



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

PATRÍCIA CANTERI DE SOUZA

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DE  
ANTICORPOS IgY CONTRA A PERMEASE DE FERRO Ftr1  
DE *Candida albicans*, E USO DE INSETOS COMO  
MODELOS DE INFECÇÕES FÚNGICAS**

---

Londrina  
2021

PATRÍCIA CANTERI DE SOUZA

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DE  
ANTICORPOS IgY CONTRA A PERMEASE DE FERRO Ftr1  
DE *Candida albicans*, E USO DE INSETOS COMO  
MODELOS DE INFECÇÕES FÚNGICAS**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Sergio Couto de Almeida

Coorientador: Prof. Dr. Emerson José Venancio

Londrinao  
2021

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

de Souza, Patricia Canteri.

Produção e caracterização biológica de anticorpos IgY contra a permease de ferro Ftr1 de *Candida albicans*, e uso de insetos como modelos de infecções fúngicas / Patricia Canteri de Souza. - Londrina, 2021.  
130 f. : il.

Orientador: Ricardo Sérgio Couto Almeida.

Coorientador: Emerson José Venancio.

Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2021.

Inclui bibliografia.

1. Imunoterapia - Tese. 2. Candidíase - Tese. 3. Imunoglobulina Y - Tese. 4. Mini-hospedeiros - Tese. I. Almeida, Ricardo Sérgio Couto. II. Venancio, Emerson José. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. IV. Título.

CDU 574

PATRÍCIA CANTERI DE SOUZA

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DE  
ANTICORPOS IgY CONTRA A PERMEASE DE FERRO Ftr1  
DE *Candida albicans*, E USO DE INSETOS COMO  
MODELOS DE INFECÇÕES FÚNGICAS**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Microbiologia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Profa. Dra. Sueli Fumie Yamada Ogatta  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Wander Rogério Pavanelli  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Fábio Goulart de Andrade  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Renata Katsuko T. Kobayashi)  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 31 de março de 2021.

Dedico este trabalho ao meu marido e ao meu pai.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, prof. Dr. Ricardo Sergio C. de Almeida, que idealizou esse lindo projeto, sempre otimista e procurando me incentivar, ajudar e ensinar. Também ao meu co-orientador, prof. Dr. Emerson José Venancio, pelos seus valiosos ensinamentos que foram essenciais para a execução dos experimentos. Ao prof. Dr. Admilton G. de Oliveira Júnior, uma vez que suas contribuições foram igualmente importantes para a concretização do trabalho.

À minha banca examinadora que, com certeza, com sua experiência, irão somar positivamente para a finalização desse trabalho. Também aos professores Dr. Luciano Aparecido Panagio, Dr. Duncan Wilson, Dr. Rubens Cecchini, e à atual coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Dra. Lucy M. Yamauchi Lioni, que contribuíram, mesmo que de forma indireta, para a realização dessa proposta.

Às minhas amigas e colegas de laboratório Juliana G. Gameiro, Patrícia M. L. Pereira, Alana E. do Nascimento Corrêa, Carla C. Caloni, Carolina G. Mesas, Maria Luiza Abreu, Kamila Damasco, Miriele Caroline da Silva, e Ana Maria Heinzen, Paola B. Singi e Aline Ratuchne que auxiliaram, de alguma forma, na confecção dos artigos, ou em experimentos à parte. Agradeço em geral a todos os meus colegas/amigos de laboratório, mesmo os que não foram citados aqui, sabem o quanto são importantes para mim, pois passamos juntos pelas mesmas situações, sempre apoiando uns aos outros.

À Universidade Estadual de Londrina, uma instituição grandiosa que oferece excelentes oportunidades a seus alunos. Também aos técnicos dos laboratórios por contribuírem no desenvolvimento de nossas pesquisas. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior por conceder a bolsa de doutorado.

À minha família, meu alicerce, que foi essencial para o meu desenvolvimento pessoal. Em especial agradeço ao meu marido que sempre me amparou, com muito amor e não permitiu que os sentimentos angustiantes, que surgem por conta das adversidades, permanecessem por muito tempo. Além disso, agradeço aos meus pais por todo o carinho e amor que tiveram por mim em toda a minha trajetória.

Por fim, agradeço à Deus que permitiu que tudo isso acontecesse.

**Não é sobre chegar ao topo do mundo e saber que venceu, é sobre escalar e sentir que o caminho te fortaleceu (Ana Vilela).**

DE SOUZA, Patrícia Canteri. **Produção e caracterização biológica de anticorpos IgY contra a permease de ferro Ftr1 de *Candida albicans*, e uso de insetos como modelos de infecções fúngicas**. 2021. 130 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina.

## RESUMO

O ferro é essencial para a funcionalidade dos processos biológicos, no entanto, o excesso de ferro é tóxico. Em humanos, ante sua toxicidade, esse metal é encontrado acoplado às proteínas, como a transferrina, que transporta o ferro para os tecidos, e a ferritina, molécula de armazenamento intracelular desse íon. Durante uma infecção, os microrganismos adquirem ferro do hospedeiro para sobreviver. *Candida albicans*, um dos principais patógenos responsáveis por doenças fúngicas graves, contém uma proteína transmembrana, a permease de ferro de alta afinidade Ftr1, que é utilizada para obter o ferro da ferritina, da transferrina, e de quelantes de ferro sintetizados por outros microrganismos. Na busca por novos mecanismos para conter a multiplicação fúngica, anticorpos são aplicáveis desde que é possível produzir anticorpos específicos contra estruturas microbianas. Neste contexto, o objetivo do trabalho foi produzir e realizar a caracterização biológica de anticorpos de gemas de ovos (IgY) contra a permease de ferro Ftr1 de *C. albicans*. Um peptídeo derivado de Ftr1 foi sintetizado e utilizado para imunizar galinhas poedeiras sete vezes. Os ovos das galinhas pré-imunizadas e após 3<sup>a</sup>, 5<sup>a</sup>, e 7<sup>a</sup> imunizações foram coletados. Anticorpos IgY foram extraídos das gemas desses ovos pela técnica de precipitação por sulfato de amônio. Posteriormente, foram purificados por cromatografia, e as amostras contendo proteínas foram analisadas por eletroforese. Em seguida, foi realizado um ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) para averiguar a reatividade das imunoglobulinas. Também foi realizado um ELISA de avidéz para estabelecer a força da ligação do antígeno com os anticorpos. A atividade antimicrobiana *in vitro* foi estabelecida por microdiluição em meio com diferentes concentrações de ferro. Adicionalmente, a concentração fungicida mínima foi determinada. Testes *in vivo* para averiguar o efeito antifúngico das imunoglobulinas foram realizados em larvas da mariposa *Galleria mellonella*, um modelo alternativo de infecção sistêmica. Em relação aos resultados, a produção, extração e purificação, se procederam com sucesso, sendo possível observar a presença das bandas correspondentes às cadeias pesadas e leves da IgY no gel de eletroforese. Além disso, após purificação eliminaram-se os contaminantes. A imunoglobulina foi reativa ao antígeno, e a avidéz aumentou gradativamente, sendo elevada após a 7<sup>a</sup> imunização. A IgY extraída após a 7<sup>a</sup> imunização inibiu o crescimento de *C. albicans*, da  $\Delta ftr1$ , além de exibir ação candidacida. Outrossim, a sobrevivência de larvas de *G. mellonella* infectadas e tratada com os anticorpos foi 90% maior do que o grupo controle, o qual não recebeu tratamento. Portanto, esse anticorpo mostrou ter atividade contra *C. albicans*, sendo capaz de aumentar a sobrevivência de larvas infectadas com a levedura. Dado o crescente uso de hospedeiros alternativos na pesquisa, uma revisão a respeito do uso do besouro *Tenebrio molitor* como hospedeiro invertebrado para o estudo de infecções fúngicas também foi escrita. Nessa revisão foi constatado que *T. molitor* representa um modelo em ascensão, que pode ser utilizado no estudo da virulência fúngica, dos efeitos das micotoxinas, das respostas imunológicas do hospedeiro à infecção por fungos, e da ação de antifúngicos.

**Palavras-chave:** imunoterapia; antimicrobiano; imunoglobulina Y; via reductiva; candidíase; mini-hospedeiros.

DE SOUZA, Patrícia Canteri. **Production and biological characterization of IgY antibodies against Ftr1 iron permease of *Candida albicans*, and use of insects as fungal infections models.** 2021. 130 p. Thesis (PhD in Microbiology) - State University of Londrina.

## ABSTRACT

Iron is essential for the functionality of biological processes, however, excess iron is toxic. In humans, due to its toxicity, this metal is found coupled to proteins, such as transferrin, which transports iron to tissues, and ferritin, an intracellular storage molecule of this ion. During an infection, microorganisms obtain iron from the host to survive. *Candida albicans*, one of the main pathogens responsible for serious fungal diseases, contains a transmembrane protein, high-affinity iron permease Ftr1, which is used to obtain iron from ferritin, transferrin, and iron chelators synthesized by other microorganisms. In the search for new mechanisms to contain fungal multiplication, antibodies are applicable since it is possible to produce specific antibodies against a microbial structure. In this context, the work objective was to produce and perform the biological characterization of egg yolk antibodies (IgY) against the Ftr1 iron permease of *C. albicans*. A peptide derived from Ftr1 was synthesized and used to immunize laying hens seven times. Eggs from pre-immunized chickens and post-3rd, 5th, and 7th immunizations were collected. IgY antibodies were extracted from egg yolks by the ammonium sulfate precipitation technique. Subsequently, they were purified by chromatography, and samples containing proteins were analyzed by electrophoresis. Then, an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was performed to check the reactivity of immunoglobulins. An avidity ELISA was also performed to establish the binding strength of the antigen with the antibodies. The antimicrobial activity *in vitro* was carried out by microdilution in a medium with different concentrations of iron. Also, the minimum fungicidal concentration was provided. *In vivo* tests to determine the antifungal effect of immunoglobulins were performed on larvae of the moth *Galleria mellonella*, an alternative model of systemic infection. Regarding the results, the production, extraction, and purification occurred successfully, being possible to observe the presence of bands corresponding to the heavy and light IgY chains in the electrophoresis gel. Besides, after purification, contaminants were removed. The immunoglobulin was reactive to the antigen and the avidity gradually increased, being elevated after the 7th immunization. IgY extracted after the 7th immunization inhibited the growth of *C. albicans*,  $\Delta ftr1$ , and also showed candidacidal action. Furthermore, the survival of infected *G. mellonella* larvae and treated with antibodies was 90% higher than the control group, which did not receive treatment. Therefore, this antibody has been shown to have activity against *C. albicans*, being able to increase the survival of larvae infected with yeast. Given the increasing use of alternative hosts in research, a review of the use of the *Tenebrio molitor* beetle as an invertebrate host for the study of fungal infections has also been written. In this review, it was discovered that *T. molitor* represents an emerging model that can be used to study fungal virulence, the effects of mycotoxins, the host's immune responses to fungal infection, and the action of antifungals.

**Keywords:** immunotherapy; antimicrobial; immunoglobulin Y; reductive pathway candidiasis; mini-hosts.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Referencial Bibliográfico

- Figura 1** – Estrutura da permease de ferro de alta afinidade, Ftr1, de *C. albicans* de acordo com Ziegler e colaboradores (2011).....27
- Figura 2** – Representação esquemática dos mecanismos de absorção de ferro por *C. albicans* de acordo com Fourie e colaboradores (2018), e com Gerwien e colaboradores (2018). .....39
- Figura 3** – Estruturas básicas da IgY e IgG de acordo com Lee e colaboradores (2017). .....32

### Artigo Científico nº 1

- Figura 1** – Cronograma de imunizações e coleta de ovos de poedeiras inoculadas com um peptídeo de *C. albicans* derivado da permease de alta afinidade Ftr1 .....51
- Figura 2** – Purificação da IgY anti-Ftr1 por cromatografia de exclusão molecular (**A**). Análise eletroforética usando SDS-PAGE a 10% e coloração com azul de Coomassie brilhante (**B**) .....59
- Figura 3** – Níveis da IgY anti-Ftr1 (**A**) e índices de avidéz (**B**) de anticorpos produzidos por galinhas poedeiras imunizadas com 200 µg do PFCA conjugado com KLH .....61
- Figura 4** – Curva de sobrevivência de larvas de *G. mellonella* infectadas com *C. albicans* SC5314 e tratadas com IgY PC pré-imune (**A**) ou IgY PC anti-Ftr1 (**B**) .....64
- Figura 5** – O modelo proposto para bloquear a absorção de ferro por *C. albicans*, ligando IgY à permease de ferro Ftr1 .....69

### Artigo Científico nº 2

- Figure 1** – Lifecycle of the beetle *Tenebrio molitor*: .....82
- Figure 2** – Schematic diagram of *T. molitor* immune response .....83
- Figure 3** – Plasmatocyte (A) and granulocyte (B) phagocytizing *Candida albicans* .....84
- Figure 4** – *T. molitor* larva infected with 10<sup>6</sup> *C. albicans* yeasts .....87

## LISTA DE TABELAS

### Artigo Científico nº 1

- Table 1** – Comparação entre a sequência peptídica do antígeno (KTGG**DASE**NGSG) derivado da Ftr1 de *C. albicans* SC5314 com proteínas de outros microrganismos. ....57
- Table 2** – Concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima da IgY anti-Ftr1 e da IgY pré-imune. ....62

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                                     |   |
|-------------------------------------|---|
| °C                                  | Grau Celsius  |
| µg                                  | Micrograma  |
| µL                                  | Microlitro  |
| <b>BLAST</b>                        | Ferramenta básica de pesquisa de alinhamento local              |
| <b>BPS</b>                          | Ácido batofenantrolina dissulfônico                             |
| <b>BSA</b>                          | Albumina do soro bovino   |
| <b>CFEM</b>                         | Comum na membrana extracelular fúngica                          |
| <b>CFM</b>                          | Concentração fungicida mínima                                   |
| <b>CIM<sub>50</sub></b>             | Concentração mínima que inibe 50% do crescimento microbiano     |
| <b>CIM<sub>90</sub></b>             | Concentração mínima que inibe 90% do crescimento microbiano     |
| <b>CH</b>                           | Região constante da cadeia pesada                               |
| <b>CL</b>                           | Região constante da cadeia leve                                 |
| <b>CO<sub>2</sub></b>               | Gás carbônico   |
| <b>DNA</b>                          | Ácido desoxirribonucleico                                       |
| <b>DO</b>                           | Densidade óptica  |
| <b>ELISA</b>                        | Ensaio de imun absorção enzimática                              |
| <b>FA</b>                           | Aflatoxina  |
| <b>Fab</b>                          | Fragmente de ligação ao antígeno                                |
| <b>FBS</b>                          | Soro fetal bovino   |
| <b>Fc</b>                           | Fragmente cristalizável   |
| <b>Fe<sup>+2</sup></b>              | Ferro ferroso   |
| <b>Fe<sup>+3</sup></b>              | Ferro férrico   |
| <b>g/L</b>                          | Gramas por litro  |
| <b>KCl</b>                          | Cloreto de potássio   |
| <b>kDa</b>                          | Quilodalton   |
| <b>Kg</b>                           | Quilograma  |
| <b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b> | Fosfato monopotássico   |
| <b>KLH</b>                          | Hemocianina da lapa <i>Megathura crenulata</i> (Keyhole limpet) |
| <b>H</b>                            | Hora  |
| <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>   | Peróxido de hidrogênio  |
| <b>IgE</b>                          | Imunoglobulina E  |
| <b>IgG</b>                          | Imunoglobulina G  |

|                                      |   |
|--------------------------------------|---|
| <b>IgY</b>                           | Imunoglobulina Y  |
| <b>IFN-<math>\gamma</math></b>       | Interferon gama   |
| <b>IL</b>                            | Interleucina  |
| <b>Imd</b>                           | Via da imunodeficiência   |
| <b>M</b>                             | Molaridade  |
| <b>mg</b>                            | Miligrama   |
| <b>Min</b>                           | Minuto  |
| <b>mL</b>                            | Mililitro   |
| <b>mM</b>                            | Milimolar   |
| <b>N</b>                             | Normalidade   |
| <b>NaCl</b>                          | Cloreto de sódio  |
| <b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b> | Fosfato dissódico   |
| <b>NGAL</b>                          | Lipocalina associada a neutrófilos gelatinase                           |
| <b>nm</b>                            | Nanometro   |
| <b>O<sub>2</sub></b>                 | Oxigênio  |
| <b>OH<sup>-</sup></b>                | Hidroxila   |
| <b>OH<sup>•</sup></b>                | Radical hidroxila   |
| <b>PAMs</b>                          | Peptídeos com atividade antimicrobiana                                  |
| <b>PFCA</b>                          | Peptídeo derivado da Ftr1 de <i>Candida albicans</i>                    |
| <b>PBS</b>                           | Tampão fosfato-salina   |
| <b>PBS-T</b>                         | Tampão fosfato-salina acrescido de tween                                |
| <b>PC</b>                            | Purificado e concentrado  |
| <b>pH</b>                            | Potencial de hidrogênio   |
| <b>PO</b>                            | Fenoloxidase  |
| <b>proPO</b>                         | Profenoloxidase   |
| <b>RNA</b>                           | Ácido ribonucleico  |
| <b>ROS</b>                           | Espécies reativas de oxigênio   |
| <b>SDS-PAGE</b>                      | Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio |
| <b>SIDA</b>                          | Síndrome da Imunodeficiência Adquirida                                  |
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b>       | Fator de necrose tumoral alfa   |
| <b>UEL</b>                           | Universidade Estadual de Londrina                                       |
| <b>V</b>                             | Volume  |
| <b>VH</b>                            | Região variável da cadeia pesada  |
| <b>VL</b>                            | Região variável da cadeia leve  |

**YNB** Meio de cultura nitrogênio levedura base  
**YPD** Meio de cultura extrato de levedura, dextrose e peptona

## SUMÁRIO

|          |   |     |
|----------|---|-----|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO</b> .....   | 15  |
| <b>2</b> | <b>REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO</b> .....  | 17  |
| 2.1      | A IMPORTÂNCIA DO FERRO NOS SISTEMAS BIOLÓGICOS.....                                 | 17  |
| 2.2      | O FERRO NO ORGANISMO HUMANO.....  | 18  |
| 2.2.1    | Distribuição do Ferro .....   | 18  |
| 2.2.2    | Homeostase do Ferro no Organismo e Imunidade Nutricional .....                      | 20  |
| 2.3      | <i>CANDIDA ALBICANS</i> : CANDIDIASE E FATORES DE VIRULÊNCIA.....                   | 23  |
| 2.4      | OBTENÇÃO DE FERRO POR <i>CANDIDA ALBICANS</i> DURANTE PROCESSOS<br>INFECCIOSOS..... | 25  |
| 2.4.1    | Aquisição do Ferro.....   | 25  |
| 2.4.2    | Regulação da Captação do Ferro.....   | 30  |
| 2.5      | O USO DE IMUNOGLOBULINA Y EM IMUNOTERAPIAS .....                                    | 31  |
| 2.5.1    | A Imunoglobulina Y.....   | 31  |
| 2.5.2    | IgY na Imunoterapia Contra <i>C. albicans</i> .....                                 | 33  |
| 2.6      | HOSPEDEIROS ALTERNATIVOS EM ESTUDOS DE INFECÇÕES POR <i>CANDIDA</i> .....           | 36  |
| 2.6.1    | O Uso de Insetos como Modelos Alternativos .....                                    | 36  |
| 2.6.2    | <i>Galleria mellonella</i> .....  | 39  |
| 2.6.3    | <i>Tenebrio molitor</i> .....   | 41  |
| <b>3</b> | <b>OBJETIVOS</b> .....  | 44  |
| 3.1      | OBJETIVO GERAL .....  | 44  |
| 3.2      | OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....  | 44  |
| <b>4</b> | <b>ARTIGO CIENTÍFICO Nº 1</b> .....   | 45  |
| <b>5</b> | <b>ARTIGO CIENTÍFICO Nº 2</b> .....   | 78  |
| <b>6</b> | <b>CONCLUSÃO</b> .....  | 106 |
|          | <b>REFERÊNCIAS</b> .....  | 107 |
|          | <b>ANEXO</b> .....  | 130 |

## 1 INTRODUÇÃO

O ferro é um metal de transição encontrado em praticamente todos os seres vivos e cumpre numerosas e variadas funções biológicas. Sua forma reduzida,  $Fe^{2+}$ , em grandes concentrações, pode reagir com o oxigênio e formar espécies reativas de oxigênio (ROS), que são tóxicas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1984). Para evitar seus efeitos danosos e restringir seu acesso aos patógenos invasores, o ferro é encontrado acoplado a proteínas (BEINERT; HOLM; MÜNCK, 1997; GANZ; NEMETH, 2015; NAIRZ; WEISS, 2020). O corpo humano carrega esse metal em várias proteínas, sendo em maior quantidade na hemoglobina, responsável pelo transporte de oxigênio (D' ALESSANDRO *et al.*, 2017), na ferritina, encarregado do armazenamento de ferro intracelular (HARRISON; AROSIO, 1996), e na transferrina, responsável pelo transporte do ferro para os tecidos (PIETRANGELO, 2002).

Os microrganismos patogênicos, ao longo da evolução, desenvolveram diversos mecanismos para adquirir ferro do hospedeiro e conseguir se estabelecer no tecido infectado (CAZA; KRONSTAD, 2013; FOURIE *et al.*, 2018). Nesse contexto, é importante conhecer esses mecanismos ante a finalidade de elaborar estratégias para bloquear a captação de ferro de fungos patogênicos. Nas últimas décadas, *Candida* vem sendo o segundo gênero de patógenos fúngicos mais comum, responsável pela maioria dos casos de doenças fúngicas graves, em escala global, estando atrás apenas de *Aspergillus*. Outrossim, *Candida albicans* é o principal agente responsável por doenças nas mucosas (BONGOMIN *et al.*, 2017).

Uma das formas de adquirir ferro por *C. albicans* é por meio da via redutora, sendo que, uma proteína de suma importância dessa via é a permease de ferro de alta afinidade Ftr1 (ALMEIDA; WILSON; HUBE, 2009; RAMANAN; WANG, 2000). Através da via redutora o fungo obtém ferro da ferritina (ALMEIDA *et al.*, 2008) da transferrina (KNIGHT *et al.*, 2005) e de quelantes de ferro produzidos por outros microrganismos, denominados de sideróforos (HU *et al.*, 2002). Enquanto muitas das proteínas responsáveis pela captação de ferro em *C. albicans* não interferem na patogenicidade do fungo, por mecanismos compensatórios, a Ftr1 é essencial para a manutenção da sua virulência (RAMANAN & WANG, 2000; ALMEIDA *et al.*, 2008). Por isso, a Ftr1 pode ser alvo para a produção de novos compostos antifúngicos.

Nesse sentido, as terapias utilizando anticorpos são aplicáveis, uma vez que é possível produzir anticorpos específicos contra determinadas estruturas microbianas (ZHANG, 2003). A utilização de anticorpos advindos de aves na imunoterapia tem cada vez mais ganhado espaço (LEIVA *et al.*, 2020). As imunoglobulinas Y (IgY), anticorpos produzidos por frangos, são funcionalmente semelhantes às imunoglobulinas G (IgG) de mamíferos (TAYLOR; SUTTON; CALVERT, 2010). Elas podem ser extraídas das gemas dos ovos de galinhas poedeiras, não sendo necessário a obtenção através do sangue, como acontece com os mamíferos. Portanto, reduz-se a dor e o sofrimento dos animais (SCHADE *et al.*, 2005). Além disso, as diferenças estruturais da IgY com a IgG de mamíferos permitem seu uso seguro por não desencadear os mesmos processos imunológicos que a IgG no corpo humano (DIAS DA SILVA; TAMBOURG, 2010).

