Fadel E, Philippe B, et al. *In vivo* biofilm composition of *Aspergillus fumigatus*. *Cell Microbiol.* 2010;12(3):405–410.
 49. Ramage G, Rajendran R, Gutierrez-Correa M, Jones B, Williams C. *Aspergillus* biofilms: clinical and industrial significance. *FEMS Microbiol Lett.* 2011;324(2):89–97.
 50. Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: Development, Architecture, and Drug Resistance. *J Bacteriol.* 2001;183(18):5385–5394.
 51. Davis LE. Biofilm on Ventriculo-Peritoneal Shunt Tubing as a Cause of Treatment Failure in Coccidioidal Meningitis. *Emerg Infect Dis.* 2002;8(4):376–379.
 52. Martinez LR, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* Biofilm Formation Depends on Surface Support and Carbon Source and Reduces Fungal Cell Susceptibility to Heat, Cold, and UV Light. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(14):4592–4601.
 53. Di Bonaventura G, Pompilio A, Picciani C, Iezzi M, D'Antonio D, Piccolomini R. Biofilm Formation by the Emerging Fungal Pathogen *Trichosporon asahii*: Development, Architecture, and Antifungal Resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(10):3269–76.
 54. Cirasola D, Sciota R, Vizzini L, Ricucci V, Morace G, Borghi E. Experimental biofilm-related *Candida* infections. *Future Microbiol.* 2013;8(6):799–805.
 55. Benaducci T, Sardi J de CO, Lourencetti NMS, Scorzoni L, Gullo FP, Rossi SA, et al. Virulence of *Cryptococcus* sp. Biofilms *In Vitro* and *In Vivo* using *Galleria*

mellonella as an Alternative Model. Front Microbiol. 2016;7(MAR):1–10.

CONCLUSÕES

As células de levedura de *P. lutzii* (LDR2) induzem menor tempo de sobrevivência das larvas de *G. mellonella* infectadas do que *P. brasiliensis* (Pb18).

P. brasiliensis e *P. lutzii* apresentam a capacidade de induzir decréscimo na densidade de hemócitos em larvas de *G. mellonella* infectadas.

P. lutzii induz maior intensidade de melanização que a infecção por *P. brasiliensis* em larvas de *G. mellonella*.

As células granulares e os plasmatócitos das larvas *G. mellonella* apresentam a capacidade de fagocitar tanto as leveduras de *P. brasiliensis* como de *P. lutzii*.

Demostramos a nova espécie *P. lutzii* apresenta habilidade para formar biofilme *in vitro*.

As infecções *in vivo* de células biofilme de *P. brasiliensis* e *P. lutzii* induzem morte precoce nas larvas de *G. mellonella*, sugerindo apresentar maior virulência do que as células planctônicas.

O menor tempo de sobrevivência de larvas de *G. mellonella* infectadas com as formas planctônicas ou biofilme de *P. lutzii*, sugere maior potencial patogênico de *P. lutzii* em relação a *P. brasiliensis*.