Igualmente, visando o bem-estar animal e a redução do número de animais sencientes na pesquisa, os insetos vêm sendo utilizados como hospedeiros alternativos para o estudo de infecções fúngicas (TREVIJANO-CONTADOR; ZARAGOZA, 2014). Nesse contexto, a mariposa *Galleria mellonella* tem seu uso consolidado, enquanto que o besouro *Tenebrio molitor* é um modelo em ascensão (DE SOUZA, *et al.*, 2018; JEMEL *et al.*, 2020; SINGKUM *et al.*, 2019). Por conseguinte, esse estudo buscou a produção de anticorpos IgY contra a permease de ferro Ftr1 de *C. albicans*. Testes *in vivo*, para avaliar a eficácia antifúngica dos anticorpos produzidos, foram realizados no modelo de infecção sistêmica com larvas de *G. mellonella*. Ademais, uma revisão bibliográfica foi publicada a respeito do potencial uso de *T. molitor* no estudo de infecções fúngicas.

## 2 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

### 2.1 A IMPORTÂNCIA DO FERRO NOS SISTEMAS BIOLÓGICOS

O ferro é um micronutriente essencial para a manutenção da vida dos organismos, com exceção da bactéria *Borrelia burgdorferi*, agente causadora da doença de Lyme (POSEY; GHERADINI 2000). O ferro é encontrado em várias proteínas, incluindo em grupos heme e aglomerados de ferro-enxofre (BEINERT; HOLM; MÜNCK, 1997). Essas proteínas são importantes em processos biológicos englobando o transporte de oxigênio, a respiração celular, o metabolismo e a síntese de DNA (WELCH; VAN EDEN; AUST, 2001). Os dois estados de oxidação do ferro, ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) e férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ), conferem a este metal um caráter químico que permite seu envolvimento em importantes reações enzimáticas, nas quais a transferência de elétrons é essencial (PHILPOTT, 2006).

A forma oxidada do ferro ( $\text{Fe}^{3+}$ ) é muito insolúvel em água de pH neutro. Por esse motivo é inacessível para a maioria dos microrganismos (ANDREWS; ROBINSON; RODRÍGUEZ-QUIÑONES, 2003). Por outro lado, sua forma reduzida, o  $\text{Fe}^{2+}$ , é solúvel e, portanto, biodisponível. Contudo, pode ser tóxica em excesso pelo fato de reagir com o oxigênio e formar ROS, através da reação de Fenton ( $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}^*$ ) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1984). As ROS são moléculas altamente reativas, por isso podem prejudicar a integridade celular. Eles despolimerizam polissacarídeos, desestabilizam lipídeos, inativam proteínas e quebram DNA (MCCORD, 1996).

No mais, o ferro possui uma alta afinidade para substituir outros metais em centros reativos enzimáticos, uma distorção que geralmente resulta em uma interrupção da função enzimática (MARTIN; IMLAY, 2011; VANCE; MILLER, 1998). Devido ao que foi relatado, os seres vivos desenvolveram diversos mecanismos para manter a homeostase do ferro nas células, de forma a evitar seu excesso, prevenindo, assim, sua toxicidade (WANG; PANTOPOULOS, 2011).

## 2.2 O FERRO NO ORGANISMO HUMANO

### 2.2.1 Distribuição do Ferro

Nos humanos o ferro está presente geralmente acoplado a proteínas especializadas que impedem a produção de radicais livres, evitando a formação de componentes tóxicos, e também subvertendo sua disponibilidade para os patógenos (GANZ; NEMETH, 2015). O corpo humano contém cerca de 40–55 mg/kg de ferro, dos quais 66% circulam no sangue como um componente da hemoglobina, dentro das hemácias (CAZA; KRONSTAD, 2013; CRICHTON; CHARLOTEAUX-WAUSTERS, 1987; MENDEL, 1964).

A hemoglobina é uma pequena proteína (64 kDa) responsável pelo transporte de oxigênio dos pulmões para os tecidos. Ela possui dois pares de cadeias de globina: alfa e beta. Cada cadeia polipeptídica está ligada a um grupo heme, e este possui um íon de ferro em seu núcleo (MARENGO-ROWE, 2006). Cada hemácia possui aproximadamente  $2,7 \times 10^8$  moléculas de hemoglobina, portanto, carrega cerca de  $1,1 \times 10^9$  átomos de ferro (D' ALESSANDRO *et al.*, 2017). O ferro na forma ferrosa ( $\text{Fe}^{2+}$ ) é capaz de ligar-se reversivelmente ao oxigênio resultando no mineral oxidado ( $\text{Fe}^{3+}$ ) (EVANS; FRAZER; MARTIN, 1999; MARENGO-ROWE, 2006). A ingestão diária de ferro da dieta (1–2 mg por dia) é insuficiente para manter as exigências nutricionais desse micronutriente. Por exemplo, somente para a síntese de hemoglobina são necessários aproximadamente 20-25 mg de ferro por dia (GANZ; NEMETH, 2012). Assim, o metal é reciclado de hemácias danificadas ou senescentes, por meio da ingestão por macrófagos, que fornecem cerca de 95% das necessidades diárias de ferro (JOHNSON; WESSLING-RESNICK, 2012).

A segunda estrutura onde mais se encontra ferro é na ferritina. Em humanos adultos saudáveis, aproximadamente 30% do ferro corporal está presente nessa proteína (FLEMING; WOOD, 1995). A ferritina é responsável pelo armazenamento de ferro intracelular, importante por manter a homeostase desse íon e inibir a produção de ROS (JOMOVA; VALCO, 2011). Baixas concentrações (20–300 mg/L) também podem ser encontradas circulando no sangue (HARRISON; ADAMS, 2002). A ferritina está presente em todas as células, no entanto, em níveis mais elevados, faz parte também de estruturas responsáveis pela síntese dos precursores eritroides (medula

óssea), e pelo metabolismo e reserva do ferro (fígado, baço e macrófagos) (MATSUNO; MORI; AWAI, 1995; WANG *et al.*, 2013).

A ferritina consiste de 24 subunidades que formam uma camada proteica esférica com uma cavidade central, sendo capaz de armazenar até 4.500 átomos de ferro férrico (BLATZER; BINDER; HAAS, 2011; LAN *et al.*, 2004). Existem dois tipos de subunidades, H (21 kDa) e L (19 kDa), e quando a macromolécula está saturada de ferro (holoferritina) pode atingir a massa molecular de aproximadamente 500 kDa (AROSIO; ADELMAN; DRYSDALE, 1978; HARRISON; AROSIO, 1996).

O ferro também está presente em menor proporção em proteínas da família das transferrinas. Em humanos existem dois membros dessa família, a transferrina propriamente dita, e a lactoferrina. Ambas são glicoproteínas monoméricas de aproximadamente 80 kDa (ALBAR *et al.*, 2014; WADA, 2016). A transferrina, de síntese hepática, é encontrada no soro e é responsável por doar ferro às células da medula, do baço, do fígado e dos músculos, locais de grande necessidade do metal (PIETRANGELO, 2002). Em indivíduos saudáveis, cerca de 30% da transferrina é saturada com ferro (EVANS; WILLIAMS, 1978; HAN, 2005), deixando a concentração de ferro livre no soro em torno de  $10^{18}$  M (BULLEN; ROGERS; GRIFFITHS, 1978).

A lactoferrina (ou lactotransferrina) está presente nos fluídos corporais, como leite, saliva, lágrimas e soro, e é produzida pelos neutrófilos (VORLAND, 1999). Sua principal função é o fornecimento de ferro para o neonato e as vantagens nutricionais decorrentes da sua ingestão: proteção contra infecções, imunomodulação e proteção contra o desenvolvimento de câncer pela atividade antioxidante (TOMITA *et al.*, 2009). É importante ressaltar que assim como a transferrina, a lactoferrina possui dois sítios de ligação ao ferro (AISEN; LEIBMAN; ZWEIERET, 1978). Ambas possuem afinidade pelo ferro férrico, e este é encontrado em pH neutro. A acidificação do meio favorece a transição do ferro para o estado ferroso, e acelera a remoção desse metal das proteínas (AISEN; LEIBMAN; ZWEIERET, 1978; JOLLES *et al.*, 1976; MORGAN, 1979).

Outra molécula que possui função protetiva semelhante à lactoferrina é a calprotectina, um heterodímero de 24 kDa de duas proteínas, a S100A (10,8 kDa) e a S100B (13,2 kDa) (RYCKMAN *et al.*, 2003). Está presente no citoplasma dos neutrófilos e é expressa na membrana dos monócitos (STRÍŽ; TREBICHAUSKÝ, 2004). Quando ligada ao cálcio, a calprotectina é capaz de sequestrar ferro ferroso e manganês por meio de quelação (NAKASHIGE *et al.*, 2015). Também é capaz de se

ligar ao zinco sem a presença de cálcio (STRÍŽ; TREBICHAVSKÝ, 2004). A ligação do cálcio induz uma mudança conformacional no complexo que melhora sua afinidade para metais de transição (BROPHY; NOLAN, 2015). Adicionalmente, promove a formação de tetrâmero capaz de se ligar a dois átomos de ferro, um em cada dímero (NAKASHIGE *et al.*, 2015).

Além disso, o ferro pode ser encontrado intracelularmente como parte das hemoproteínas. Elas contêm grupos hemes, que consistem de um anel tetrapirrólico contendo um átomo de ferro no centro (TRAVASSOS *et al.*, 2017). Exemplos de hemoproteínas são as mioglobinas, citocromos, catalases e peroxidases. Elas desempenham diversas funções como ligação e transporte de oxigênio, transferência de elétrons, catálise e sinalização (LIN; WANG, 2013). O ferro também está presente em proteínas de ferro-enxofre, ou metaloproteínas, como por exemplo a aconitase e succinato desidrogenase (BEINERT; KENNEDY, 1993, HUANG; MILLAR, 2013). Elas apresentam funções diversas, desde a transferência de elétrons entre outras proteínas, até a catálise enzimática e regulação genética (ROUAULT, 2019). Por fim, outra proteína que contém ferro é o ribonucleotídeo redutase. Essa é uma enzima que catalisa a formação de desoxirribonucleotídeos (precursores de DNA) a partir da remoção do átomo de oxigênio dos ribonucleotídeos (ELLEGE; ZHOU; ALLEN, 1992).

### 2.2.2 Homeostase do Ferro no Organismo e Imunidade Nutricional

Fourie e colaboradores em 2018 mencionou Weinberg, 1974, que denominou o processo de sequestrar ferro pelo hospedeiro e restringir sua biodisponibilidade aos patógenos invasores de imunidade nutricional. A homeostase e a biodisponibilidade do ferro para o hospedeiro ou para os patógenos invasores, são rigidamente reguladas através da coordenação da hepcidina, proteínas de ligação ao ferro, e várias enzimas envolvidas no metabolismo do ferro (FOURIE *et al.*, 2018; NEMETH *et al.*, 2004).

Nesse sentido, a candidíase é mediada pela produção de citocinas pró-inflamatórias como as interleucinas IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-22 (AGGOR *et al.*, 2020; MOSTEFAOUI *et al.*, 2004; VONK *et al.*, 2006). Essas citocinas, nos hepatócitos, promovem a expressão do gene *HAMP* produtor do hormônio hepcidina (ARMITAGE *et al.*, 2011; KANAMORI *et al.*, 2017; LEE *et al.*, 2005). A hepcidina é uma proteína

reguladora do metabolismo do ferro, que controla a liberação desse metal na corrente sanguínea (GANZ, 2003).

Quando a hepcidina está presente, se liga a ferroportina-1, uma proteína transmembranar que transporta o ferro intracelular para seu exterior (WARD; KAPLAN, 2012). A ligação da hepcidina à ferroportina-1 resulta na internalização e degradação da segunda proteína, reduzindo significativamente a exportação de ferro (FINBERG, 2013). Dessa forma, durante infecções causadas por patógenos extracelulares, a hepcidina é capaz de restringir a liberação do ferro armazenado nos hepatócitos e nas hemoglobinas, reciclado pelos macrófagos e absorvido pelos enterócitos duodenais (GANZ; NEMETH, 2012; NAIRZ; WEISS, 2020). Nessas situações, também ocorre uma redução na expressão do gene *SLC40A1* que codifica a ferroportina-1 (LUDWICZEK *et al.*, 2003).

Contrariamente, quando as células do hospedeiro estão sendo invadidas por patógenos intracelulares, a ferroportina-1 é responsável por expulsar o ferro armazenado nas células (NAIRZ; WEISS, 2020). Por exemplo, isso ocorre nas hemácias infectadas por *Plasmodium* spp. agente etiológico da malária (ZHANG *et al.*, 2018).

A captação celular de ferro por meio da transferrina também é regulada em infecções causadas por *Candida* (FOURIE *et al.*, 2018). A transferrina se liga à receptores celulares de transferrina que são dependentes do nível intracelular de ferro (KAWABA, 2019). Essa ligação desencadeia sua endocitose, e o ferro ligado à transferrina se dissocia dentro dos endossomos, que possuem pH baixo, em torno de 5,5 (BALI; AISEN, 1992; ANDERSON; VULPE, 2009). Durante as infecções, ocorre a produção das citocinas pró-inflamatórias já mencionadas, IL-1 e IL-6, e também do fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), e do interferon gama (IFN- $\gamma$ ). Essas citocinas aumentam a captação de ferro livre pela transferrina e sua doação aos macrófagos, mediante a regulação positiva das proteínas receptoras de transferrina (BYRD; HORWITZ, 1993; LUDWICZEK *et al.*, 2003; DRAKESMITH; PRENTICE, 2012). Dessa forma, ocorre uma redução da concentração de ferro na circulação sanguínea, restringindo seu acesso aos patógenos.

Para obter ferro da hemoglobina, *C. albicans* produz um fator hemolítico (WATANABE *et al.*, 1999). Quando isso acontece, o corpo humano trabalha rapidamente para remover o heme e a hemoglobina da circulação sanguínea, evitando uma possível toxicidade apresentada pelo heme livre, e restringindo seu acesso ao

patógeno (HALEY; SKAAR, 2012). A Haptoglobina e a hemopexina ligam-se à hemoglobina e ao heme liberado dos eritrócitos, respectivamente, para realizar a reciclagem do ferro (HOOD; SKAAR, 2012; KUMAR; BANDYOPADHYAY, 2005). O heme ligado à hemopexina é transportado ao fígado para reciclagem, e as células do parênquima hepático absorvem o complexo por via endocítica (TOLOSANO *et al.*, 2010).

Proteínas quelantes de ferro também contribuem para a imunidade nutricional do hospedeiro. A calprotectina, por exemplo, é liberada em excesso pelos neutrófilos e células epiteliais em resposta a estímulos infecciosos. Ela se liga de forma eficiente ao ferro e também ao manganês, reduzindo assim a disponibilidade desses nutrientes para fungos e bactérias invasoras (BROPHY; NOLAN, 2015; NAKASHIGE *et al.*, 2015). A lactoferrina ou seus análogos sintéticos, por sua vez, além de restringirem o acesso ao ferro para os microrganismos, matam fungos (ACOSTA-ZALDÍVAR *et al.*, 2016; WAKABAYASHI; TAKASE; TOMITA, 2003), bactérias e protozoários por perfuração da membrana celular (WAKABAYASHI; TAKASE; TOMITA, 2003). A lactoferrina possui atividade fungicida contra espécies de *Candida*: *C. albicans* (KUIPERS *et al.*, 2002; NIKAWA *et al.*, 1993; XU *et al.*, 1999), *C. glabrata* (KUIPERS *et al.*, 2002; XU *et al.*, 1999), *C. krusei* (NIKAWA *et al.*, 1993; XU *et al.*, 1999), *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* e *C. parapsilosis* (XU *et al.*, 1999). Sua atividade antimicrobiana se estende para vírus como Zika, Chicungunha (CARVALHO *et al.*, 2017) e o vírus da imunodeficiência humana (SENAPATHI *et al.*, 2020).

Outra proteína do hospedeiro importante na imunidade nutricional é a siderocalina [também referida como lipocalina-2 ou lipocalina associada a neutrófilos gelatinase (NGAL)] (FORBES; GROS, 2001; CHAKRABORTY *et al.*, 2012). A siderocalina é produzida principalmente por neutrófilos, macrófagos e células epiteliais, por meio da resposta mediada por citocinas, especialmente a IL-1 $\beta$  (BORREGAARD; COWLAND, 2006). Ela se liga a vários tipos de sideróforos, neutralizando-os e restringindo o acesso dos patógenos ao ferro complexado com sideróforo (JOHNSON; WESSLING-RESNICK, 2012).

### 2.3 *CANDIDA ALBICANS*: CANDIDÍASE E FATORES DE VIRULÊNCIA

*C. albicans* pertence à família Candidaceae, ordem Saccharomycetales, classe Hemiascomycetes, filo Ascomycota e reino Fungi. Essa levedura, em comensalismo, compõe a microbiota humana. Poucas espécies de *Candida* são colonizadoras bem-sucedidas de um hospedeiro humano, e estas também incluem *C. glabrata*, *C. dubliniensis* e *C. parapsilosis* (POLKE; HUBE; JACOBSEN, 2015). Esses fungos são adquiridos no nascimento ou próximo a ele, principalmente por contato físico (KONDORI, *et al.*, 2020; REEF, *et al.*, 1998). Eles são capazes de colonizar a pele (KÜHBACHER; BURGER-KENTISCHER; RUPP, 2017) bem como o trato gastrointestinal (BANDARA; PANDUWAWALA; SAMARANAYAKE, 2019; NASH *et al.*, 2017) e reprodutivo (KALIA; SINGH; KAUR, 2020; VAN DE WIJGERT *et al.*, 2014) de humanos.

Em situações de depressão do sistema imunológico ou desequilíbrio da microbiota, essas leveduras podem se multiplicar indevidamente levando a manifestações clínicas (ROMO; KUMAMOTO, 2020). Existem outras espécies de *Candida* que também são patogênicas: *C. norvegensis*, *C. fermentati*, *C. pelliculosa*, *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. tropicalis*, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis*, *C. duobushaemulonii*, *C. haemulonii*, *C. pseudohaemulonii*, *C. intermedia* (MERSEGUEL *et al.*, 2015), *C. auris* (LOCKHART, 2019) e *C. inconspicuous* (GUITARD *et al.*, 2013).

O gênero *Candida* contém os principais agentes patológicos fúngicos responsáveis por infecções superficiais (pele e mucosas) e invasivas (órgãos internos) (DE ALBUQUERQUE MARANHÃO *et al.*, 2019; SARDI, *et al.*, 2013). *C. albicans* é, em grande parte das vezes, a espécie mais isolada nessas enfermidades (CANELA *et al.*, 2018; DE MEDEIROS *et al.*, 2019; DE ALBUQUERQUE MARANHÃO *et al.*, 2019). O exemplo mais comum de infecção superficial causada por *C. albicans* é a candidíase vulvovaginal, que afeta a maioria das mulheres em idade reprodutiva pelo menos uma vez na vida, e pode ser recorrente em 5–8% das mulheres adultas (SOBEL, 2007).

Pessoas com imunossupressão sistêmica também podem desenvolver candidíase na cavidade oral, que quando acomete crianças, é popularmente conhecida como “sapinho” (TAYLOR; RAJA, 2020). Estão incluídos pacientes em imunossupressão, como a idade extrema (muito jovem ou senil), a Síndrome da

Imunodeficiência Adquirida (SIDA), diabetes mellitus, leucemia, doença terminal e terapia prolongada com esteroides ou antibacterianos sistêmicos (AKPAN, MORGAN; 2002; TAYLOR; RAJA, 2020). Além disso, *C. albicans* também pode desempenhar um papel na persistência ou no agravamento de algumas doenças inflamatórias intestinais crônicas (POULAIN, 2015).

Em relação às infecções sistêmicas provocadas por *Candida* spp., estimativas globais recentes apontam a ocorrência anual de 700.000 casos (BONGOMIN *et al.*, 2017). *C. albicans* é a principal espécie etiológica de *Candida* associada à candidíase invasiva nosocomial em todo o mundo (GUINEA, 2014). Essa enfermidade está relacionada a comorbidades ou condições graves que levam à supressão do sistema imunológico. Nessas situações, o diagnóstico precoce e preciso permite a terapia antifúngica imediata. No entanto, isso costuma ser atrasado ou indisponível, levando à morte dos pacientes (BONGOMIN *et al.*, 2017). Por isso, estudos epidemiológicos recentes mostram que as infecções fúngicas sistêmicas causadas por *Candida* spp. estão associadas a altas taxas de mortalidade, chegando ao patamar de 60% em alguns casos (CANELA *et al.*, 2018; DA SILVA *et al.*, 2019; STANISZEWSKA, 2020).

Para conseguir se aderir ao epitélio e endotélio do hospedeiro, e posteriormente invadir os tecidos, *C. albicans* produz vários fatores de virulência. A adesão, o polimorfismo, a formação de biofilme, a produção de hidrolases e a capacidade de adquirir metais do hospedeiro são alguns dos mecanismos que permitem o sucesso desse fungo como patógeno. Para se ancorar ao tecido, *C. albicans* produz adesinas que reconhecem e se ligam a receptores celulares do hospedeiro, por exemplo, a proteína multifuncional Als3 (LIU; FILLER, 2011) e a recentemente descoberta psoriasina (BRAUNER *et al.*, 2018).

Além disso, *C. albicans* possui a capacidade de sofrer filamentação, uma mudança morfogênica de levedura para hifas em resposta a sinais ambientais, muitos dos quais são encontrados no trato gastrointestinal do hospedeiro (SUDBERY, 2011). Esses estímulos ambientais incluem a temperatura de 37 °C, tensão de CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> e pH neutro (KADOSH; JOHNSON, 2005; SUDBERY, 2011). As hifas são compostas por células alongadas que não se separam após a divisão, e são a forma patogênica do fungo devido a sua capacidade de invadir os tecidos. As hifas também são necessárias para a formação adequada de biofilme de *C. albicans*, o que permite que a levedura suporte insultos ambientais (por exemplo, tratamento com antifúngico) (BONHOMME; D'ENFERT, 2013; SUDBERY, 2011).

Como foi citado anteriormente, *C. albicans* é capaz de formar biofilme. Esse consiste em comunidades microbianas mergulhadas em uma matriz extracelular, contendo um elevado grau de organização (DAVEY; O'TOOLE, 2000). A maioria das infecções por *C. albicans* está associada à formação de biofilme em superfícies do hospedeiro ou abióticas, como dispositivos médicos (TSUI; KONG; JABRA-RIZK, 2016). Os biofilmes formados por *C. albicans* são inerentemente tolerantes à terapia antimicrobiana (BONHOMME; D'ENFERT, 2013; TSUI; KONG; JABRA-RIZK, 2016), levando os pesquisadores a procurarem estratégias para solucionar esse problema.

*C. albicans* também produz enzimas hidrolíticas como proteases, lipases e hemolisinas, as quais permitem com que o fungo destrua os tecidos do hospedeiro, absorva os nutrientes e se multiplique (STANISZEWSKA, 2020). Por último, a levedura possui sistemas de aquisição de metais essenciais do hospedeiro, como o ferro, o zinco, o cobre, o níquel e o manganês, que também permitem sua sobrevivência durante o processo infeccioso (GERWIEN *et al.*, 2018).

## 2.4 OBTENÇÃO DE FERRO POR *CANDIDA ALBICANS* DURANTE PROCESSOS INFECCIOSOS

### 2.4.1 Aquisição do Ferro

*C. albicans*, assim como outros microrganismos patogênicos, desenvolveu estratégias para adquirir o ferro do hospedeiro e, assim, sobreviver e se multiplicar no interior do organismo (ALMEIDA; WILSON; HUBE, 2009; NOBLE *et al.*, 2013). Dessa forma, a levedura possui três sistemas de captação de ferro que geralmente são utilizados quando há escassez de ferro biodisponível: a via redutora de ferro, a obtenção de ferro da hemoglobina e a aquisição de ferro através de sideróforos.

Em um primeiro estágio da infecção, o fungo se adere às células do hospedeiro e utiliza o ferro principalmente oriundo do ambiente e das proteínas transferrina (CHEN *et al.*, 2011; CHEN *et al.*, 2013; KNIGHT *et al.*, 2005) e ferritina (ALMEIDA *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2011; CHEN *et al.*, 2013) através da via redutora. A ferritina é reconhecida pelo seu receptor Als3, que está presente na parede celular das formas hifais de *C. albicans* (ALMEIDA *et al.*, 2008; HOYER *et al.*, 1998). Faz sentido, uma vez que a morfologia hifal desse fungo representa um potencial patogênico maior em relação às formas de pseudo-hifa ou de levedura (CLEARY *et al.*, 2016). Após a ligação da ferritina à superfície do microrganismo, o ferro provavelmente é extraído da

proteína sob condições ácidas (ALMEIDA *et al.*, 2008; ALMEIDA; WILSON; HUBE, 2009). A propósito, a pesquisa na literatura revelou que, apesar de existirem, o(s) receptor(res) da transferrina ainda não foi(ram) caracterizado(s), embora haja relato de uma substância semelhante à manoproteína que aparentemente possui tal função (HAN, 2014).

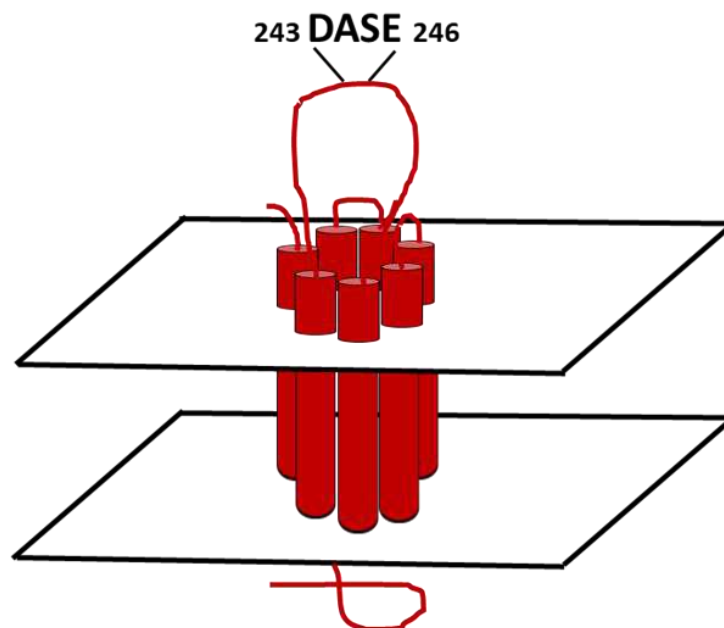
A via redutora é composta por três conjuntos de proteínas transmembranas: as redutases férricas, as oxidases multi-cobre e as permeases de ferro (ALMEIDA; WILSON; HUBE, 2009). As redutases férricas são as primeiras que atuam neste sistema, reduzindo o ferro extracelular, encontrado na sua fase insolúvel (férrico), para sua forma solúvel (ferroso) (HAMMACOTT; WILLIAMS; CASHMORE, 2000). Existem duas redutases de ferro descritas, a Cfl1/Fre1 (YAMADA-OKABE *et al.*, 1996; HAMMACOTT; WILLIAMS; CASHMORE, 2000; XU *et al.*, 2014b) e a Cfl95/Fre10/Rbt2 (BRAUN *et al.*, 2000; KNIGHT *et al.*, 2005; KNIGHT; DANCIS, 2006; JEEVES *et al.*, 2011). A análise do genoma de *C. albicans* mostra mais 15 genes homólogos com *FRE10*, os quais, possivelmente, em sua maioria, codificam outras redutases de ferro (ALMEIDA; WILSON; HUBE, 2009).

O ferro ferroso, contudo, pode produzir radicais livres. Então, para prevenir a toxicidade, o  $Fe^{2+}$  é oxidado a  $Fe^{3+}$  pela atividade das oxidases multi-cobre (DE LUCA; WOOD, 2000; KOSMAN, 2003). *C. albicans* possui cinco putativas oxidases multi-cobre, sendo duas delas caracterizadas, a Fet3 e a Fet99 (ALMEIDA; WILSON; HUBE, 2009; CHENG *et al.*, 2013; ECK *et al.*, 1999; KNIGHT *et al.*, 2002). Além disso, sabe-se que *C. albicans* possui um transportador de cobre intracelular, o Ccc2 que é responsável pelo fornecimento desse metal para as oxidases multi-cobre (ALMEIDA *et al.*, 2008; WEISSMAN *et al.*, 2002). Em relação à localização das oxidases multi-cobre, estas são acopladas às permeases de ferro formando um complexo pelo qual o ferro é transferido para as permeases e, através delas, é transportado para o interior da célula (RAMANAN & WANG, 2000; KNIGHT *et al.*, 2002; ZIEGLER *et al.*, 2011).

Em *C. albicans*, a principal permease de ferro, Ftr1, é uma proteína essencial para o crescimento da levedura em escassez de ferro (RAMANAN; WANG, 2000) e também fundamental para a aquisição de ferro da ferritina (ALMEIDA *et al.*, 2008), transferrina (KNIGHT *et al.*, 2005) e xenosideróforos (HU *et al.*, 2002). Ftr1 é uma permease de ferro de alta afinidade ao ferro pois é requerida apenas em situações de escassez desse íon (RAMANAN; WANG, 2000). Ela é composta por sete domínios que transpassam a membrana plasmática e formam um canal por onde o ferro

atravessa. Também possui por uma alça extracelular, contendo o motivo DASE, pelo qual a oxidase multi-cobre transfere o ferro para a permease (Figura 1) (ZIEGLER *et al.*, 2011). Três genes homólogos à *FTR1* foram identificados em *C. albicans*, o *FTR2* (RAMANAN; WANG, 2000), uma permease de ferro de baixa afinidade, e os transportadores de ferro putativos *FTH1* e *FTH2* (URBANOWSKI; PIPER, 1999). A mais próxima, *Ftr2*, possui 87% de identidade com *Ftr1*, e é expressa apenas em altas concentrações de ferro (RAMANAN & WANG, 2000), situação incomum durante os estágios iniciais de uma infecção (LIN, *et al.*, 2014; XU *et al.*, 2015).

**Figura 1** - Estrutura da permease de ferro de alta afinidade, *Ftr1*, de *C. albicans*, de acordo com Ziegler e colaboradores (2011). A *Ftr1*, uma proteína de 381 aminoácidos, é composta por sete domínios que transpassam a membrana plasmática e formam um canal por onde o ferro atravessa. Também possui uma alça extracelular, contendo o motivo DASE, nos aminoácidos 243-246.



Fonte: a própria autora.

Em um estágio mais avançado da infecção, quando há maior destruição tecidual, a aquisição do ferro também acontece pela hemoglobina (CHEN *et al.*, 2011; CHEN *et al.*, 2013). Primeiramente, *C. albicans* precisa lisar as hemácias e, para isso, possui fatores hemolíticos, cuja natureza bioquímica dessas moléculas ainda não foi identificada (FURLANETO *et al.*, 2018). Provavelmente são manoproteínas ligada à sua superfície celular (WATANABE *et al.*, 1999). Posteriormente, as porções heme da hemoglobina são reconhecidas por cinco proteínas que foram secretadas para fora do

citoplasma. O receptor Csa2 é secretado no meio, enquanto que os outros receptores, Rbt5, Rbt51/Pga10, Wap1/Csa1e Pga7 permanecem ancorados na superfície celular (KUZNETS *et al.* 2014; NASSER *et al.* 2016; WEISSMAN *et al.* 2008; WEISSMAN; KORNITZER, 2004). Esses receptores possuem, em comum, o domínio CFEM (do inglês: *Common in Fungal Extracellular Membrane*), que é caracterizado por oito resíduos de cisteínas de espaçamento conservados. Esse domínio também é encontrado em muitas proteínas de membrana fúngica (KULKARNI; KELKAR; DEAN, 2003).

Depois da ligação à superfície fúngica, a hemoglobina é internalizada por meio de uma via endocítica e, possivelmente, hidrolisada ou desnaturada para liberar o heme através de proteases vacuolares e/ou do pH ácido vacuolar (WEISSMAN *et al.*, 2008). Por último, o ferro é extraído do heme por uma heme oxigenase citoplasmática, expressa pelo gene *HXM1* (PENDRAK; YAN; ROBERTS, 2004). Ainda não se tem conhecimento de todos os passos do processo de absorção de ferro da hemoglobina (FURLANETO *et al.*, 2018), nada obstante, estudos que envolvem a expressão gênica indicam que o heme também pode ser endocitado já isolado da hemoglobina (KUZNETS *et al.* 2014; ROY; KORNITZER, 2019; WEISSMAN *et al.*, 2008).

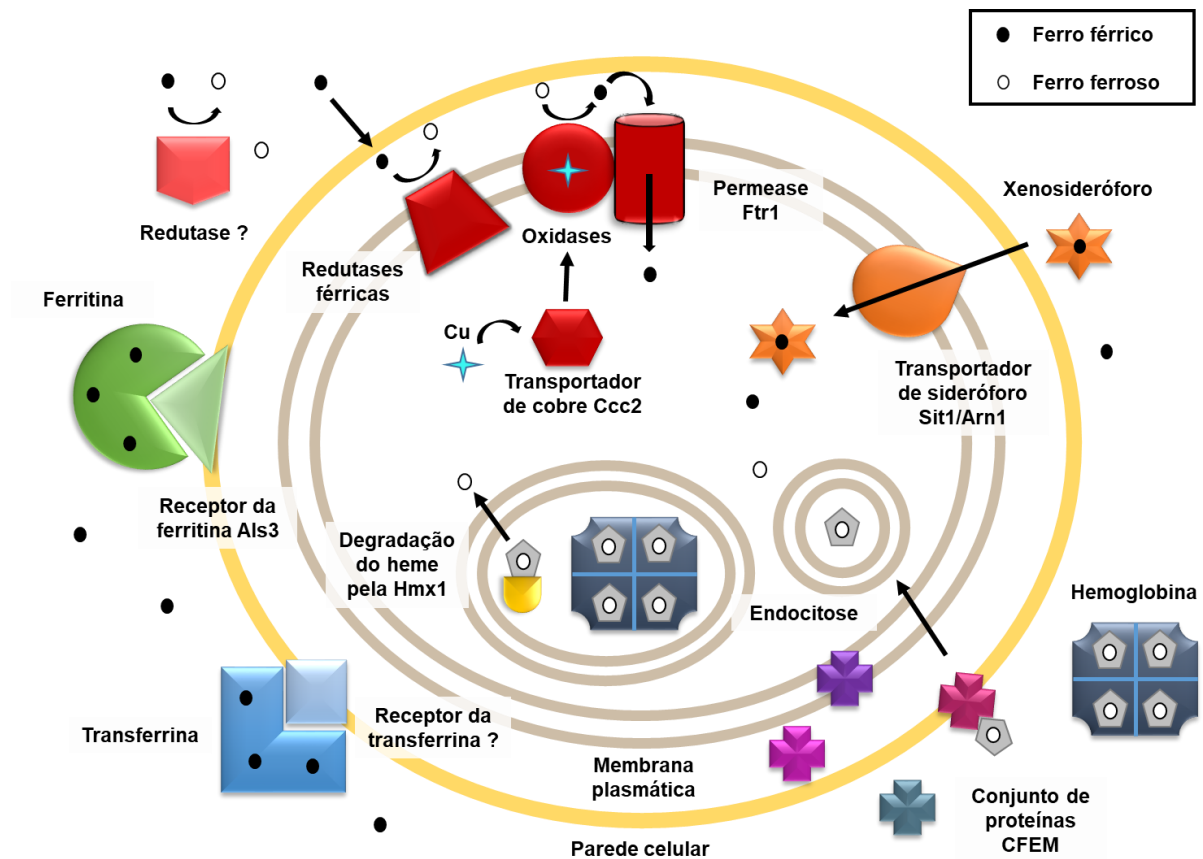
A captação de ferro por *C. albicans* também pode ser realizada pelos sideróforos. Essas são proteínas de baixo peso molecular (< 1 kDa), que possuem alta afinidade ao ferro, secretadas por algumas bactérias (ANDREWS; ROBINSON; RODRÍGUEZ-QUIÑONES, 2003) e fungos (HAAS, 2003). Quando se realizou a análise do genoma de *C. albicans*, não foi encontrada a via biossintética da produção de sideróforos, constatando que o fungo não produz esses tipos de proteínas (LAN *et al.*, 2004). Entretanto, ele consegue utilizar xenosideróforos para obter ferro em condições de comensalismo com outros microrganismos, na cavidade oral do hospedeiro, por exemplo (HEYMANN *et al.*, 2002). Esse processo é conhecido como "pirataria de sideróforos" (HOLZBERG; ARTIS, 1983; HAAS, 2003).

Os sideróforos são capazes de quelar o ferro de proteínas do hospedeiro como a transferrina, lactoferrina e ferritina (FETHERSTON *et al.*, 2010; GOBIN; HORWITZ, 1996; HEYMANN *et al.*, 2002). Em *C. albicans*, os sideróforos são reconhecidos e transportados para dentro da célula pelo seu único transportador, o Sit1/Arn1 (HEYMANN *et al.*, 2002). Entretanto, é possível que o complexo transportador-sideróforo seja internalizado através de uma via endocítica, assim como acontece com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (HU *et al.*, 2002; WEISSMAN *et al.*, 2008). É

importante ressaltar que o ferro dos sideróforos também pode ser assimilado pela via reductiva (HU *et al.*, 2002).

Moléculas secretadas distintas dos sideróforos, com a capacidade de ligar e reduzir o ferro, também são conhecidas em fungos (GERWIEN *et al.*, 2018). Por exemplo, o 3-hidroxiantranilato secretado por *Cryptococcus neoformans* (NYHUS; WILBORN; JACOBSON, 1997) e a terreína, secretada por *Aspergillus terreus* (GRESSLER *et al.*, 2015), foram identificados como redutores férricos extracelulares. Recentemente foi mostrado que os sobrenadantes de cultura de *C. albicans*, *C. glabrata* e *S. cerevisiae* mostraram atividade de redução férrica, mediante um composto de baixo peso molecular que, entretanto, é desconhecido (GERWIEN *et al.*, 2018). Uma representação esquemática dos mecanismos de absorção de ferro pode ser apreciada na Figura 2.

**Figura 2** - Representação esquemática dos mecanismos de absorção de ferro por *C. albicans* de acordo com Fourie e colaboradores (2018), e com Gerwien e colaboradores (2018). A levedura produz proteínas de ligação de ferro utilizadas para adquirir ferro livre, acoplado a xenosideróforos, ou de proteínas do hospedeiro, como a hemoglobina, a ferritina e a transferrina.



Fonte: a própria autora.

#### 2.4.2 Regulação da Captação do Ferro

No interior do hospedeiro, os distintos ambientes variam em relação à biodisponibilidade de ferro (BLANKENSHIP; MITCHELL, 2011). Por exemplo, durante os processos infecciosos, *C. albicans* está invadindo os tecidos em contato direto com as proteínas do hospedeiro e o ferro é pouco acessível. Entretanto, quando a levedura está em comensalismo no trato gastrointestinal e na vagina, a disponibilidade de ferro é maior devido à presença de xenosideróforos e aos nutrientes parcialmente digeridos em algumas dessas regiões. Por isso, *C. albicans* necessita regular a expressão de genes de aquisição de ferro para contornar a toxicidade do metal, bem como a deficiência de ferro em ambientes com diferentes disponibilidades (KRONSTAD; CADIEUX; JUNG, 2013).

Nesse contexto, a proteína regulatória Sef1 funciona como um promotor de virulência, graças a sua capacidade de habilitar *C. albicans* a viver em ambientes com deficiência de ferro. De forma resumida, em condições de depleção de ferro, a expressão de *SEF1* é induzida e, após, Sef1 é ativada por fosforilação pós transcricional pela proteína quinase Ssn3 (CHEN; NOBLE, 2012). Sef1 atua como fator de transcrição e induz a expressão de *HAP43* e genes de aquisição de ferro (CHEN *et al.*, 2011). Hap43, por sua vez, também induz genes de captação de ferro, bem como a repressão de genes de utilização de ferro e Sfu1 (SINGH *et al.*, 2011).

Sfu1 é outra proteína regulatória que atua como uma promotora de comensalismo, protegendo *C. albicans* da toxicidade mediada pelo ambiente rico em ferro, do trato gastrointestinal do hospedeiro (CHEN; NOBLE, 2012; FOURIE *et al.*, 2018). Em condições de abundância de ferro, a repressão de *SFU1* é elevada. Isso resulta na inibição de *SEF1*, bem como na repressão de genes de aquisição de ferro (LAN *et al.*, 2004). Também acontece a metilação do DNA, que pode levar a repressão de genes de aquisição de ferro (MISHRA; BAUM; CARBON, 2011).

Hap43, adicionalmente, possui um papel importante na regulação dos níveis intracelulares de ferro. Esse processo é importante na manutenção da homeostase endocelular do ferro, e está intimamente interligado à aquisição do metal do hospedeiro. Dessa forma, Hap43 controla a atividade do Ccc1, transportador de ferro, responsável pelo seu armazenamento vacuolar, e do Smf3 que desempenha um papel na exportação vacuolar. Igualmente controla a atividade do transportador mitocondrial

Mrs4 (CHEN *et al.*, 2011; MONTEIRO *et al.*, 2017; SINGH *et al.*, 2011; XU *et al.*, 2014a).

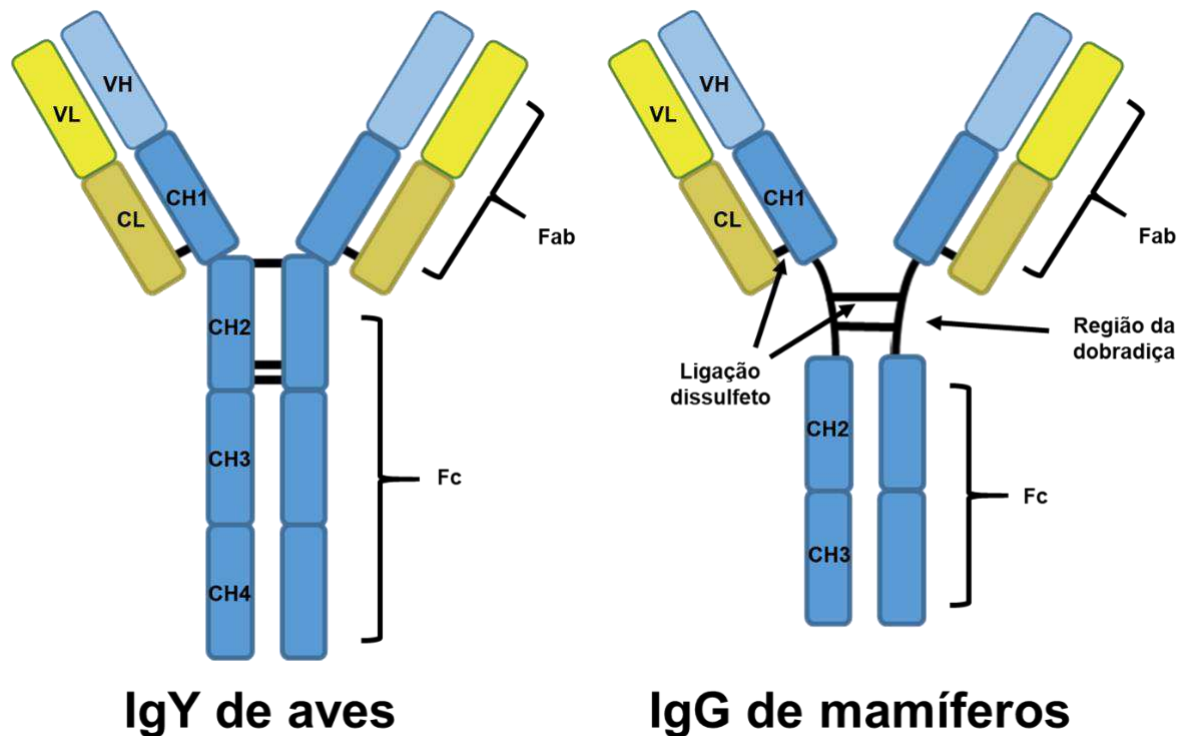
## 2.5 O USO DE IMUNOGLOBULINA Y EM IMUNOTERAPIAS

### 2.5.1 A Imunoglobulina Y

A IgY, anticorpo produzido por aves, répteis, anfíbios e peixes pulmonados, é o precursor evolucionário da IgG e da imunoglobulina E (IgE), presentes apenas em mamíferos (WARR; MAGOR; HIGGINS, 1995; ZHANG *et al.*, 2017). De composição glicoproteica, é o principal anticorpo dos frangos (*Gallus gallus domesticus*), produzido por linfócitos B durante a resposta imune adquirida (DIAS DA SILVA; TAMBOURGI, 2010; WARR; MAGOR; HIGGINS, 1995). É sintetizada no sangue e transferida para a gema dos ovos desses animais com a finalidade de proteger a prole até o desenvolvimento de seu próprio sistema imunológico (MARCHALONIS *et al.*, 1977). A quantidade de IgY transferida independe do tamanho do ovo e está relacionada com sua concentração plasmática (LI *et al.*, 1998).

Como a IgG, a IgY contém duas cadeias pesadas e duas leves, no entanto, o peso molecular das cadeias pesadas de IgY são maiores do que as da IgG, contendo um peso molecular total de 180 kDa em comparação com 150-160 kDa da IgG (KOVACS-NOLAN; MINE, 2004). Cada cadeia pesada da IgY possui peso molecular em torno de 65-70 kDa, e cada cadeia leve cerca de 25-27 kDa (AMRO; AL-QAISI; AL-RAZEM, 2018; MWALE *et al.*, 2020; NARAT, 2003). Além disso, a cadeia pesada da IgY não possui uma dobradiça, possuindo quatro domínios constantes (CH1, CH2, CH3 e CH4) e um domínio variável. A IgG, no entanto, possui uma região de dobradiça entre os dois primeiros dos três domínios constantes das cadeias pesadas, o que leva à flexibilidade dos fragmentos Fab (fragmento de ligação ao antígeno, do inglês *fragment antigen-binding*) (KOVACS-NOLAN; MINE, 2004; LEE *et al.*, 2017). A análise da sequência de IgY e IgG revelou que os domínios CH3 e CH4 da IgY estão intimamente relacionados com os domínios CH2 e CH3 da IgG (WARR; MAGOR; HIGGINS, 1995). A comparação estrutural da IgY com a IgG é mostrada na Figura 3.

**Figura 3** - Estruturas básicas da IgY e IgG de acordo com Lee e colaboradores (2017). Como indicado, IgY tem o domínio CH4 adicional como a IgE, embora não tenha a região de dobradiça que é observada em IgG. VL: porção variável da cadeia leve, CL: porção constante da cadeia leve, VH: porção variável da cadeia pesada, CH: porção constante da cadeia pesada, Fab: fragmento de ligação ao antígeno e Fc: fragmento cristalizável.



Fonte: a própria autora.

Em relação à função da IgY de aves, esta é semelhante à IgG de mamíferos, pois os anticorpos atuam neutralizando antígenos (TAYLOR; SUTTON; CALVERT, 2010). Assim como ocorre na IgG, a região Fab da IgY contém o sítio de ligação ao antígeno, enquanto a região Fc (fragmento cristalizável) é responsável por suas funções biológicas efetoras, como a fixação do complemento, opsonização e sensibilização de mastócitos (DIAS DA SILVA; TAMBOURGI, 2010).

A IgY é uma molécula bem estável, permanece à temperatura ambiente por até 6 meses sem comprometimento da sua atividade. Em temperatura de 4 °C pode ser armazenada por até 10 anos (LARSSON *et al.*, 1993). Aproximadamente 80% da sua atividade é conservada à 60 °C por 30 min, indicando que pode ser resistente à pasteurização lenta (62-65 °C por 30 min) (FAN *et al.*, 2009). Porém, à 70 °C, pelo mesmo período de tempo, perde metade da sua atividade (HATTA *et al.*, 1993). A estabilidade biológica da IgY é comprometida também em condições ácidas, ou

altamente alcalinas, uma vez que se mantém íntegra em pH 4-11 (HATTA *et al.*, 1993; SHIMIZU; FITZSIMMONS; NAKAI, 1988). Entretanto, a inativação induzida por ácido foi quase completamente suprimida em pH 3 com a adição de uma solução aquosa a 50% do carboidrato sorbitol (LEE *et al.*, 2002). Apesar de suportar grandes variações de concentração de íons de hidrogênio, a atividade da IgY é otimizada em valores de pH mais próximos da neutralidade: 5,7–7,6 (SUN *et al.*, 2001).

Além da IgY, as aves também produzem IgA e IgM, que são semelhantes às imunoglobulinas presentes nos mamíferos quanto à estrutura, peso molecular e função (CARLANDER *et al.*, 1999). A IgY é a classe mais abundante no soro, com concentrações que variam de 5 a 15 mg/mL, enquanto que a IgM e a IgA estão em concentrações mais baixas, 1-3 mg/mL e 0,3-0,5 mg/mL respectivamente (SPILLNER *et al.*, 2012). A IgY é transferida para o embrião quando o ovo ainda está no ovário, já a IgM e a IgA maternas são absorvidas na descida pelo oviduto, em secreções, e junto à ovalbumina (TIZARD, 2014). Durante o desenvolvimento do embrião, ele absorve a IgY, presente na gema, e engole a IgA e IgM difundidas no líquido amniótico, o que resulta na presença dessas biomoléculas no intestino e a IgY no soro, podendo durar entre 10-20 dias no pinto recém eclodido (TIZARD, 2014). Somando ao fato de que o ovo em fase pós-postura leva em torno de 21 dias para eclodir, a atividade biológica da IgY não é comprometida à 37 °C por pelo menos um mês (LARSSON *et al.*, 1993).

### 2.5.2 IgY na Imunoterapia Contra *C. albicans*

A produção, extração e uso de anticorpos IgY provenientes de ovos de galinhas é uma metodologia inovadora que sustenta diversas finalidades, desde a imunoterapia passiva, profilaxia e diagnóstico de doenças (LEE *et al.*, 2017; LEIVA *et al.*, 2020; SPILLNER *et al.*, 2012). Seu primeiro relato aconteceu em 1893, quando Klemperer descobriu que as gemas extraídas de ovos coletados após a imunização de galinhas com a toxina tetânica poderiam proteger camundongos após um desafio letal com a toxina, evidenciando a presença de "proteínas neutralizantes" no sangue e ovos (CHACANA *et al.*, 2004). Essas descobertas foram esquecidas até 1959, quando Willian Russell e Rex Burch alertaram a comunidade científica sobre a importância do bem-estar animal na pesquisa (BALLS, 2010). Antigamente, o anticorpo era erroneamente rotulado como IgG, entretanto, em 1969, Leslie e Clem determinaram

o termo “IgY” para se referir à anticorpos de aves, dado as diferenças entre as duas imunoglobulinas.

Desde 1996, o termo “tecnologia IgY” tornou-se internacionalmente aceito para designar a produção e aplicação de anticorpos de gema de ovos (SCHADE *et al.*, 2005). Assim, a IgY, nos últimos anos, tem sido alvo de pesquisa e desenvolvimento de produtos de uso terapêutico e/ou profilático para o tratamento de várias doenças humanas. Dentre elas estão a periodontite, gengivite, cárie dentária, úlcera gástrica, doenças infecciosas entéricas, disbiose, intoxicação por venenos, doenças nutricionais e metabólicas, doenças crônicas, e neoplasias (LEIVA *et al.*, 2020).

Por exemplo, a IgY tem sido estudada para a produção de soro neutralizante contra venenos de serpentes (DE ANDRADE *et al.*, 2013) e para o diagnóstico de doenças virais como COVID-19 (SOMASUNDARAM; CHORARIA; ANTONYSAMY, 2020) e influenza A (DA SILVA *et al.*, 2018). Mais um exemplo é o potencial uso de IgY para o tratamento de infecções bacterianas, como é o caso da úlcera gástrica ocasionada por *Helicobacter pylori* (MONY *et al.*, 2019). Outros pesquisadores têm construído anticorpos específicos contra células cancerígenas, conjugados a substâncias tóxicas que são capazes de destruir essas células. Esses anticorpos são denominados de imunotoxinas (CHAVEZ-CORTEZ *et al.*, 2019). Por último, anticorpos específicos contra genes também têm sido desenvolvidos para descoberta de novos alvos de fármacos antimicrobianos (ZHANG, 2003).

Recentemente, foi relatado um grande aumento de fungos patogênicos, inclusive do gênero *Candida*, resistentes aos agentes antimicrobianos disponíveis (COLOMBO; DE ALMEIDA JÚNIOR; GUINEA, 2017; FISHER *et al.*, 2018). Nesse contexto, a imunoterapia utilizando anticorpos advindos de aves é uma boa opção para contornar a resistência fúngica. Na literatura, existem vários relatos sobre o potencial uso terapêutico de IgY para tratamento de infecções causadas por *C. albicans* (FUJIBAYASHI *et al.*, 2009; IBRAHIM *et al.*, 2008; KAMIKAWA *et al.*, 2016; LEU, *et al.*, 2020; TAKEUCHI *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2008). Todos os estudos se concentraram no combate à candidíase oral, conforme é descrito a seguir.

Um tratamento prévio com anticorpos IgY produzidos contra *C. albicans* reduziu a aderência dessa levedura às células FaDu (células de carcinoma da faringe humana) e às células epiteliais orais humanas (FUJIBAYASHI *et al.*, 2009; IBRAHIM *et al.*, 2008). O mesmo efeito também foi observado para outras *Candida* spp., durante infecção de células epiteliais orais humanas. Além disso, a IgY inibiu a formação de

biofilme de *C. albicans* em meio sem soro, mas o crescimento foi restaurado em meio condicionado com 10% de soro (FUJIBAYASHI *et al.*, 2009). Em outro trabalho, anticorpos IgY específicos para *C. albicans* e *C. glabrata* inibiram a aderência desses fungos a materiais de base de dentadura, indicando a possibilidade de um efeito benéfico na prevenção de estomatite dentária (KAMIKAWA *et al.*, 2016).

A imunoterapia utilizando IgY anti-*C. albicans* também mostrou ter efeito protetor *in vivo*, contra a candidíase oral em camundongos infectados experimentalmente, além de reduzir a disseminação dessa levedura para órgãos internos dos animais (IBRAHIM *et al.*, 2008). Ademais, sua eficácia protetiva foi demonstrada em humanos, mais especificamente em pacientes idosos, nos quais o uso de um gel hidratante oral contendo IgY anti-*C. albicans* reduziu por um mês o número de unidades formadoras de colônias de *C. albicans* de coleta de *swab* da língua dos pacientes (TAKEUCHI *et al.*, 2016). Além disso, Leu e colaboradores (2020) construíram um fragmento variável de cadeia única, derivado da IgY específica para a alfa-enolase de *C. albicans*, uma proteína multifuncional importante para a virulência do fungo. No estudo, mostraram que a biomolécula prolongou o tempo de sobrevivência de camundongos e peixes-zebra com candidíase. Também reduziu a carga fúngica no rim e no baço, bem como o nível de citocinas inflamatórias.

É importante ressaltar que na maioria dos estudos que envolve o uso de IgY para controlar a disseminação de *C. albicans*, as galinhas foram imunizadas com a levedura inativada (FUJIBAYASHI *et al.*, 2009; IBRAHIM *et al.*, 2008; KAMIKAWA *et al.*, 2016; TAKEUCHI *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2008). Nesse contexto, a produção de anticorpos específicos contra uma única proteína do fungo é mais interessante, uma vez que evita-se a possível reação cruzada com proteínas humanas.

O uso de IgY na imunoterapia e no diagnóstico de doenças confere vantagens em comparação à prática convencional de utilizar anticorpos de mamíferos para tais tecnologias. Uma das vantagens é a redução de dano e sofrimento aos animais, posto que os anticorpos são extraídos dos ovos e não do sangue periférico, como é realizado em mamíferos, representando um refinamento na produção de anticorpos (SCHADE *et al.*, 2005). Por isso, o Centro Europeu para a Validação de Métodos Alternativos, em 1996, recomendou o uso da IgY como um substituto para esses métodos (SCHADE *et al.*, 1996).

Além do benefício ético, a distância filogenética entre frangos e mamíferos soma a favor. Nesse contexto, a IgY pode ser gerada contra proteínas conservadas

de mamíferos e a quantidade de antígeno necessária para desencadear a resposta imune eficiente é muito menor devido à maior imunogenicidade de antígenos de mamíferos quando inoculados em frangos (GASSMANN *et al.*, 1990; LARSSON; CARLANDER; WILHELMSSON, 1998). Seu uso também se torna viável pela diferença da região Fc da IgY com a IgG, uma vez que a imunoglobulina não é capaz de ativar o sistema complemento nem o fator reumatoide de mamíferos, além de não formar complexos imunes com as IgGs (DIAS DA SILVA; TAMBOURG, 2010; CARLANDER *et al.*, 2000). Além disso, a IgY não reage com proteína A de *Staphylococcus*, e nem com a proteína G de *Streptococcus* (KRONVAL *et al.*, 1974; LARSSON; SJÖQUIST, 1988). Destarte, aumenta-se o desempenho das técnicas imunológicas e evita-se efeitos adversos prejudiciais.

Outra vantagem muito importante é o grande rendimento da produção. Cada galinha põe cerca de 300 ovos anualmente, e cerca de 50–100 mg de IgY podem ser obtidos a partir de uma única gema (15 mL), dos quais 2–10% são específicos contra o antígeno alvo (XU *et al.*, 2011; ZHANG, 2003). Deste modo, 22,5 mg de IgY poderiam ser extraídos de uma galinha imunizada ao longo de um ano, o que equivale a IgG produzido por 4,3 coelhos (SCHADE *et al.*, 2005). Além disso, os processos de extração e purificação são relativamente simples e baratos, e o custo de alimentação e manejo de galinhas é consideravelmente menor do que de mamíferos (ALMEIDA *et al.*, 1998; COLEMAN, 1999; DIAS DA SILVA; TAMBOURG, 2010). Por isso, seu uso é econômico, viável e ecologicamente correto, atraindo pesquisadores na área.

## 2.6 HOSPEDEIROS ALTERNATIVOS EM ESTUDOS DE INFECÇÕES POR *Candida*

### 2.6.1 O Uso de Insetos como Modelos Alternativos

Animais vertebrados, como camundongos, coelhos, cachorros e macacos são amplamente utilizados em pesquisas científicas para estudos de patogenicidade microbiana, testes de substâncias de interesse farmacológico, produção de vacinas, avaliação da eficácia de antibióticos e no desenvolvimento de novas terapias (FAGUNDES; TAHA, 2004; GIACOMOTTO; SÉGALAT, 2010; HENDRIKSEN, 2009). Esses animais são sencientes, ou seja, possuem consciência do que lhes acontece. Então, frente a estímulos dolorosos, experimentam também emoções como angústia

e sofrimento (SINGER; XAVIER, 2002). Por isso, a partir de meados de 1800 a sociedade e os pesquisadores começaram a questionar a ética e real necessidade da manutenção dessas práticas, e os primeiros artigos científicos utilizando metodologias alternativas começaram a surgir (WILSON-SANDERS, 2011).

As pesquisas nesse âmbito foram alavancadas a partir da publicação do livro *Princípios da Técnica Experimental Humana* (na língua original *Principles of Humane Experimental Technique*), em 1959, por Russell e Burch (BALLS, 2010; WILSON-SANDERS, 2011). Nesse livro os autores discorreram a respeito do bem-estar animal na pesquisa, como foi mencionado no tópico 2.5.2, e apresentaram à comunidade científica o princípio dos 3Rs. Essa sigla significa “Refinamento” (do inglês *Refinement*), que se propõe a planejar melhor os procedimentos realizados nos animais, de modo a causar o mínimo de dor e/ou estresse possível; “Redução” (do inglês *Reduction*) do número de animais nos experimentos, utilizando técnicas alternativas para obtenção de resultados confiáveis; e “Substituição” (do inglês *Replacement*), que defende a substituição do uso de vertebrados por animais não sencientes (RUSSELL; BURCH, 1959).

A consciência ética foi disseminada para o Brasil também, e a primeira regulamentação a respeito desse assunto foi criada em 1934 (Decreto 24.645/34). Essa discorre sobre a proibição de maus tratos físicos aos animais durante a execução de práticas escolares. Anos mais tarde, a legislação foi um pouco mais específica, abrangendo animais experimentais e mencionando os métodos alternativos como opção. Isso aconteceu em 1998 quando foi criada a lei nº 9.605, que dispõe sobre as práticas consideradas crimes ambientais. Ela criminaliza quem realiza experiência dolorosa ou cruel em animais vivos, ainda que para fins didáticos ou científicos, quando existirem recursos alternativos.

Os insetos têm sido cada vez mais escolhidos como hospedeiros modelos para estudar infecções microbianas (TREVILJANO-CONTADOR; ZARAGOZA, 2014). Isso se deve à presença de um sistema imunológico inato semelhante aos dos vertebrados. Embora as respostas do sistema imunológico dos insetos não sejam específicas, por não produzirem anticorpos, eles possuem um sistema imunológico inato complexo, com elementos celulares e humorais (BROWNE; HEELAN; KAVANAGH, 2013; VILMOS; KURUCZ, 1998). A resposta humoral inata dos insetos é orquestrada por processos que inibem a proliferação de patógenos e auxiliam na sua eliminação, como melanização, coagulação da hemolinfa, indução da síntese de

espécies reativas e peptídeos antimicrobianos (DUBOVSKII *et al.*, 2010; TOKURA *et al.*, 2014). As respostas celulares são mediadas por células chamadas hemócitos, que desempenham um papel importante na defesa, pois estão envolvidas na fagocitose, formação de nódulos e encapsulamento dos patógenos (LAVINE; STRAND *et al.*, 2002).

Embora os insetos não apresentem resposta imune adaptativa, a resposta imune inata pode permanecer mesmo quando o agente imunogênico não está mais presente. O processo é denominado de “*imune priming*” ou “memória primitiva”, e é conhecido por fornecer um efeito profilático, sendo funcionalmente semelhante à resposta imune adaptativa de vertebrados (GÁLVEZ; CHAPUISAT, 2014; MORET; SILVA-JOTHY, 2003; WU *et al.*, 2014). Essa resposta aparenta ser espécie-específica (GOMEZ *et al.*, 2018) e ser passível de transferência aos descendentes, através do ovo, processo denominado de “memória primitiva transgeracional” (DHINAUT; CHOGNE; MORET, 2018; TETREAU *et al.*, 2020).

Pesquisas recentes apontam que os componentes da imunidade inata, como as proteínas imunes, os peptídeos antimicrobianos e a resposta celular estimulada pela enzima fenoloxidase (melanização e produção de radicais livres), estão correlacionados com o aumento da resistência à infecções subsequentes a um determinado patógeno ou à imunidade vertical (VERTYPOROKH; WOJDA; 2020; TETREAU *et al.*, 2020). Na memória primitiva transgeracional os genes imunológicos que são expressos nos adultos, ao entrar em contato com um patógeno, atingem os mesmos níveis de expressão nos ovos (JACOBS *et al.*, 2017).

Além das semelhanças do sistema imunológico dos insetos com dos humanos, o uso desses invertebrados como modelo alternativo também traz vantagens, como a ausência de restrição ética. Além disso, quando comparada aos modelos tradicionais de mamíferos, a criação é mais barata e de fácil manutenção, pois não requer um laboratório sofisticado. Ademais, o ciclo de vida é curto, permitindo experimentos em larga escala em um menor período de tempo (LIONAKIS, 2011; WILSON-SANDERS, 2011). Assim, vários insetos têm sido amplamente utilizados, notadamente, a mosca da fruta *Drosophila melanogaster* (LIONAKIS, 2011; SEGAL; FRENKEL, 2018; WILSON-SANDERS, 2011) e a mariposa *G. mellonella*, conhecida por parasitar colmeias (JEMEL *et al.*, 2020; LIONAKIS, 2011; SEGAL; FRENKEL, 2018; SINGKUM *et al.*, 2019; WILSON-SANDERS, 2011). Adicionalmente, o besouro *T. molitor* (larva da farinha) apresenta características positivas nesse sentido, podendo também ser

utilizado como hospedeiro alternativo para estudo de fungos patogênicos (DE SOUZA, *et al.*, 2015; DE SOUZA, *et al.*, 2018).

### 2.6.2 *Galleria mellonella*

*G. mellonella* é uma mariposa (ordem Lepidóptera), que, em estágio larval, habita colmeias e se alimenta das ceras dos favos. Ela pertence à família Pyralidae e subfamília Galleriinae (GALLO *et al.*, 2002). Esse inseto exibe holometabolismo (metamorfose completa), no qual seu ciclo de vida é composto por 4 fases: embrionária (ovo), larval, de pupa e adulta. Sua duração é de aproximadamente 6-12 semanas a 29-39 °C. Pode variar se as condições ambientais não estiverem favoráveis, contudo, geralmente se tem 4-6 gerações por ano (ELLIS; GRAHAM; MORTENSEN, 2013; KWADHA *et al.*, 2017; WARREN; HUDDLESTON, 1962). As larvas de *G. mellonella* são muito utilizadas como um modelo animal para estudar os fatores de virulência de patógenos bacterianos e fúngicos, resposta imune de insetos, toxicologia e patogênese de doenças (ROSSONI *et al.*, 2019b; SINGKUM *et al.*, 2019).

Nos últimos anos, *G. mellonella* tem sido extensivamente aplicada na avaliação da eficácia antifúngica contra um grande número de espécies de fungos, incluindo *Candida* spp. (ARMES *et al.*, 2017; CRUZ *et al.*, 2018; DE CASTRO SPADARI *et al.*, 2019a; MESA-ARANGO *et al.*, 2013; MORIO *et al.*, 2019; SÁ *et al.*, 2018; SCORZONI *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2018b; STANISZEWSKA *et al.*, 2018; ROSSONI *et al.*, 2019a; ZHANG *et al.*, 2020), *Cryptococcus* spp. (DE CASTRO SPADARI *et al.*, 2019a, 2019b; DE SÁ *et al.*, 2019), *Aspergillus* spp. (GLAMPEDAKIS *et al.*, 2018; MAURER *et al.*, 2015; TREVINO-RANGEL *et al.*, 2019), *Mucorales* (MACEDO *et al.*, 2019; MAURER *et al.*, 2019), *Madurella mycetomatis* (KLOEZEN *et al.*, 2018; LIM *et al.*, 2018), *Trichosporon* spp. (MARINÉ *et al.*, 2015) e *Paracoccidioides* (DE LACORTE *et al.*, 2016).

O inseto também é considerado um modelo de hospedeiro consolidado para o estudo de infecções bacterianas, assim como para teste de antimicrobianos contra esses microrganismos (TSAI; LOH; PROFT, 2016; CUTULI *et al.*, 2019). Ademais, embora ainda haja escassez de trabalhos a respeito do assunto, sua aplicabilidade pode se entender para o estudo das protozooses. A viabilidade de coletar a hemolinfa de *G. melonella* possibilitou que células fagocíticas da larva englobassem

formas promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* durante um ensaio fagocítico *in vitro* (TOMIOTTO-PELLISSIER *et al.*, 2016).

Mais especificamente, em relação à *C. albicans*, *G. mellonella* representa um modelo de hospedeiro consistente, pois a levedura mantém o mesmo padrão de virulência durante infecções sistêmicas em camundongo e no inseto (BRENNAN *et al.*, 2002). Por isso, existem diversos estudos com foco no desenvolvimento de novos fármacos que se beneficiaram com o uso de *G. mellonella* como modelo de avaliação da eficácia *in vivo*. Vários medicamentos, como atorvastatina, um agente redutor do colesterol (AJDIDI *et al.*, 2019), miltefosina, um medicamento contra leishmaniose (DE CASTRO SPADARI *et al.*, 2019a), e miramistina, um antisséptico (OSMANOV; WISE; DENNING, 2019) foram avaliados em uma perspectiva de reaproveitamento. Em outros casos, novos compostos sintéticos ou produtos naturais foram testados *in vivo* no modelo (CRUZ *et al.*, 2018; KAVANAGH; SHEEHAN, 2018; SÁ *et al.*, 2018; STANISZEWSKA *et al.*, 2018; ROSSONI *et al.*, 2019a).

As larvas desse inseto são consideradas mini hospedeiras alternativas propícias por serem pequenas, permitindo o fácil manuseio. O peso adequado para a realização dos experimentos é entre 200-300 mg e o tamanho é aproximadamente 2 cm de comprimento (JEMEL *et al.*, 2020; SINGKUM *et al.*, 2019). Nessas condições é possível preparar um inoculo com volume máximo de 20 µL/larva (JEMEL *et al.*, 2020). A propósito, os resultados dos experimentos são facilmente observados pela melanização das larvas, diminuição da mobilidade e morte (ANDREA; KROGFELT; JENSSEN *et al.*, 2019; TSAI; LOH; PROFT, 2016).

Outra característica importante para seu uso como modelo alternativo é a capacidade de sobrevivência à temperatura corporal humana, 37 °C (LI *et al.*, 2013). É uma vantagem em relação a outros modelos invertebrados que não toleram temperaturas tão altas. *D. melanogaster* sobrevive no máximo a 30 °C e a temperatura de incubação do nematelminto *Caenorhabditis elegans*, extensivamente utilizado como modelo alternativo, não ultrapassa de 25 °C (DESALERMOS; FUCHS; MYLONAKIS, 2012). A temperatura é importante como reguladora da expressão de fatores de virulência dos patógenos. Por exemplo, em *C. albicans* a filamentação é induzida a 37 °C (KADOSH; JOHNSON, 2005; SUDBERY, 2011). Outra vantagem em relação a *C. elegans* refere-se a forma de inoculação, que pode ser realizada por injeção (JEMEL *et al.*, 2020). Nas técnicas utilizando o nematoide como hospedeiro, no entanto, o agente patogênico é adicionado ao poço em que o animal é inoculado,

assim não há exatidão de quantos microrganismos conseguirão infectá-lo (MERKX-JACQUES *et al.*, 2013).

O modelo de *G. mellonella* também apresenta algumas limitações, por exemplo, ao estudar sua genética. O genoma da mariposa ainda não foi totalmente sequenciado. Portanto, há necessidade de métodos estabelecidos disponíveis para criar espécies mutantes e também dados acessíveis em microarranjos ou bibliotecas de RNA de interferência (SINGKUM *et al.*, 2019). Além disso, o maior desafio na pesquisa com *G. mellonella* é a carência de centros de estoque do inseto em condições padrões (SINGKUM *et al.*, 2019). No Brasil, diferente de alguns países, a mariposa não é comercializada, e isso dificulta o seu acesso. Entretanto, apesar de não haver um consenso em relação às condições de criação, como a temperatura e dieta, aqui pode haver um rigor científico um pouco maior nesse quesito, já que as larvas utilizadas pelos pesquisadores são mantidas nas instalações das universidades.

### 2.6.3 *Tenebrio molitor*

*T. molitor*, popularmente conhecido como larva da farinha, pertence à ordem Coleoptera e família Tenebrionidae. É encontrada em todo o mundo, no entanto, possui preferências climáticas por regiões temperadas do hemisfério norte (GHALY; ALKOAİK, 2009; HILL, 2003). O ciclo de vida desse inseto consiste em quatro estágios: ovo, larva, pupa e adulto. (GHALY; ALKOAİK, 2009; HILL, 2003). A duração do ciclo completo é em torno de 40 semanas, podendo se estender, dependendo das condições ambientais (MORALES-RAMOS *et al.*, 2015; TRAN; GNAEDINGER; MÉLIN, 2019).

A alimentação das larvas é feita à base de cereais ou grãos moídos. Assim, este inseto causa grande impacto negativo na agricultura, sendo considerado praga de grãos armazenados (COTTON, 1956; PHILLIPS; THRONE, 2010). As larvas também representam uma excelente fonte de proteína animal e são usadas como alimento (GRAU; VILCINSKAS; JOOP, 2017) para vários animais domésticos ou de zoológico, como peixes (NG *et al.*, 2001) e aves (MARTINSON; FLASPOHLER, 2003; SELALEDI; MBAJIORGU; MABELEBELE, 2020). Além disso, em muitos países, são utilizadas para consumo humano (ADÁMKOVÁ *et al.*, 2017; KIM *et al.*, 2016).

*T. molitor* representa um modelo invertebrado em ascensão. A literatura apresenta o inseto como modelo alternativo potencial para estudar a virulência dos fungos, a toxicidade devido à ingestão de fungos produtores de micotoxinas, as respostas imunológicas do hospedeiro à infecções fúngicas e a ação de compostos antifúngicos (DE SOUZA, *et al.*, 2018; TORRES; COCK; RAMÍREZ; 2020). As larvas de *T. molitor* recentemente foram utilizadas na pesquisa de infecções causadas por fungos de interesse clínico, como *C. albicans*, *Cryptococcus neoformans* (DE SOUZA *et al.*, 2015), *Malassezia furfur* (SILVA *et al.*, 2018a), *Fonsecaea* spp. (BOMBASSARO *et al.*, 2020; FORNARI *et al.*, 2018) e *Rhodotorula mucilaginosa* (JARROS *et al.*, 2020).

Foi possível observar a presença de células de *C. albicans*, *C. neoformans* (DE SOUZA *et al.*, 2015) e *Fonsecaea* spp. (FORNARI *et al.*, 2018) nos tecidos da larva infectada, assim como acontece em mamíferos (DA GLÓRIA SOUZA *et al.*, 2011; EASTMAN *et al.*, 2015; SIQUEIRA *et al.*, 2017; WILSON *et al.*, 2009). Além disso, a morte das larvas infectadas com concentrações crescentes de *C. albicans* e *C. neoformans* seguiu o mesmo padrão nos modelos de infecção utilizando *T. molitor* e *G. mellonella* como hospedeiros (FUCHS, *et al.*, 2010).

O inseto também foi aplicado como hospedeiro invertebrado no estudo de compostos com atividade antifúngica contra *C. tropicalis* (MOREY *et al.*, 2016), e *Cryptococcus* spp. (CORDEIRO *et al.*, 2020; VILLIS *et al.*, 2021). Outrossim, foi utilizado na investigação de alterações fisiológicas devido à ingestão de micotoxinas produzidas por *Aspergillus* spp. (BOSCH *et al.*, 2017; REISS, 1973) *Penicillium expansum*, *Cladosporium herbarum*, *Neurospora sitophila* (REISS, 1973) e *Fusarium* spp. (GUO *et al.*, 2014). Sua aplicabilidade se estende para o estudo de patógenos bacterianos, bem como novas formas terapêuticas de combater as infecções causadas por eles. Estão incluídos as bactérias *Staphylococcus aureus* (COLASSO *et al.*, 2020; DORLING; MORAES; ROLFF *et al.*, 2015; URBAŃSKI; ADAMSKI; ROSIŃSKI, 2018), *Escherichia coli* (SILVA *et al.*, 2020) e *Pseudomonas aeruginosa* (AMORIM *et al.*, 2020; NAM *et al.*, 2020).

*T. molitor* parece ser um bom modelo alternativo para o estudo de infecções microbianas porque, assim como foi relatado para *G. mellonella*, o inseto sobrevive à 37 °C (DE SOUZA, *et al.*, 2015) e o inóculo contendo o patógeno também é administrado por injeção (OPPERT *et al.*, 2012). O besouro compartilha outra característica com a mariposa, permite a extração de um volume considerável de hemolinfa (5–10 µL) para análise. Isso representa uma vantagem sobre outros

organismos modelo, como a mosca da fruta, uma vez que seu tamanho permite a extração de apenas pequenos volumes de hemolinfa (0,05–0,3  $\mu$ L) (PIYANKARAGE *et al.*, 2008). Além disso, o inseto é comercializado no Brasil, não havendo a necessidade de criação própria ou de uma pessoa responsável pela sua manutenção. Mesmo se o grupo de pesquisa decidir criar em condições laboratoriais, esta é mais fácil em comparação à *G. mellonella* (DE SOUZA *et al.*, 2018). Outra vantagem em relação à mariposa, é o seu transcriptoma já conhecido (OPPERT *et al.*, 2012), oferecendo oportunidades para avanços da biologia molecular neste domínio.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Produzir e caracterizar biologicamente anticorpos IgY contra permease de ferro Ftr1 de *C. albicans*, além disso, escrever uma revisão bibliográfica a respeito do uso de *T. molitor* como hospedeiro no estudo de infecções fúngicas.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenhar uma sequência peptídica derivada da permease de ferro Ftr1 de *C. albicans*;
- Em seguida, após requerer a produção do peptídeo por empresa especializada, utilizá-lo como antígeno na produção de anticorpos IgY específicos contra a Ftr1;
- Avaliar a reatividade e avidéz da ligação desses anticorpos ao antígeno;
- Testar os anticorpos contra *C. albicans*;
- Averiguar se os anticorpos possuem atividade fungicida;
- Investigar o efeito antifúngico dos anticorpos, usando as larvas da mariposa *G. mellonella* como modelo invertebrado de infecção;
- Pesquisar acerca do potencial uso das larvas do besouro *T. molitor* para estudo de infecções fúngicas.

#### 4 ARTIGO CIENTÍFICO Nº 1

### **Produção de anticorpos de gemes de ovos (IgY) contra a permease de ferro Ftr1 de *Candida albicans* e avaliação da sua atividade antifúngica usando *Galleria mellonella* como um modelo de infecção sistêmica**

Autores: Patricia Canteri de Souza<sup>a</sup>; Alana Elke do Nascimento Corrêa<sup>a</sup>; Juliana Gutschow Gameiro<sup>b</sup>; Admilton Gonçalves de Oliveira Júnior<sup>a</sup>; Luciano Aparecido Panagio<sup>a</sup>; Emerson José Venancio<sup>c</sup>; Ricardo Sergio Almeida<sup>a\*</sup>.

Afiliação:

<sup>a</sup>: Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina.

<sup>b</sup>: Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina.

<sup>c</sup>: Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina.

Rodovia Celso Garcia Cid, Pr 445, Km 380, Londrina, 86.057-970, Paraná, Brasil.

\*Correspondente: almeidar@uel.br; Tel.: +55-43-3371-4976

## RESUMO

*Candida albicans* é um dos principais agentes patológicos fúngicos. A variedade dos antifúngicos é restrita e a toxicidade limita seu uso. Nesse contexto, imunoterapias contra fungos patogênicos são opções com efeitos adversos reduzidos. Além disso, a permease de ferro de alta afinidade Ftr1 pode ser um novo alvo de ação para terapias contra fungos, pois influencia na virulência de *C. albicans*. Nesse contexto, o objetivo do trabalho foi produzir e realizar a caracterização biológica de anticorpos IgY contra a Ftr1 de *C. albicans*. Galinhas poedeiras foram imunizadas sete vezes com um peptídeo derivado da Ftr1, a IgY foi extraída das gemas dos ovos e purificada. As amostras contendo proteínas foram analisadas por eletroforese. Posteriormente, foi avaliado a reatividade e avidéz da IgY. As atividades antifúngica e fungicida também foram estabelecidas *in vitro*. Finalmente, ensaios de sobrevivência foram realizados utilizando *Galleria mellonella* como um modelo alternativo de hospedeiro. A produção, extração e purificação ocorreram com sucesso. A imunoglobulina foi reativa ao antígeno e a avidéz aumentou de acordo com o número de imunizações. A IgY inibiu o crescimento das cepas de *C. albicans* selvagem e mutante não produtora de Ftr1. Também mostrou ação fungicida contra essas cepas. Isso pode ter acontecido porque provavelmente a IgY se ligou também à Ftr2, outra permease de ferro. Além disso, a sobrevivência das larvas infectadas com a cepa selvagem e tratadas com os anticorpos foi 90% maior do que o grupo que não recebeu tratamento. Portanto, este anticorpo demonstrou apresentar atividade contra *C. albicans*, sendo capaz de aumentar a sobrevivência das larvas infectadas com a levedura.

**Palavras-chave:** imunoglobulina Y; antifúngico; IgY de aves; imunoterapia; hospedeiro invertebrado; via redutiva de aquisição do ferro.

## 1 INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas proporcionam um profundo impacto na saúde humana e leveduras do gênero *Candida* estão entre os principais agentes patológicos de infecções de mucosas e tecidos profundos (BONGOMIN *et al.*, 2017; DE ALBUQUERQUE MARANHÃO, *et al.*, 2019). *Candida albicans* é frequentemente a espécie mais isolada nessas doenças (CANELA *et al.*, 2018; DE ALBUQUERQUE MARANHÃO *et al.*, 2019; DE MEDEIROS *et al.*, 2019). Além disso, estudos epidemiológicos demonstraram que infecções fúngicas sistêmicas causadas por *Candida* spp. estão associados a altas taxas de mortalidade (CANELA *et al.*, 2018; DA SILVA *et al.*, 2019). Essas leveduras comensais fazem parte da microbiota gastrointestinal (BANDARA; PANDUWAWALA; SAMARANAYAKE *et al.*, 2019; NASH *et al.*, 2017) e vaginal humana (KALIA; SINGH; KAUR, 2020; VAN DE WIJGERT *et al.*, 2014) e, em situações de depressão do sistema imunológico ou instabilidade da microbiota, podem se multiplicar de forma inadequada, causando manifestações clínicas (BANDARA; PANDUWAWALA; SAMARANAYAKE *et al.*, 2019; KALIA; SINGH; KAUR, 2020).

Uma forma de inibir a multiplicação de patógenos é restringir o acesso aos nutrientes. Nesse contexto, o ferro é um micronutriente essencial para quase todos os organismos vivos (PHILPOTT, 2006; SUTAK *et al.*, 2008). As enzimas que contêm ferro são vitais para processos biológicos, incluindo o transporte de oxigênio, a respiração celular, a síntese de DNA e o metabolismo (WELCH; VAN EDEN; AUST, 2001). Sua forma solúvel e biodisponível, o estado ferroso ( $Fe^{2+}$ ), pode ser tóxico em altas concentrações devido à formação de radicais livres (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1984). Conseqüentemente, os organismos vivos desenvolveram mecanismos para manter a homeostase do ferro nas células evitando sua toxicidade (WANG; PANTOPOULOS, 2011) e restringindo o acesso a patógenos invasores (NAIRZ; WEISS, 2020). Portanto, o corpo humano carrega esse metal em várias proteínas, com grande quantidade na hemoglobina, responsável pelo transporte de oxigênio (D'ALESSANDRO *et al.*, 2017), na ferritina, responsável pelo armazenamento do ferro intracelular (HARRISON; AROSIO, 1996), e a transferrina, responsável pelo transporte desse metal até os tecidos (PIETRANGELO, 2002).

Ao mesmo tempo, os microrganismos patogênicos co-evoluíram e desenvolveram diversos mecanismos para adquirir ferro do hospedeiro e conseguir

se estabelecer no tecido infectado (CAZA; KRONSTAD, 2013; FOURIE *et al.*, 2018). Essa capacidade é um fator de virulência (GERWIEN *et al.* 2018). Portanto, *C. albicans* possui três maneiras de adquirir ferro do hospedeiro: (i) por meio da via redutora, (ii) por meio de receptores de ferro para hemoglobina e (iii) por meio de um transportador de sideróforo. No primeiro estágio da infecção, o fungo adere às células hospedeiras e utiliza ferro principalmente do meio ambiente, de xenosideróforos (HU *et al.*, 2002) ou das proteínas transferrina (KNIGHT *et al.*, 2005) e ferritina (ALMEIDA *et al.*, 2008) através da via redutora. Em um estágio avançado de infecção, quando há mais danos aos tecidos, o fungo adquire ferro da hemoglobina (CHEN *et al.*, 2011; CHEN *et al.*, 2013). A absorção de ferro também pode ocorrer por sideróforos heterólogos (CHEN *et al.*, 2011; CHEN *et al.*, 2013). São peptídeos com alta afinidade pelo ferro, produzidos por algumas bactérias e fungos, e utilizados por *C. albicans* para obter ferro em condições comensais, na cavidade oral do hospedeiro, por exemplo (HEYMANN *et al.*, 2002).

A via de redução do ferro consiste em três conjuntos de proteínas transmembranares: redutases férricas, oxidases multi-cobre e permeases de ferro. As redutases férricas são as primeiras a atuar neste sistema, pois transformam o ferro insolúvel extracelular (férrico -  $Fe^{3+}$ ) em sua forma solúvel (ferroso -  $Fe^{2+}$ ) (HAMMACOTT; WILLIAMS; CASHMORE, 2000). Para prevenir a toxicidade, o  $Fe^{2+}$  é oxidado a  $Fe^{3+}$  pela atividade de oxidases multicobre (DE LUCA; WOOD, 2000; KOSMAN, 2003). Tais oxidases multi-cobre são acopladas às permeases de ferro, formando um complexo, pelo qual ocorre transferência do ferro para as permeases e, através delas, o transporte para a célula (KNIGHT *et al.*, 2002; RAMANAN; WANG, 2000; ZIEGLER *et al.*, 2011).

Nesse contexto, *C. albicans* produz a permease de ferro de alta afinidade Ftr1 em condições de escassez desse metal (RAMANAN; WANG, 2000). A Ftr1 é uma proteína de suma importância, pois é essencial para a manutenção da virulência fúngica, enquanto muitas das proteínas responsáveis pelo ganho de ferro não interferem na patogenicidade de *C. albicans*, por mecanismos compensatórios (RAMANAN; WANG, 2000; ALMEIDA *et al.*, 2009). A proteína Ftr1 consiste em sete domínios que atravessam a membrana plasmática da levedura e formam um canal pelo qual o ferro penetra (ZIEGLER *et al.*, 2011). Esta proteína possui três motivos peptídicos importantes, Arg-Glu-Gly-Leu-Glu (REGLE), Arg-Glu-Ser-Leu-Glu (RESLE) e Asp-Ala-Ser-Glu (DASE), que podem ser direcionados para a ação de novos

antifúngicos. Os motivos REGLE e RESLE são locais ligantes de ferro e são essenciais para a funcionalidade da proteína (FANG; WANG, 2002). São localizados nos domínios 1 e 4, respectivamente (ZIEGLER *et al.*, 2011). O motivo DASE, por outro lado, está localizado em uma alça extracelular da proteína e é responsável por receber ferro da multi-oxidase de cobre (ZIEGLER *et al.*, 2011).

Recentemente, relatos mostraram um grande aumento na incidência de fungos patogênicos resistentes aos antifúngicos disponíveis, incluindo espécies do gênero *Candida*. Além disso, a variedade de antifúngicos é restrita e a toxicidade limita seu uso (COLOMBO; DE ALMEIDA JÚNIOR; GUINEA, 2017; FISHER *et al.*, 2018). Por este motivo, a comunidade científica necessita com urgência desenvolver novas estratégias terapêuticas para o tratamento das infecções fúngicas, incluindo novos alvos terapêuticos. Nesse sentido, o uso medicinal de anticorpos é aplicável uma vez que é possível produzir anticorpos específicos contra certas estruturas microbianas, diminuindo os efeitos adversos (BONICHE *et al.*, 2020; DATTA *et al.*, 2015; ZHANG, 2003).

O uso de anticorpos de aves em imunoterapia tem ganhado cada vez mais espaço (LEIVA *et al.*, 2020) uma vez que as imunoglobulinas Y (IgY), produzidas por galinhas, são funcionalmente semelhantes às imunoglobulinas G (IgG) de mamíferos (TAYLOR; SUTTON; CALVERT, 2010). Elas podem ser extraídas das gemas de ovos de galinhas poedeiras, e não é necessário extrair o sangue, como acontece com os mamíferos. Portanto, a dor e o sofrimento dos animais são reduzidos (SCHADE *et al.*, 2005). É importante notar que o uso de IgY para o tratamento de doenças apresenta várias vantagens sobre os IgGs. A produção é mais lucrativa. Além disso, as imunoglobulinas aviárias não se ligam aos receptores das frações constantes dos anticorpos de mamíferos, não ativam o sistema complemento ou o fator reumatoide e não formam complexos imunes com IgGs (DIAS DA SILVA; TAMBOURG, 2010).

Portanto, sabendo que a permease de ferro de alta afinidade Ftr1 não possui homologia com proteínas humanas, este trabalho teve como objetivo produzir e caracterizar biologicamente anticorpos IgY contra permease de ferro Ftr1 de *C. albicans*.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 PRODUÇÃO DE ANTÍGENO

No presente estudo, escolhemos o motivo DASE pertencente à permease de ferro de alta afinidade Ftr1 de *C. albicans* SC5314 para compor o antígeno. No processo de produção, mais 4 aminoácidos foram adicionados antes e 4 após o motivo, totalizando um peptídeo de 12 aminoácidos (KTGG**DASE**NGSG). Dessa forma, foram produzidas duas moléculas, uma conjugada com a proteína carreadora “*Keyhole Limpet Hemocyanin*” - KLH (KLH-C-KTGG**DASE**NGSG) e a outra com Albumina de Soro Bovino - BSA (BSA-C-KTGG**DASE**NGSG). Essas moléculas foram sintetizadas por uma empresa especializada, a BioMatic (Cambridge, Canadá), e adquiridas por seu representante FastBio (Ribeirão Preto, Brasil). Além disso, foi realizada uma pesquisa utilizando a Ferramenta de Busca de Alinhamento Local Básico - BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) para comparar a sequência peptídica do antígeno com proteínas de microrganismos de importância clínica.

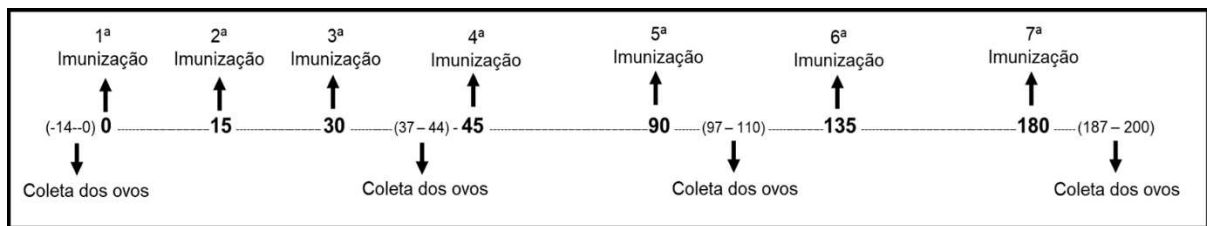
### 2.2 ANIMAIS

Duas galinhas poedeiras (*Gallus gallus domesticus*) da linhagem “*White Leghorn*”, com 20 semanas de idade, foram usadas para produzir o IgY. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais nas dependências da Fazenda Escola da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Elas foram mantidas em temperatura ambiente, com 17 h de luz/dia, e receberam ração industrializada (Purina, Brasil) e água potável à disposição. Os animais foram mantidos de acordo com as condições éticas de bem-estar animal. A execução deste experimento foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UEL (protocolo nº 3205.2018.52).

As mariposas *Galleria mellonella* foram cultivadas no Laboratório de Métodos Alternativos de Experimentação Animal da UEL. Os insetos foram mantidos em potes arejados, colocados em incubadora, a 28 °C, na ausência de luz. No teste de sobrevivência, foram utilizadas larvas da mariposa saudáveis, que eram de cor creme e sem manchas marrons. Além disso, o peso dessas larvas variou entre 210-250 mg.

### 2.3 IMUNIZAÇÃO DE GALINHAS POEDEIRAS

As galinhas poedeiras foram imunizadas com o peptídeo derivado de Ftr1 de *C. albicans* (PFCA) conjugado com KLH. Os animais foram inoculados por via intramuscular em quatro pontos dos músculos peitorais. Foi realizada uma primeira imunização, na qual as aves foram inoculadas com 200 µg do antígeno em uma mistura (v/v) com adjuvante completo de Freund (Sigma-Aldrich, St. Lois, EUA). Outras seis doses de reforço foram administradas (Figura 1) nos dias 15, 30, 45, 90 e 135 e 180 após a primeira imunização (DE ANDRADE *et al.*, 2013). Na preparação das doses de reforço foi utilizado o adjuvante incompleto de Freund (Sigma-Aldrich, St. Lois, EUA). Os ovos foram coletados diariamente, no período de uma a duas semanas, a partir dos sete dias após a terceira, quinta e sétima imunizações. Também foram coletados ovos produzidos por essas galinhas antes das imunizações, cuja IgY extraída foi utilizada como controle.



**Figura 1** - Cronograma de imunizações e coleta de ovos de poedeiras inoculadas com um peptídeo de *C. albicans* derivado da permease de alta afinidade Ftr1. Os números correspondem aos dias, sendo no dia 0 (zero) a primeira imunização. Antes disso, os ovos foram coletados para serem usados como controle negativo.

### 2.4 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE IGY

O protocolo de precipitação de sulfato de amônio de Akita e Nakai (1992) foi usado para extrair anticorpos IgY, com adaptações. Primeiramente, as gemas foram separadas das claras e das películas protetoras. Em seguida, foram diluídas na proporção 1:7 em água (pH final 5,1). Após incubação por 18 h a 4 °C, a solução foi filtrada em papel filtro Whatman nº 1 para separar as frações das proteínas solúveis dos grânulos lipídicos. Após a filtração, foi realizada a precipitação das proteínas induzidas por sal, incubando a amostra por 30 min com sulfato de amônio (Vetec, Duque de Caxias, Brasil) na concentração final de 33%. A seguir, a solução foi centrifugada e lavada com 8 mL/gema de sulfato de sódio a 18% (Fmaia, Belo Horizonte, Brasil). Após uma segunda centrifugação, a amostra foi lavada com 8

mL/gema de sulfato de sódio a 14%. As gemas foram centrifugadas novamente e diluídas em solução salina tamponada com fosfato - PBS (NaCl 132 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10,0 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,76 mM, pH 7,4).

Após extração, a concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976) usando BSA (Sigma-Aldrich, St. Lois, EUA) como proteína de referência. A absorbância a 595 nm, após 30 min de reação com a solução de Bradford, foi medida utilizando um espectrofotômetro (Synergy HT, Biotek, EUA).

## 2.5 PURIFICAÇÃO DOS ANTICORPOS, CONCENTRAÇÃO E ELETROFORESE

Os anticorpos extraídos após sete imunizações (IgY anti-Ftr1) foram purificados por cromatografia de exclusão molecular (BALARAMAN; RATHNASAMY, 2020) usando resina Sephadex G-100 (Sigma-Aldrich, St. Lois, EUA) como a fase sólida e PBS como fase líquida. O fluxo do tampão foi mantido em 1,2 mL/min, sendo coletado da coluna cromatográfica em frações de volumes equivalentes a 2 mL. Cada amostra foi numerada de acordo com a sequência de coleta. Em seguida, as amostras foram analisadas em espectrofotômetro de microplaca (Synergy HT, Biotek, EUA) a 280 nm. As amostras contendo proteínas ou peptídeos foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) a 10% e coradas com azul brilhante de Coomassie (Vetec, Duque de Caxias, Brasil). Após essa etapa, as amostras foram concentradas por filtração utilizando um filtro de ultracentrífuga Amicon® com poros de 50 kDa (Merck, Darmstadt, Alemanha). Por fim, a concentração de anticorpos foi novamente aferida pelo método de Bradford.

## 2.6 DETERMINAÇÃO DA REATIVIDADE DOS ANTICORPOS

Os títulos da IgY anti-Ftr1 (não purificada) foram determinados pelo ensaio de imununoabsorção enzimática (ELISA) indireto, de acordo com da Silva e colaboradores (2018). Placas de imunoensaio de 96 poços (Corning Costar Corporation, Acton, MA, EUA) foram sensibilizadas com 5 µg/poço do peptídeo derivado de *C. albicans* Ftr1 (PCAF) conjugado com BSA, diluído em 100 µL de tampão de carbonato/bicarbonato (0,5 M, pH 9,6). Em seguida, as placas foram incubadas por 18 h a 4 °C. Posteriormente, a reação foi bloqueada com 100 µL/poço de PBS-leite desnatado 5% por 2 h a 37 °C, e os poços foram lavados com PBS. Após este procedimento, 100 µg/poço de amostras de IgY (pré, 3<sup>a</sup>, 5<sup>a</sup> e 7<sup>a</sup> imunizações),

diluídas em 100 µL de PBS-1% leite desnatado, foram adicionadas aos poços, e as placas foram incubadas por 1 h a 37 °C.

Em seguida, a lavagem foi realizada com PBS-Tween 20 (PBST) (Synth, Diadema, Brasil) a 0,05%. Logo, as placas foram cobertas com 100 µL/poço de IgG de coelho anti-IgY de galinha conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich, St. Lois, EUA), diluído 1:40.000 em PBS-1% de leite desnatado, seguido de incubação por 1 h em 37 °C. Posteriormente, as placas foram lavadas com PBST, em seguida, foi adicionado 100 µL/poço de tampão substrato de acetato de sódio (Fmaia, Belo Horizonte, Brasil), a 0,1 M, pH 5,2, contendo 0,1 mg/mL de tetrametilbenzidina (Sigma-Aldrich, St. Lois, EUA) e peróxido de hidrogênio 0,005% (Fmaia, Belo Horizonte, Brasil). As placas foram incubadas durante 20 min à temperatura ambiente na ausência de luz. Por fim, foram adicionados 50 µL/poço de ácido sulfúrico 2N (Vetec, Duque de Caxias, Brasil) e a absorbância determinada em espectrofotômetro de microplaca (Synergy HT, Biotek, EUA) a 450 nm. As reatividades de anticorpos foram expressas em unidades de densidade óptica (DO).

## 2.7 DETERMINAÇÃO DA AVIDEZ DE ANTICORPOS

A avidéz dos anticorpos (não purificados) foi determinada conforme descrito por Bollen e colaboradores (1996) com alterações. As placas foram sensibilizadas com 1 µg/poço de PCAF conjugado ao BSA, diluído em 100 µL de tampão carbonato/bicarbonato (0,5 M, pH 9,6). Então elas foram incubadas por 18 h a 4 °C. Após o bloqueio da reação com PBS-leite desnatado a 5% e lavagem com PBS, 50 µL das amostras de IgY (pré, 3<sup>a</sup>, 5<sup>a</sup> e 7<sup>a</sup> imunizações) a uma concentração de 250 µg/mL, diluídas em PBS-1% de leite desnatado, foram adicionadas aos poços. Em seguida, foram adicionados 50 µL de soro fisiológico ou 50 µL de ureia 6 M, com tempo de incubação de 1 h, a 37 °C. Nas demais etapas de incubações, aplicação do anticorpo secundário e revelação, foi seguido o mesmo protocolo da seção anterior (2.6). Os índices de avidéz (IA) foram expressos em porcentagem, definidos como a DO média de [(poços com ureia/poços com solução salina) x 100] (HEDMAN; ROUSSEAU, 1989). Valores abaixo de 30% foram classificados como baixa avidéz, entre 30 e 50% como moderada e mais de 50% como alta.

## 2.8 CEPAS DE FUNGOS E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

Duas cepas de *C. albicans* foram utilizadas nos testes: a cepa selvagem SC5314, que foi gentilmente doada pelo Dr. Bernhard Hube, Friedrich Schiller University, Jena, Alemanha; e a cepa mutante,  $\Delta ftr1$  (genótipo *ftr1* $\Delta::URA3/ftr1$  $\Delta::ARG4$ ), que foi cortesia do Dr. Yue Wang, Instituto de Biologia Celular e Molecular, Cingapura. É importante notar que a cepa não produtora de Ftr1 ( $\Delta ftr1$ ) era capaz de produzir outra permease de ferro, a Ftr2. As leveduras foram armazenadas em glicerol (Synth, Diadema, Brasil) a 40% como crioprotetor e estocadas a -80 °C. Os pré-inóculos das leveduras foram obtidos cultivando-as por 16-18 h, sob agitação, a 30 °C, em caldo “Yeast Nitrogen Base” - YNB (BD, New Jersey, USA). Para a preparação do meio de cultura foram utilizados 6,7 g/L de YNB mais 20 g/L de dextrose (INLAB, São Luiz, Brasil) e 23,8 g/L de tampão HEPES (Sigma-Aldrich, St. Lois, EUA). O pH foi ajustado para 7,2. As células foram lavadas três vezes com PBS antes de serem utilizadas nos experimentos.

## 2.9. TESTE DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO PARA AVALIAR A ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS ANTICORPOS

A avaliação da atividade antimicrobiana da IgY foi realizada por meio do teste de microdiluição em caldo, segundo Almeida e colaboradores (2008), com modificações. Os testes foram feitos com a IgY anti-Ftr1 antes e depois da purificação e concentração. Além disso, IgY purificado e concentrado (PC) das galinhas não imunizadas foi usado como controle. Em placas de 96 poços (kasvi, São José do Pinhais, Brasil), foram adicionados 50  $\mu$ L/poço de YNB. O meio era puro ou acrescido de diferentes concentrações do quelante de ferro extracelular ácido batofenantrolindissulfônico - BPS (Sigma-Aldrich, St. Lois, EUA): 6,3, 12,5 e 25,0 mM, para induzir a expressão do gene *ftr1*. Foi adicionada IgY aos poços das colunas 1 a 9, com diluições seriadas realizadas com proporção igual a dois, de forma que as concentrações variaram de 3,9  $\mu$ g/mL a 1 mg/mL. Suspensões contendo  $2 \times 10^4$  células/mL de *C. albicans* SC5314 e  $\Delta ftr1$  foram preparadas em YPD com as concentrações de BPS. Em seguida, foram adicionados 50  $\mu$ L/poço dessas suspensões até o poço 11. Sendo este último o controle do eluente da imunoglobulina e a coluna 10 o controle positivo.

A esterilidade do meio foi testada (controles negativos) nos poços da coluna 12, nos quais apenas YNB ou as concentrações de YNB + BPS foram adicionadas. As placas foram incubadas a 37 °C e, após 48 horas, foram lidas por espectrofotometria, utilizando um comprimento de onda de 530 nm em um leitor de placas múltiplas (Synergy HT, Biotek, EUA). Assim, foram determinadas as concentrações mínimas dos anticorpos capazes de inibir 90% (CIM<sub>90</sub>) e 50% (CIM<sub>50</sub>) do crescimento do fungo. É importante notar que antes de iniciar este e os próximos experimentos (tópicos 2.10, 2.12 - 2.14), os anticorpos foram esterilizados por filtração através de um filtro estéril de 0,22 µm (Sartorius Stedim, Goettingen, Alemanha).

## 2.10 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA

A concentração fungicida mínima (CFM) foi determinada de acordo com o protocolo Espinel-Ingroff (2002) com pequenas adaptações. 20 µL de cada poço com pelo menos 90% de inibição do crescimento fúngico foram removidos dos poços e cultivados em placas de Petri contendo meio ágar “*Yeast extract, Peptone, and Dextrose*” - YPD [1% de extrato de levedura (Neogen, Lancashire, Reino Unido), 2% de peptona (HiMedia, Mumbai, Índia), 2% dextrose (INLAB, São Luiz, Brasil)]. As placas foram incubadas durante 48 h a 30 °C. As concentrações fungicidas mínimas foram definidas como as diluições mais baixas dos anticorpos nas quais houve uma ausência completa de crescimento, ou no máximo três colônias foram contadas.

## 2.11 ENSAIO DE SOBREVIVÊNCIA EM *G. MELLONELLA*

Um modelo de infecção de invertebrados foi usado para avaliar a atividade antifúngica da IgY durante uma infecção sistêmica. Os experimentos foram conduzidos de acordo com Li e colaboradores (2013). As larvas de *G. mellonella* foram inoculadas por injeção na última pró-perna esquerda, com  $1 \times 10^5$  levedura/5 µL/larva. Uma seringa Hamilton (701 N, calibre 26, capacidade de 10 µL) foi usada para fazer isso. Outras larvas, após infectadas, receberam 5 µL da IgY PC anti-Ftr1 ou pré-imune. Os anticorpos foram injetados na última pró-perna direita. As concentrações foram as seguintes: 8, 16 e 80 mg/kg. Também foi incluído um grupo controle que recebeu apenas inóculo de PBS. Outros grupos receberam as imunoglobulinas e PBS. Cada grupo continha 10 larvas escolhidas aleatoriamente. Após a injeção, as larvas

foram incubadas a 37 °C em placas de Petri, monitoradas por 10 dias, e o número de larvas mortas foi registrado diariamente.

## 2.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O programa GraphPad Prism 7.0 foi usado para realizar as análises estatísticas. Os experimentos *in vivo* foram realizados em triplicata, os resultados foram arranjados em uma curva de sobrevivência usando o método de Kaplan-Meier e a análise estatística foi realizada utilizando o teste de log-rank. Em contrapartida, os experimentos *in vitro* foram realizados em pelo menos duplicatas e em três ocasiões diferentes. A normalidade da distribuição dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade das variâncias pelo teste de Brown-Forsythe. Os resultados obtidos foram expressos em média e desvio padrão e comparados por ANOVA para medidas repetidas, seguida do teste de Tukey. As diferenças foram significativas quando  $p < 0,05$ .

## 3. RESULTADOS

### 3.1 DESENHO DO ANTÍGENO

Apesar da importância dos motivos RESLE e REGLE para a atividade da permease de ferro Ftr1, eles estão localizados internamente na membrana plasmática (ZIEGLER *et al.*, 2011). Portanto, no presente estudo, escolhemos o motivo DASE para compor o antígeno por se localizar em uma região propícia à ligação do anticorpo. Houve a necessidade de expandir o tamanho do antígeno para um total de 12 aminoácidos, aumentando assim a probabilidade de reconhecimento pelas células B. No entanto, o tamanho do antígeno ainda não seria grande o suficiente, pois teria uma massa molecular de aproximadamente 1,06 kDa, e imunógenos naturais contêm uma massa molecular superior à 5,00 kDa (ADRIAN, 1997).

Uma vez que um imunógeno requer um sítio antigênico e um sítio de ligação para o receptor de células T, existe um tamanho mínimo necessário para sua produção (GERMAIN, 1986). Por isso, foi necessário conjugar o antígeno com a proteína carreadora KLH. Mais especificamente, KLH é uma proteína respiratória extracelular que contém cobre. É extraída da hemolinfa de um molusco marinho,

*Megathura crenulata*, e possui alta massa molecular (aproximadamente  $1 \times 10^3$  a  $1 \times 10^4$  kDa) (HARRIS; MARKL, 1999). Pesquisadores costumam a utilizar para estimular a resposta imune humana (DEL CAMPO, 2011) ou de aves (KOUSTED, 2017) durante a produção de anticorpos de interesse biomédico.

### 3.2 COMPARAÇÃO DO ANTÍGENO COM PROTEÍNAS DE MICRORGANISMOS DE IMPORTÂNCIA CLÍNICA

Em pesquisa realizada no BLAST (Tabela 1), identificamos várias espécies de *Candida* (*C. dubliniensis*, *C. orthopsilosis*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. viswanathi*, *C. auris*, *C. duobushemulonii*, *C. haemulonii*, *C. inconspicua*, *C. intermedia* e *C. pseudohaemulonii*) que produzem proteínas com altas porcentagens ( $\geq 83,33\%$ ) de identidade em relação ao antígeno (KTGGDASENGSG). Muitas dessas proteínas são permeases de ferro da membrana plasmática. Outras espécies de levedura clinicamente importantes possuem as mesmas características: *Meyerozyma guilliermondii*, *Lodderomyces elongisporus*, *Pichia kudriavzevii*, *Cladophialophora carrionii*, *Millerozyma farinosa*, *Debaryomyces fabryi*, *Debaryomyces hansenii*, *Diutina rugosae* e *Exophiala dermatitidis*.

**Tabela 1**

Comparação entre a sequência peptídica do antígeno (KTGGDASENGSG) derivado da Ftr1 de *C. albicans* SC5314 com proteínas de outros microrganismos.

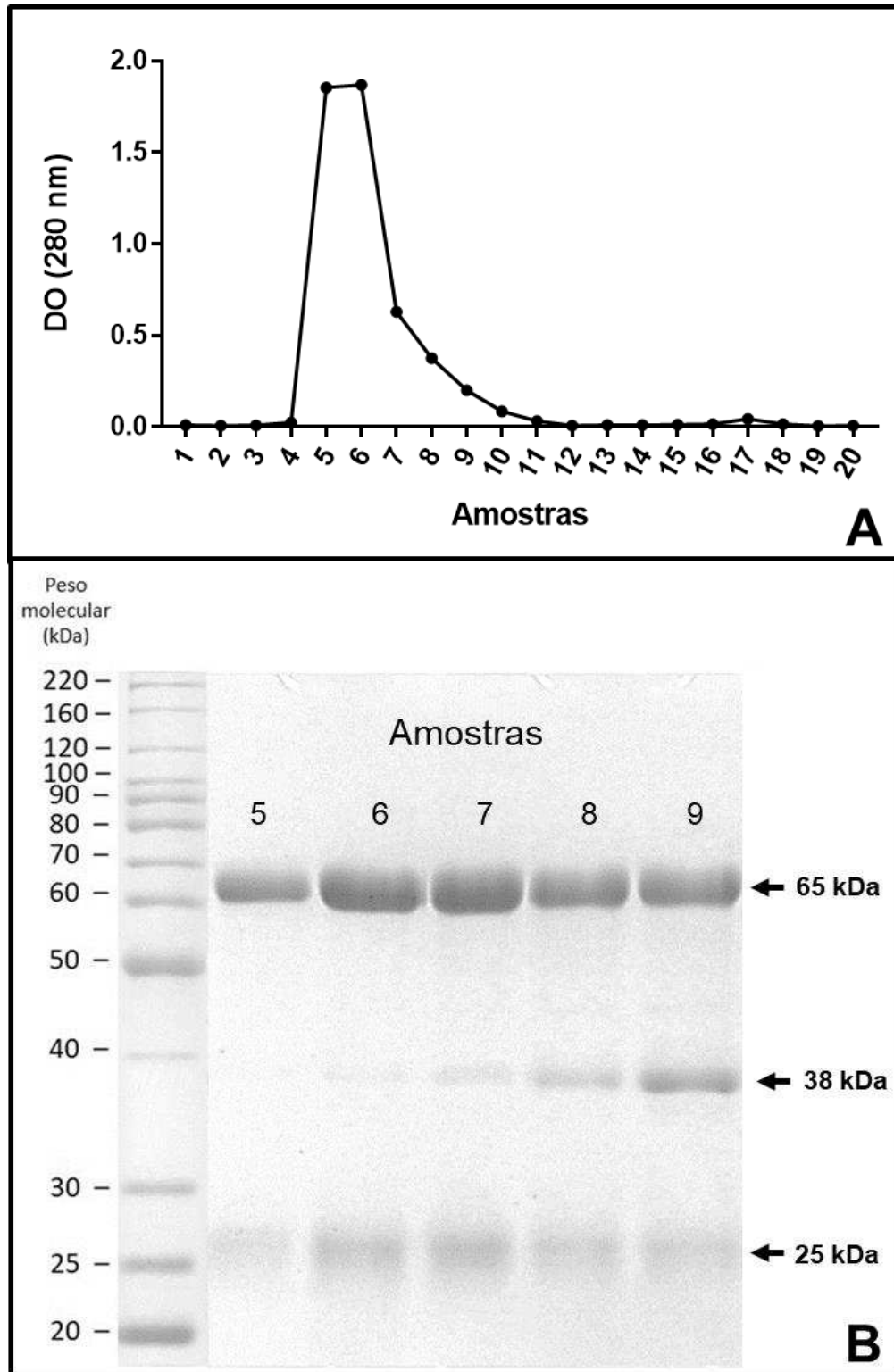
| Microrganismo                    | Proteína                                      | Identidade (%) | Acesso         |
|----------------------------------|---|----------------|----------------|
| <i>Candida albicans</i> SC5314   | Ftr1  | 100,00         | XP_715020.1    |
| <i>Candida albicans</i> SC5314   | Ftr2  | 91,67          | XP_715031.1    |
| <i>Candida auris</i>             | Proteína não caracterizada CJI97_002299       | 100,00         | XP_028889565.1 |
| <i>Candida auris</i>             | Proteína não caracterizada CJI97_003073       | 91,67          | XP_028890321.1 |
| <i>Candida dubliniensis</i> CD36 | Permease de ferro de alta afinidade, putativa | 100,00         | XP_002417949.1 |
| <i>Candida dubliniensis</i> CD36 | Permease de ferro de alta afinidade, putativa | 91,67          | XP_002417958.1 |
| <i>Candida duobushaemulonii</i>  | Proteína não caracterizada CXQ87_003030       | 100,00         | XP_025336133.1 |
| <i>Candida haemulonii</i>        | Proteína hipotética CXQ85_002349              | 91,67          | XP_025341495.1 |
| <i>Candida haemulonii</i>        | Proteína hipotética CXQ85_002598              | 100,00         | XP_025343814.1 |
| <i>Candida inconspicua</i>       | Proteína hipotética CANINC_001893             | 91,67          | TID29498.1     |
| <i>Candida inconspicua</i>       | Proteína hipotética CANINC_002638             | 91,67          | TID28205.1     |
| <i>Candida intermedia</i>        | CIC11C00000001783                             | 91,67          | SGZ51050.1     |
| <i>Candida intermedia</i>        | CIC11C00000001943                             | 91,67          | SGZ52803.1     |
| <i>Candida intermedia</i>        | CIC11C00000005194                             | 91,67          | SGZ56652.1     |
| <i>Candida intermedia</i>        | CIC11C00000005490                             | 91,67          | SGZ56488.1     |

|   |  |        |                |
|---|--|--------|----------------|
| <i>Candida orthopsilosis</i> Co 90-125        | Ftr1                                     | 91,67  | XP_003870888.1 |
| <i>Candida orthopsilosis</i> Co 90-125        | Proteína hipotética CORT_0H01950         | 91,67  | XP_003871432.1 |
| <i>Candida parapsilosis</i>                   | Ftr1                                     | 91,67  | XP_036668213.1 |
| <i>Candida parapsilosis</i>                   | Proteína não caracterizada CPAR2_805630  | 91,67  | XP_036665187.1 |
| <i>Candida pseudohaemulonii</i>               | Proteína hipotética C7M61_004160         | 100,00 | XP_024712456.1 |
| <i>Candida pseudohaemulonii</i>               | Proteína hipotética C7M61_000559         | 91,67  | XP_024715594.1 |
| <i>Candida tropicalis</i> MYA-3404            | Permease de ferro de membrana plasmática | 91,67  | XP_002549392.1 |
| <i>Candida viswanathii</i>                    | Permease de ferro de membrana plasmática | 91,67  | RCK63925.1     |
| <i>Candida viswanathii</i>                    | Permease de ferro de membrana plasmática | 91,67  | RCK63062.1     |
| <i>Cladophialophora carrionii</i>             | Proteína hipotética G647_09046           | 91,67  | XP_008731573.1 |
| <i>Cladophialophora carrionii</i>             | Permease de ferro de membrana plasmática | 91,67  | OCT50135.1     |
| <i>Debaryomyces fabryi</i>                    | Proteína não caracterizada AC631_00109   | 100,00 | XP_015470340.1 |
| <i>Debaryomyces fabryi</i>                    | Proteína não caracterizada AC631_04630   | 100,00 | XP_015465711.1 |
| <i>Debaryomyces hansenii</i> CBS767           | DEHA2D04554p                             | 91,67  | XP_458664.1    |
| <i>Debaryomyces hansenii</i> CBS767           | DEHA2E12628p                             | 100,00 | XP_459854.2    |
| <i>Diutina rugosa</i>                         | Proteína não caracterizada DIURU_001993  | 83,33  | XP_034013126.1 |
| <i>Diutina rugosa</i>                         | Proteína não caracterizada DIURU_001081  | 91,67  | XP_034014104.1 |
| <i>Exophiala dermatitidis</i> NIH/UT8656      | Transportador de ferro de alta afinidade | 83,33  | XP_009156888.1 |
| <i>Lodderomyces elongisporus</i> NRRL YB-4239 | Permease de ferro de membrana plasmática | 91,67  | XP_001524127.1 |
| <i>Meyerozyma guilliermondii</i> ATCC 6260    | Proteína hipotética PGUG_03365           | 91,67  | XP_001483984.1 |
| <i>Meyerozyma guilliermondii</i> ATCC 6260    | Proteína hipotética PGUG_04984           | 100,00 | XP_001483029.1 |
| <i>Millerozyma farinosa</i> CBS 7064          | Piso0_001945                             | 100,00 | CCE82232.1     |
| <i>Pichia kudriavzevii</i>                    | Ftr1                                     | 91,67  | AWT08581.1     |
| <i>Pichia kudriavzevii</i>                    | Permease de ferro de membrana plasmática | 91,67  | ONH70445.1     |

Pesquisa feita na ferramenta de pesquisa de alinhamento local básico (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)

### 3.3 PURIFICAÇÃO DA IGY ANTI-FTR1 E ELETROFORESE

Na cromatografia de exclusão molecular, foi possível identificar proteínas presentes nas amostras 5, 6, 7, 8 e 9 (Figura 2A). Através da análise eletroforética dessas amostras, foram detectadas bandas correspondentes à cadeia pesada (65 kDa) e cadeia leve (25 kDa) de IgY, confirmando o sucesso da extração. Além disso, foi observada uma banda contaminante de 38 kDa nas amostras 6, 7, 8 e 9. No entanto, a amostra IgY 5 foi obtida com maior grau de pureza (Figura 2B). Portanto, usamos essa amostra de IgY nas próximas etapas do estudo.

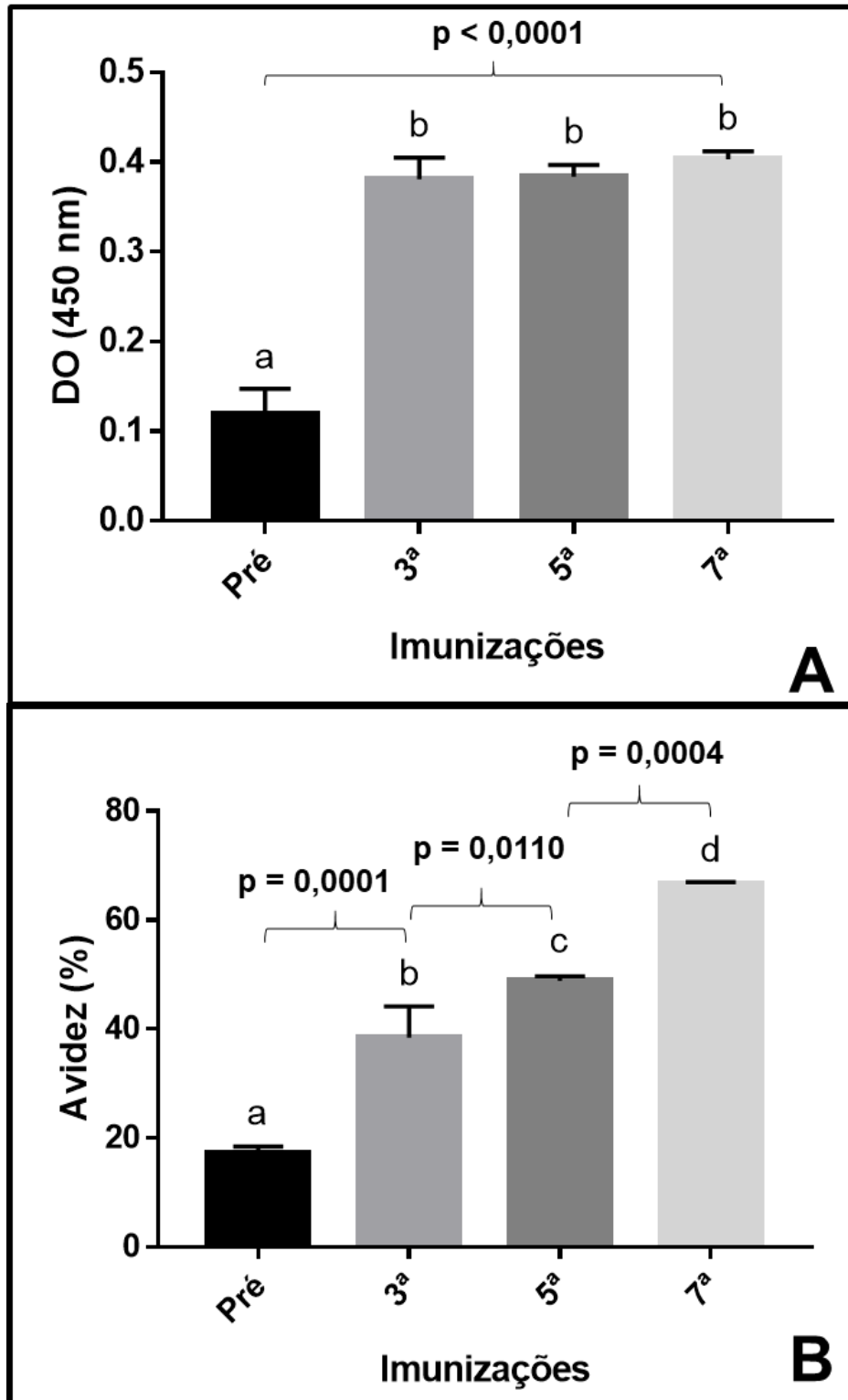


**Figura 2** - Purificação da IgY anti-Ftr1 por cromatografia de exclusão molecular (**A**). Análise eletroforética usando SDS-PAGE a 10% e coloração com azul brilhante de Coomassie (**B**). A presença de proteínas foi observada nas amostras 5, 6, 7, 8 e 9 coletadas na cromatografia (leitura de absorvância em 280 nm). Através do perfil eletroforético foi identificada a presença de IgY e um contaminante, exceto na amostra 5. DO: densidade óptica.

### 3.4 REATIVIDADE E AVIDEZ DOS ANTICORPOS

Os resultados obtidos pelo ELISA mostraram que as galinhas pré-imunizadas não apresentaram níveis elevados de anticorpos anti-Ftr1 ( $DO = 0,119 \pm 0,028$ ). Em contraste, as galinhas imunizadas exibiram altos níveis de anticorpos anti-Ftr1 a partir da terceira inoculação ( $DO = 0,381 \pm 0,024$ ), atingindo níveis ligeiramente superiores na sétima inoculação ( $DO = 0,403 \pm 0,009$ ), obtendo um valor de absorbância significativamente diferente ( $p < 0,0001$ ) em comparação com o IgY pré-imune (Figura 3A).

Quanto à avidéz, a IgY pré-imune apresentou baixa avidéz ao antígeno ( $IA = 17,2 \pm 1,2\%$ ). No entanto, a avidéz foi moderada para a IgY anti-Ftr1 extraída após a terceira ( $AI = 38,4 \pm 5,7\%$ ) e quinta ( $AI = 48,9 \pm 0,8\%$ ) imunizações, e foi alta após a sétima imunização ( $AI = 66,6 \pm 0,3\%$ ) (Figura 3B). Além disso, todas as amostras diferiram estatisticamente entre si ( $p \leq 0,01$ ).



**Figura 3** - Níveis da IgY anti-Ftr1 (**A**) e índices de avidez (**B**) de anticorpos produzidos por galinhas poedeiras imunizadas com 200 µg do PFCA conjugado com KLH. Os experimentos foram realizados em duplicata em pelo menos três ocasiões diferentes. Os títulos de anticorpos foram expressos como densidade óptica (DO) da leitura de absorbância a 450 nm. As letras distintas nas barras diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

### 3.5 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DA IGY ANTI-FTR1

A IgY anti-Ftr1 antes da purificação e concentração não inibiu o crescimento de *C. albicans* SC5314 e nem de  $\Delta ftr1$  (dados não mostrados), por isso foi necessário purificar o anticorpo. Como resultado, foi observado que na presença de BPS, a CIM<sub>90</sub> da IgY PC anti-Ftr1 foi 250 µg/mL para a cepa selvagem, *C. albicans* SC5314, e para a cepa mutante,  $\Delta ftr1$ . Na ausência do quelante de ferro, a CIM<sub>90</sub> foi equivalente a 500 µg/mL. Por outro lado, a CIM<sub>50</sub> variou entre 125 µg/mL e 250 µg/mL para as duas cepas.

A IgY PC pré-imune também apresentou ação antifúngica e, como esperado, as CIMs encontrados foram superiores às CIMs correspondentes à IgY PC anti-Ftr1. Em todas as condições testadas, a CIM<sub>90</sub> da IgY PC pré-imune foi de 500 µg/mL para *C. albicans* SC5314 e para a cepa mutante  $\Delta ftr1$ . Além disso, a CIM<sub>50</sub> variou entre 250 µg/mL e próximo a 500 µg/mL para *C. albicans* SC5314 e entre 125 µg/mL e próximo a 500 µg/mL para  $\Delta ftr1$ . Todos os resultados das CIMs são apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2**

Concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima da IgY anti-Ftr1 e da IgY pré-imune.

| Cepa                                | IgY       | BPS (mM) | CIM <sub>50</sub> (µg/mL) | CIM <sub>90</sub> (µg/mL) | CFM (µg/mL) |
|-------------------------------------|-----------|----------|---------------------------|---------------------------|-------------|
| <i>C. albicans</i><br>SC5314        | Anti-Ftr1 | 0,0      | 250,0                     | 500,0                     | 500,0       |
|                                     |           | 6,3      | > 125,0 < 250,0           | 250,0                     | 500,0       |
|                                     |           | 12,5     | > 125,0 < 250,0           | 250,0                     | 500,0       |
|                                     |           | 25,0     | 125,0                     | 250,0                     | 500,0       |
|                                     | Pré-imune | 0,0      | > 250,0 < 500,0           | 500,0                     | 1000,0      |
|                                     |           | 6,3      | > 250,0 < 500,0           | 500,0                     | 1000,0      |
|                                     |           | 12,5     | 250,0                     | 500,0                     | 1000,0      |
|                                     |           | 25,0     | 250,0                     | 500,0                     | 500,0       |
| <i>C. albicans</i><br>$\Delta ftr1$ | Anti-Ftr1 | 0,0      | 250,0                     | 500,0                     | 500,0       |
|                                     |           | 6,3      | 125,0                     | 250,0                     | 250,0       |
|                                     |           | 12,5     | 125,0                     | 250,0                     | 250,0       |
|                                     |           | 25,0     | 125,0                     | 250,0                     | 250,0       |
|                                     | Pré-imune | 0,0      | > 250,0 < 500,0           | 500,0                     | 1000,0      |
|                                     |           | 6,3      | 250,0                     | 500,0                     | 1000,0      |
|                                     |           | 12,5     | 250,0                     | 500,0                     | 1000,0      |
|                                     |           | 25,0     | 125,0                     | 500,0                     | 1000,0      |

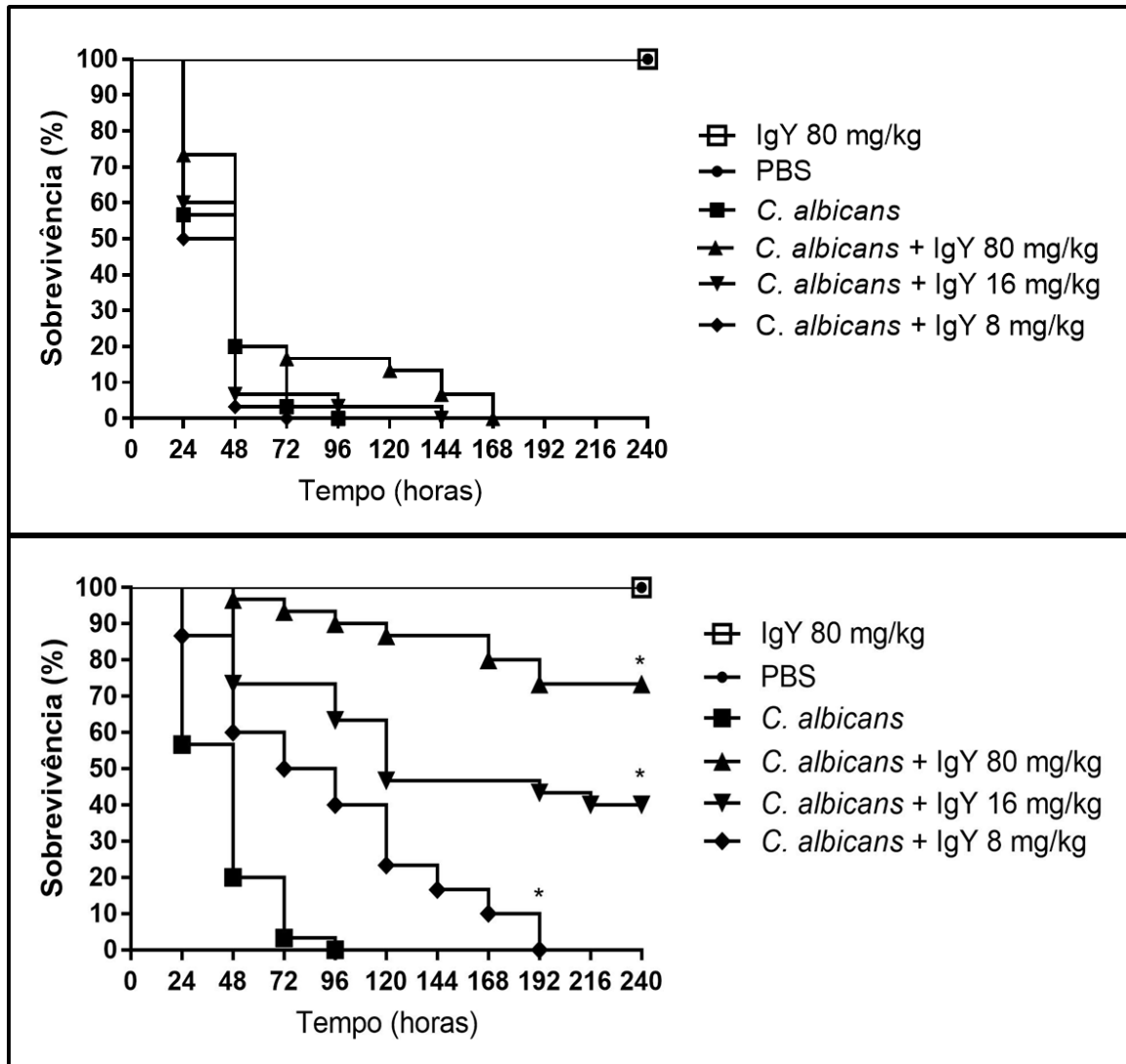
CFM: Concentração Fungicida Mínima, CIM: Concentração Inibitória Mínima que bloqueia 50% (MIC<sub>50</sub>) ou 90% (MIC<sub>90</sub>) do crescimento fúngico, BPS: ácido batofenantrolindisulfônico.

### 3.6 CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA DA IgY ANTI-FTR1

Observou-se que a CFM da IgY PC anti-Ftr1 foi equivalente a 500 µg/mL para *C. albicans* SC5314 em todas as condições testadas. Este resultado também foi obtido para a cepa mutante  $\Delta ftr1$  incubada na ausência de BPS. Em contato com o quelante de ferro, a CFM foi 250 µg/mL. Resultados diferentes foram encontrados para tratamentos com IgY pré-imune PC. MFC foi equivalente a 1 mg/mL em todas as condições experimentais para  $\Delta ftr1$  e *C. albicans* SC5314, exceto quando a segunda cepa foi incubada com BPS 25,0 mM (CFM = 500 µg/mL) (Tabela 2).

### 3.7 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS ANTICORPOS EM LARVAS INFECTADAS COM *C. ALBICANS*

Foi identificada proteção significativa no tratamento com a IgY PC anti-Ftr1, em todas as concentrações testadas ( $p < 0,0001$ ), quando comparado ao grupo que recebeu apenas *C. albicans* SC5314 (Figura 4). Já a IgY PC pré-imune não apresentou efeito protetor ( $p > 0,05$ ). Além disso, o principal resultado mostrou que a sobrevivência das larvas tratadas com 80 mg/kg de anti-Ftr1 PC IgY foi de 90%, e todas as larvas que não receberam tratamento morreram em 96 h após o início do experimento. Enquanto isso, apenas 16% das larvas que receberam 80 mg/kg de IgY pré-imunizada sobreviveram, sem diferença entre esse grupo e o controle positivo ( $p = 0,2359$ ).



**Figura 4** - Curva de sobrevivência de larvas de *G. mellonella* infectadas com *C. albicans* SC5314 e tratadas com IgY PC pré-imune (A) ou IgY PC anti-Ftr1 (B). Grupos de 10 larvas foram infectados com uma suspensão de *C. albicans* de  $5 \times 10^5$  células/larva e tratadas com os anticorpos. Os testes foram repetidos três vezes e agrupados para construir curvas de sobrevivência contendo 30 animais. As curvas de sobrevivência foram produzidas pelo método de Kaplan-Meier e as análises estatísticas foram realizadas pelo teste de Long-Rank. Um grupo de controle negativo foi inoculado apenas com PBS. Outros grupos foram inoculados com as imunoglobulinas e PBS. \* diferença significativa em relação ao controle positivo, inoculado apenas com levedura ( $p < 0,0001$ ).

#### 4. DISCUSSÃO

O presente estudo foi o primeiro passo para o desenvolvimento de uma nova terapia para o tratamento de infecções causadas por *C. albicans* e, possivelmente, outras leveduras. A IgY anti-Ftr1 apresentou atividade fungicida e foi capaz de

aumentar a sobrevivência de larvas de *G. mellonella* em modelo *in vivo* de infecção sistêmica.

Ao selecionar um alvo para uma nova estratégia de controle da disseminação de *C. albicans*, buscamos por proteínas envolvidas na captação de ferro que são essenciais para manter a patogenicidade dos fungos. A maioria deles não interfere na patogenicidade das leveduras, e isso provavelmente se deve aos efeitos compensatórios de diferentes sistemas de aquisição de ferro (WEISSMAN; KORNITZER, 2004).

A deleção dos genes *SIT/ARN1* (transportador de sideróforo) (HU *et al.*, 2002), *RBT5* (receptores de ferro da hemoglobina) (BRAUN *et al.*, 2000), *RBT2* (redutase de ferro) (BRAUN *et al.*, 2000), *FET3* (oxidase multi-cobre) (ECK *et al.*, 1999) e *CCC2* (fornecedor de cobre para oxidase multi-cobre) (WEISSMAN; SHEMER; KORNITZER, 2002) teve pouca ou nenhuma influência sobre a virulência da levedura em modelo de candidíase sistêmica utilizando camundongos. Além disso, Roy e colaboradores (2019) afirmaram que a proteína Hmx1, responsável pela degradação do heme e liberação do ferro, não parece ser necessária para a aquisição do ferro da hemoglobina, podendo haver outras enzimas com a mesma função. Por outro lado, o mutante não produtor do receptor de ferro da hemoglobina Pga7 (KUZNETS *et al.*, 2014) e o mutante incapaz de produzir a redutase férrica Cfl1 (XU *et al.*, 2014) tiveram a virulência reduzida em modelo de infecção sistêmica utilizando camundongos.

Nesse contexto, a falta de outra proteína envolvida na captação do ferro teve um impacto um pouco maior na virulência fúngica. A deleção do gene *FTR1* resultou em leveduras incapazes de causar danos às células epiteliais (ALMEIDA *et al.*, 2008) e totalmente avirulentas na infecção sistêmica utilizando camundongos como hospedeiros (RAMANAN; WANG, 2000). Essa proteína também é essencial para o crescimento de *C. albicans* na escassez de ferro (RAMANAN; WANG, 2000), e na aquisição de ferro da ferritina (ALMEIDA *et al.*, 2008), da transferrina (KNIGHT *et al.*, 2005) e de xenosideróforos (HU *et al.*, 2002).

Outra permease de ferro descrita é a *Ftr2*, que possui 87% de identidade com *Ftr1* (RAMANAN; WANG, 2000). É conhecida como permease de ferro de baixa afinidade por ser necessária para a aquisição de ferro quando este metal estiver disponível (RAMANAN; WANG, 2000), situação incomum nos estágios iniciais das infecções (LIN *et al.*, 2014; XU *et al.*, 2015). Além disso, essa proteína também não

influencia na virulência fúngica (RAMANAN; WANG, 2000). Nessa circunstância, dentre as proteínas de aquisição de ferro de *C. albicans*, a permease de ferro de alta afinidade Ftr1 é a mais propícia para ser utilizada como alvo de uma nova estratégia terapêutica.

De acordo com o mostrado na Tabela 1, o antígeno produzido neste trabalho é encontrado não apenas em Ftr1 de *C. albicans*, mas também em permeases de ferro de outras espécies de *Candida*. Além disso, outros gêneros de fungos de importância clínica também o apresentam. Em algumas espécies, a sequência de aminoácidos é homóloga a outras proteínas, proteínas hipotéticas ou não caracterizadas. Possivelmente, essas proteínas pertencem à família das permeases de ferro, uma vez que a via de captação redutiva do ferro é conservada evolutivamente entre algumas espécies de fungos. *C. glabrata*, *Geotrichum candidum*, *Rhizopus* spp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus* spp e *Cryptococcus neoformans* obtêm ferro por esta via (GERWIEN *et al.*, 2018). Portanto, provavelmente a IgY anti-Fr1 também pode inibir a multiplicação dos fungos da Tabela 1, com destaque para *C. auris*, um patógeno emergente, resistente a múltiplos antifúngicos (LOCKHART *et al.*, 2019).

Neste estudo galinhas poedeiras foram utilizadas para a produção de anticorpos. Na literatura existem vários relatos sobre o potencial uso terapêutico de IgY para tratar infecções causadas por *C. albicans* (IBRAHIM *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2008; FUJIBAYASHI *et al.*, 2009; KAMIKAWA *et al.*, 2016; TAKEUCHI *et al.*, 2016; LEU, *et al.*, 2020). É importante observar que na maioria desses estudos as galinhas foram imunizadas com a levedura inativada (FUJIBAYASHI *et al.*, 2009; IBRAHIM *et al.*, 2008; KAMIKAWA *et al.*, 2016; TAKEUCHI *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2008). Nesse contexto, a produção de anticorpos específicos contra uma única proteína do fungo é mais interessante, pois evita a possível reação cruzada com proteínas humanas.

Como mencionado acima, a imunoterapia utilizando IgY contra *C. albicans* geralmente envolve a imunização de aves com células fúngicas inteiras produzindo anticorpos policlonais que se ligam a vários epítomos. Porém, um anticorpo IgG monoclonal foi produzido e supostamente interfere na aquisição de ferro de *C. albicans* pela via redutora (BRENA *et al.*, 2011). Ele reage com um peptídeo epítomo de Als3, uma proteína de parede que reconhece a ferritina humana (BRENA *et al.*, 2011; ALMEIDA *et al.*, 2008). Apesar de sua atividade candidacida, testes *in vivo* ainda não foram realizados e são necessários para garantir que o fungo não permaneça virulento, obtendo ferro da transferrina e/ou xenosideforos por essa via. No entanto,

pesquisas anteriores mostraram que as leveduras mutantes  $\Delta als3$  não foram capazes de causar danos às células endoteliais (PHAN *et al.*, 2007; ALMEIDA *et al.*, 2008) e foram fortemente atenuadas em sua capacidade de danificar o tecido epitelial em um modelo de infecção oral *in vitro* (ZHAO *et al.*, 2004).

Neste trabalho, a extração de IgY foi conduzida com sucesso, de acordo com a literatura (AMRO, *et al.*, 2018; CARRARA *et al.*, 2020; MWALE *et al.*, 2020; YANG *et al.*, 2020). As proteínas que não foram eliminadas no processo de extração de IgY são possivelmente a fosvitina (35 - 38 kDa) e/ou o fragmento C-terminal da vitelogenina-II, uma  $\beta$ -livetina (35 kDa) (JIANG; MINE, 2000; KLIMENTZOU *et al.*, 2006; SARTORI *et al.*, 2009). A fosvitina é conhecida por armazenar ferro, e é encontrada na gema de ovos de galinha (JIANG; MINE, 2000; SARTORI *et al.*, 2009). Noventa e cinco por cento do ferro presente na gema está ligado à fosvitina em sua forma férrica (GREENGARD *et al.*, 1964). Nos testes preliminares de atividade antimicrobiana da IgY, sua possível presença nas amostras deve ser responsável pela disseminação da levedura mesmo em altas concentrações de BPS.

Em nosso estudo, embora não tenha sido observado aumento significativo em relação aos títulos de anticorpos anti-Ftr1, correspondentes à terceira, quinta e sétima imunizações, a avidéz aumentou significativamente. Andrade e colaboradores (2013) observaram resultados semelhantes. A distância entre as imunizações foi idêntica à nossa, uma vez que nos baseamos neste artigo. Semelhante ao que relatamos, os títulos de anticorpos específicos para antígenos aumentaram após a terceira imunização e permaneceram constantes até o final do experimento. Em relação à avidéz, foi elevada após a sexta e oitava imunizações para anticorpos antibotrópicos e anticrotálicos, respectivamente. Outro estudo mais recente mostrou o aumento gradual da avidéz que atingiu seu pico com 150 dias de observação (Eto *et al.*, 2018). Neste estudo, foram realizadas três imunizações com intervalo de um mês entre elas. Esses dados corroboram nossa decisão de administrar várias doses de reforço do antígeno para garantir a produção de anticorpos de alta qualidade.

A IgY anti-Ftr1 inibiu o crescimento de *C. albicans* SC5314 e mutante  $\Delta ftr1$  em diferentes níveis de escassez de ferro do meio. Pode ter acontecido por causa da interação da imunoglobulina com a Ftr1. Provavelmente a IgY também interagiu com a Ftr2, uma vez que a cepa mutante foi igualmente afetada e o antígeno usado na imunização tem 91,67% de identidade com a Ftr2. Além disso, a IgY anti-Ftr1 apresentou atividade candidacida. É notável que na presença de BPS, a atividade

fungicida do anticorpo anti-Ftr1 foi maior para  $\Delta ftr1$  em comparação com *C. albicans* SC5314. Pode ter acontecido devido à baixa concentração de ferro do meio, que impediu o crescimento da cepa mutante em maior extensão em comparação com a outra cepa do tipo selvagem.

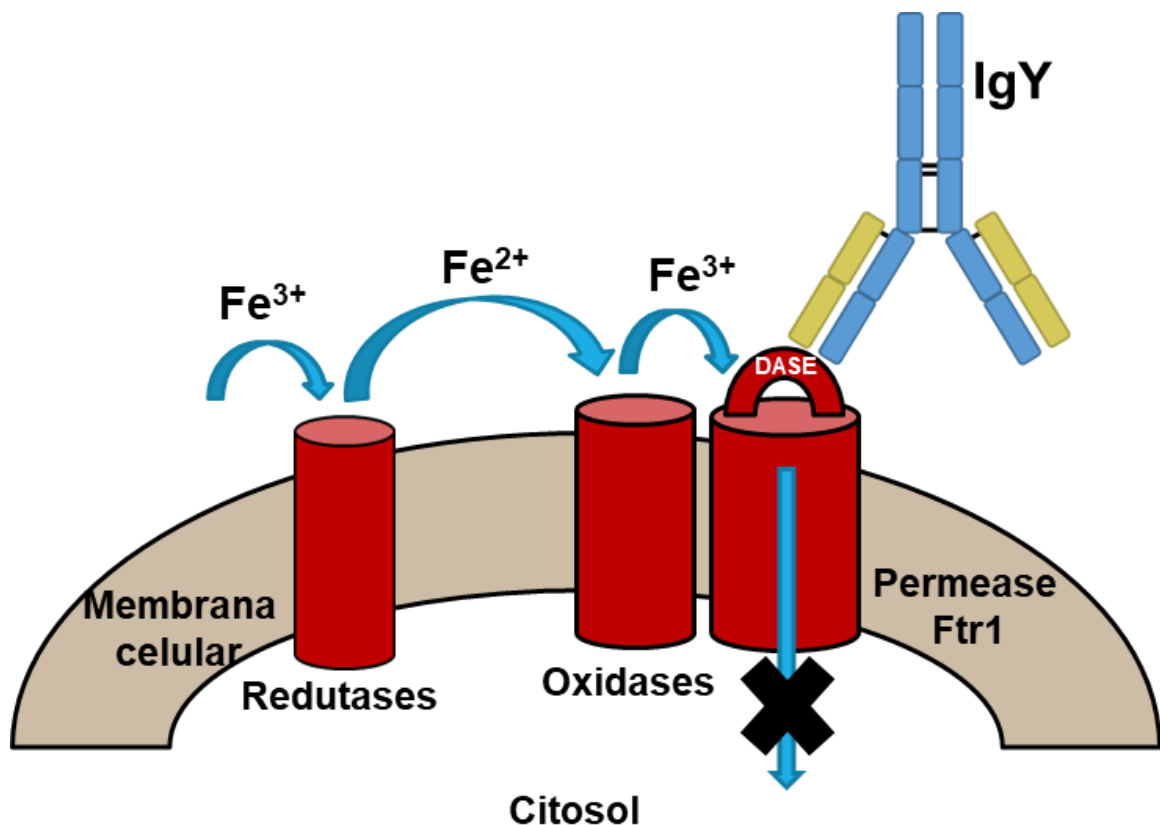
O anticorpo extraído das galinhas antes das imunizações também apresentou atividade antifúngica e fungicida, mas geralmente era necessário usar o dobro da concentração em comparação com a IgY anti-Ftr1. Esperávamos que a IgY pré-imunizada tivesse alguma ação antifúngica, uma vez que *C. albicans* e outras espécies do mesmo gênero fazem parte da microbiota gastrointestinal de galinhas (SUBRAMANYA *et al.*, 2017). A microbiota residente contém vários componentes capazes de ativar, mesmo que em níveis basais, a imunidade inata e adaptativa do hospedeiro (TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ *et al.*, 2004).

Apesar das diferenças entre a ação antifúngica dos anticorpos extraídos no período pré-imunização e após sete imunizações serem pequenas nos ensaios *in vitro*, a atividade antifúngica dos anticorpos anti-Ftr1 foi bem evidenciada no modelo de infecção animal. O tratamento com a IgY anti-Ftr1 resultou no aumento da sobrevivência das larvas infectadas com *C. albicans*, em detrimento das larvas que não receberam tratamento ou foram tratadas com anticorpos pré-ímmunes, que acabaram morrendo. Usamos *G. mellonella* nos testes *in vivo* como um modelo alternativo de infecção, pois consideramos os princípios dos três Rs, que visam “Substituir” os animais experimentais por alternativas não sencientes, “Reduzir” o número de animais na pesquisa e “Refinar” as metodologias para causar o mínimo possível de dor e angústia (RUSSEL; BURCH, 1959).

Vários estudos estão focando no desenvolvimento de novos medicamentos contra *C. albicans* e usam *G. mellonella* como modelo de infecção *in vivo* (CRUZ *et al.*, 2018; KAVANAGH; SHEEHAN, 2018; SÁ *et al.*, 2018; STANISZEWSKA *et al.*, 2018; AJDIDI *et al.*, 2019; DE CASTRO SPADARI *et al.*, 2019; OSMANOV; WISE; DENNING, 2019; ROSSONI *et al.*, 2019). É um método válido, uma vez que *C. albicans* mantém os mesmos padrões de virulência durante infecções sistêmicas em camundongos e *G. mellonella* (BRENNAN *et al.*, 2002). Além disso, a mariposa produz ferritina (KIM *et al.*, 2001) e transferrina (KRZYŻANOWSKA *et al.*, 2001) assim como os humanos. Portanto, os resultados da produção e ação antifúngica da IgY anti-Ftr1 são promissores.

## 5. CONCLUSÃO

Resumindo, produzimos anticorpos IgY que reconheceram um peptídeo derivado da permease de ferro de alta afinidade Ftr1 de *C. albicans*. Os resultados apresentados neste trabalho fornecem evidências de que o efeito antifúngico do anticorpo anti-Ftr1 está relacionado ao bloqueio da via redutora de captação de ferro de *C. albicans* (Figura 5). Devido à semelhança do epítipo alvo, o anti-Ftr1 IgY supostamente pode reconhecer a proteína permease de ferro Ftr2 de *C. albicans* e também pode ter atividade antifúngica contra outras espécies de levedura. Portanto, essas descobertas abrem espaço para novas pesquisas na área.



**Figura 5** - O modelo proposto para bloquear a absorção de ferro por *C. albicans*, ligando IgY à permease de ferro Ftr1. O ferro é transferido de oxidases multi-cobre para Ftr1 através de uma alça extracelular da segunda proteína, que contém o motivo DASE. A ligação da IgY a esta alça deve impedir a internalização do ferro.

## CONTRIBUIDORES

PCS foi a pesquisadora principal, realizou os testes, analisou os dados e redigiu a primeira versão do manuscrito. AENC e a JGG auxiliaram na execução dos testes. AGOJ e LAP forneceram contribuições críticas para o desempenho do projeto. EJV auxiliou no desenvolvimento, execução do projeto e análise dos resultados. RSA desenvolveu o projeto, auxiliou na execução de testes, análise de dados e redação. Para registro, todos os autores contribuíram para a versão final do artigo.

## AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código Financeiro 001. Também somos muito gratos ao Dr. Bernhard Hube e ao Dr. Yue Wang por fornecerem as cepas de *C. albicans*.

## DECLARAÇÃO DE CONCORRÊNCIA DE INTERESSES

Os autores declaram não haver conflito de interesses financeiros ou de relacionamento pessoal.

## REFERÊNCIAS

- ADRIAN, T. E. Production of antisera using peptide conjugates. **In: Neuropeptide Protocols. Humana Press**, 1997. p. 239-249.
- AJDIDI, A. *et al.* Assessment of the *in vitro* and *in vivo* activity of atorvastatin against *Candida albicans*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 68, n. 10, p. 1497-1506, out. 2019.
- AKITA, E. M.; NAKAI, S. Immunoglobulins from egg yolk: isolation and purification. **Journal of Food Science**, v. 57, n. 3, p. 629-634, maio 1992.
- ALMEIDA, R. S. *et al.* The hyphal-associated adhesin and invasin Als3 of *Candida albicans* mediates iron acquisition from host ferritin. **PLoS Pathogens**, v. 4, n. 11, p. e1000217, nov. 2008.
- ALMEIDA, R. S.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* iron acquisition within the

host. **FEMS Yeast Research**, v. 9, n. 7, p. 1000–1012, out. 2009.

AMRO, W. A.; AL-QAISI, W.; AL-RAZEM, F. Production and purification of IgY antibodies from chicken egg yolk. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 99-103, jun. 2018.

BALARAMAN, H. B.; RATHNASAMY, S. K. High selective purification of IgY from quail egg: process design and quantification of deep eutectic solvent based ultrasound assisted liquid phase microextraction coupled with preparative chromatography. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 146, p. 253-262, 1 mar. 2020.

BANDARA, H. M. H. N.; PANDUWAWALA, C. P.; SAMARANAYAKE, L. P. Biodiversity of the human oral mycobiome in health and disease. **Oral Diseases**, v. 25, n. 2, p. 363–371, mar. 2019.

BOLLEN, L. S. *et al.* Antibody production in rabbits and chickens immunized with human IgG A comparison of titre and avidity development in rabbit serum, chicken serum and egg yolk using three different adjuvants. **Journal of Immunological Methods**, v. 191, n. 2, p. 113-120, 1996.

BONGOMIN, F. *et al.* Global and multi-national prevalence of fungal diseases-estimate precision. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 4, 18 out. 2017.

BONICHE, C. *et al.* Immunotherapy against systemic fungal infections based on monoclonal antibodies. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 1, p. 31, 29 fev. 2020.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 7 maio 1976.

BRAUN, B. R. *et al.* Identification and characterization of TUP1-regulated genes in *Candida albicans*. **Genetics**, v. 156, n. 1, p. 31–44, set. 2000.

BRENNAN, M. *et al.* Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 153-157, out. 2002.

BRENA, S. *et al.* Fungicidal monoclonal antibody C7 interferes with iron acquisition in *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 7, p. 3156-3163, 2011.

CANELA, H. M. S. *et al.* Prevalence, virulence factors and antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from bloodstream infections in a tertiary care hospital in Brazil. **Mycoses**, v. 61, n. 1, p. 11–21, jan. 2018.

CARRARA, G. M. P. *et al.* IgY antibody and human neurocysticercosis: a novel approach on immunodiagnosis using *Taenia crassiceps* hydrophobic antigens. **Parasitology**, v. 147, n. 2, p. 240-247, fev. 2020.

CAZA, M; KRONSTAD, J. W. Shared and distinct mechanisms of iron acquisition by bacterial and fungal pathogens of humans. **Frontiers in Cellular and Infection**

**Microbiology**, v. 3, n. 80, p. 1-23, 19 nov. 2013.

CHEN, C. *et al.* An iron homeostasis regulatory circuit with reciprocal roles in *Candida albicans* commensalism and pathogenesis. **Cell Host and Microbe**, v. 10, n. 2, p. 118–135, 18 ago. 2011.

CHEN, Y. Y. *et al.* Dynamic transcript profiling of *Candida albicans* infection in zebrafish: a pathogen-host interaction study. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, 3 set. 2013.

COLOMBO, A. L.; DE ALMEIDA JÚNIOR, J. N.; GUINEA, J. Emerging multidrug-resistant *Candida species*. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 30, n. 6, p. 528-538, dez. 2017.

CRUZ, L. I. B. *et al.* Anti-*Candida albicans* activity of thiazolylhydrazone derivatives in invertebrate and murine models. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 4, p. 134, 12 dez. 2018.

D' ALESSANDRO, A. *et al.* Red blood cell proteomics update: Is there more to discover? **Blood Transfusion**, v. 15, n. 2, p. 182–187, mar. 2017.

DA SILVA, M. C. *et al.* Production and application of anti-nucleoprotein IgY antibodies for influenza A virus detection in swine. **Journal of Immunological Methods**, v. 461, p. 100-105, out. 2018.

DA SILVA, R. B. *et al.* Candidemia in a public hospital in Northeastern Brazil: Epidemiological features and risk factors in critically ill patients. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 36, n. 4, p. 181–185, 1 out. 2019.

DATTA, K.; HAMAD, M. Immunotherapy of fungal infections. **Immunological Investigations**, v. 44, n. 8, p. 738-776, 17 nov. 2015.

DE ALBUQUERQUE MARANHÃO, F. C. *et al.* Mycoses in northeastern Brazil: epidemiology and prevalence of fungal species in 8 years of retrospective analysis in Alagoas. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 969-978, 28 maio 2019.

DE ANDRADE, F. G. *et al.* The production and characterization of anti-bothropic and anti-crotalic IgY antibodies in laying hens: A long term experiment. **Toxicon**, v. 66, p. 18-24, maio 2013.

DE CASTRO SPADARI *et al.* Alginate nanoparticles as non-toxic delivery system for miltefosine in the treatment of candidiasis and cryptococcosis. **International Journal of Nanomedicine**, v. 14, p. 5187-5199, 12 jul. 2019a.

DEL CAMPO, M. *et al.* Hemocianinas, una herramienta inmunológica de la biomedicina actual. **Revista Médica de Chile**, v. 139, n. 2, p. 236-246, fev. 2011.

DE LUCA, N. G.; WOOD, P. M. Iron uptake by fungi: Contrasted mechanisms with internal or external reduction. **Advances in Microbial Physiology**, v. 43, p. 39–74, 2000.

DE MEDEIROS, M. A. P. *et al.* Epidemiology and prognostic factors of nosocomial candidemia in Northeast Brazil: A six-year retrospective study. **PLoS ONE**, v. 14, n. 8, 22 ago. 2019.

DIAS DA SILVA, W.; TAMBOURGI, D. V. IgY: A promising antibody for use in immunodiagnostic and in immunotherapy. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 135, n. 3–4, p. 173–180, 15 jun. 2010.

ECK, R. *et al.* A multicopper oxidase gene from *Candida albicans*: Cloning, characterization and disruption. **Microbiology**, v. 145, n. 9, p. 2415–2422, set. 1999.

ESPINEL-INGROFF, A. *et al.* Optimal testing conditions for determining MICs and minimum fungicidal concentrations of new and established antifungal agents for uncommon molds: NCCLS collaborative study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 10, p. 3776–3781, out. 2002.

ETO, S. F. *et al.* Validation of IgY for the diagnosis of *Streptococcus agalactiae*-caused endocarditis and bacterial meningitis in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 76, p. 153–160, maio 2018.

FANG, H-M.; WANG, Y. Characterization of iron-binding motifs in *Candida albicans* high-affinity iron permease CaFtr1p by site-directed mutagenesis. **Biochemical Journal**, v. 368, n. 2, p. 641–647, 1 dez. 2002.

FISHER, M. C. *et al.* Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. **Science**, v. 360, n. 6390, p. 739–742, 18 maio 2018.

FOURIE, R. *et al.* Iron at the centre of *Candida albicans* interactions. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, n.185, p. 1–14, 5 jun. 2018.

FUJIBAYASHI, T. *et al.* Effects of IgY against *Candida albicans* and *Candida* spp. adherence and biofilm formation. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 62, n. 5, p. 337–342, set. 2009.

GERMAIN, R. N. Immunology: The ins and outs of antigen processing and presentations. **Nature**, v. 322, n. 6081, p. 687–688, 1986.

GERWIEN, F. *et al.* Metals in fungal virulence. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 42, n. 1, p. fux050, 1 jan. 2018.

GREENGARD, O. *et al.* Phosvitin, the iron carrier of egg yolk. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 90, p. 406–407, 1964.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals, lipid peroxidation, and cell damage. **The Lancet**, v. 324, n. 8411, p. 1095, 10 nov. 1984.

HAMMACOTT, J. E.; WILLIAMS, P. H.; CASHMORE, A. M. *Candida albicans* CFL1 encodes a functional ferric reductase activity that can rescue a *Saccharomyces cerevisiae* Fre1 mutant. **Microbiology**, v. 146, n. 4, p. 869–876, abr. 2000.

HARRIS, J. R.; MARKL, J. Keyhole limpet hemocyanin (KLH): a biomedical review. **Micron**, v. 30, n. 6, p. 597–623, dez. 1999.

HARRISON, P. M.; AROSIO, P. The ferritins: Molecular properties, iron storage function and cellular regulation. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v.

1275, n. 3, p. 161–203, jul 1996.

HEDMAN, K.; ROUSSEAU, S. A. Measurement of avidity of specific IgG for verification of recent primary rubella. **Journal of Medical Virology**, v. 27, n. 4, p. 288-292, abr. 1989.

HEYMANN, P. *et al.* The siderophore iron transporter of *Candida albicans* (Sit1p/Arn1p) mediates uptake of ferrichrome-type siderophores and is required for epithelial invasion. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 9, p. 5246–5255, set. 2002.

HU, C. J. *et al.* Characterization and functional analysis of the siderophore-iron transporter CaArn1p in *Candida albicans*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 34, p. 30598–30605, 23 ago. 2002.

IBRAHIM, E. M. *et al.* *In vitro* and *in vivo* effectiveness of egg yolk antibody against *Candida albicans* (anti-CA IgY). **Vaccine**, v. 26, n. 17, p. 2073-2080, 16 abr. 2008.

JIANG, B.; MINE, Y. Preparation of novel functional oligophosphopeptides from hen egg yolk phosvitin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 4, p. 990-994, 2000.

KALIA, N.; SINGH, J.; KAUR, M.. Microbiota in vaginal health and pathogenesis of recurrent vulvovaginal infections: a critical review. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 19, n. 1, p. 1-19, 28 jan. 2020.

KAMIKAWA, Y. *et al.* Use of *Candida*-specific chicken egg yolk antibodies to inhibit the adhering of *Candida* to denture base materials: prevention of denture stomatitis. **Gerodontology**, v. 33, n. 3, p. 342-347, set. 2016.

KAVANAGH, K.; SHEEHAN, G. The use of *Galleria mellonella* larvae to identify novel antimicrobial agents against fungal species of medical interest. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 3, p. 113, 19 set. 2018.

KIM, B. S. *et al.* Characterization and immunological analysis of ferritin from the hemolymph of *Galleria mellonella*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 129, n. 2-3, p. 501-509, jun. 2001.

KLIMENTZOU, P. *et al.* Development and immunochemical evaluation of antibodies Y for the poorly immunogenic polypeptide prothymosin alpha. **Peptides**, v. 27, n. 1, p. 183-193, jan. 2006.

KNIGHT, S. A. B. *et al.* Iron acquisition from transferrin by *Candida albicans* depends on the reductive pathway. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 9, p. 5482–5492, set. 2005.

KNIGHT, S. A. B. *et al.* Reductive iron uptake by *Candida albicans*: role of copper, iron and the TUP1 regulator. **Microbiology**, v. 148, n. 1, p. 29-40, jan. 2002.

KOSMAN, D. J. Molecular mechanisms of iron uptake in fungi. **Molecular Microbiology**, v. 47, n. 5, p. 1185–1197, mar. 2003.

KOUSTED, T. M. *et al.* Exploring the antigenic response to multiplexed

immunizations in a chicken model of antibody production. **Heliyon**, v. 3, n. 3, p. e00267, 2017.

KRZYŻANOWSKA, D. *et al.* Juvenile hormone binding protein and transferrin from *Galleria mellonella* share a similar structural motif. **Molecular Microbiology**. 1 jun. 2001.

KUZNETS, G. *et al.* A relay network of extracellular heme-binding proteins drives *C. albicans* iron acquisition from hemoglobin. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 10, 2 out. 2014.

LEIVA, C. L. *et al.* IgY-technology (egg yolk antibodies) in human medicine: A review of patents and clinical trials. **International Immunopharmacology**, v. 81, p. 106269, abr. 2020.

LEU, S. *et al.* Generation and characterization of single chain variable fragment against alpha-enolase of *Candida albicans*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 8, p. 2903, 21 abr. 2020.

LI, D. *et al.* Using *Galleria mellonella*–*Candida albicans* infection model to evaluate antifungal agents. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 36, n. 9, p. 1482–1487, set. 2013.

LIN, L. *et al.* Transferrin iron starvation therapy for lethal bacterial and fungal infections. **Journal of Infectious Diseases**, v. 210, n. 2, p. 254–264, 15 jul. 2014.

LOCKHART, S. R. *Candida auris* and multidrug resistance: Defining the new normal. **Fungal Genetics and Biology**, v. 131, p. 103243, 20 jun. 2019.

MWALE, P. F. *et al.* Expression, purification, and characterization of anti-Zika virus envelope protein: polyclonal and chicken-derived single chain variable fragment antibodies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 2, p. 492, 13 jan. 2020.

NAIRZ, M.; WEISS, G. Iron in infection and immunity. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 75, p. 1008641, 24 maio 2020.

NASH, A. K. *et al.* The gut mycobiome of the human microbiome project healthy cohort. **Microbiome**, v. 5, n. 1, p. 153, 25 nov. 2017.

OSMANOV, A.; WISE, A.; DENNING, D. W. *In vitro* and *in vivo* efficacy of miramistin against drug-resistant fungi. **Journal of Medical Microbiology**, v. 68, n. 7, p. 1047–1052, 1 jul. 2019.

PHAN, Q. T. *et al.* Als3 is a *Candida albicans* invasin that binds to cadherins and induces endocytosis by host cells. **PLoS Biology**, v. 5, n. 3, p. e64, 2007.

PHILPOTT, C. C. Iron uptake in fungi: A system for every source. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1763, n. 7, p. 636–645, jul. 2006.

PIETRANGELO, A. Physiology of iron transport and the hemochromatosis gene. **American Journal of Physiology. Gastrointest Liver Physiology**. v. 282, n. 3, p.

G403-414, mar. 2002.

RAMANAN, N.; WANG, Y. A high-affinity iron permease essential for *Candida albicans* virulence. **Science**, v. 288, n. 5468, p. 1062–1064, 12 maio 2000.

ROSSONI, R. D. *et al.* Effects of surface pre-reacted glass-ionomer (S-PRG) eluate on *Candida* spp.: antifungal activity, anti-biofilm properties, and protective effects on *Galleria mellonella* against *C. albicans* infection. **Biofouling**, v. 35, n. 9, p. 997-1006, 11 nov. 2019.

ROY, U.; KORNITZER, D. Heme-iron acquisition in fungi. **Current Opinion in Microbiology**, v. 52, p. 77-83, 2019.

RUSSELL, W. M. S.; BURCH, R. L. **The principles of humane experimental technique**. Methuen, 1959.

SÁ, N. P. *et al.* A phenylthiazole derivative demonstrates efficacy on treatment of the cryptococcosis & candidiasis in animal models. **Future Science OA**, v. 4, n. 6, p. FSO305, 25 abr. 2018.

SARTORI, É. V. *et al.* Concentração de proteínas em gemas de ovos de poedeiras (*Gallus gallus*) nos diferentes ciclos de postura e sua interferência na disponibilidade do ferro. **Food Science and Technology**, v. 29, n. 3, p. 481-487, jul./set. 2009.

SCHADE, R. *et al.* Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 33, n. 2, p. 129-154, 2005.

STANISZEWSKA, M. *et al.* New 1, 5 and 2, 5-disubstituted tetrazoles-dependent activity towards surface barrier of *Candida albicans*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 145, p. 124-139, 10 fev. 2018.

SUBRAMANYA, S. H. *et al.* Diversity, in-vitro virulence traits and antifungal susceptibility pattern of gastrointestinal yeast flora of healthy poultry, *Gallus gallus* domesticus. **BMC Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 1-14, 15 maio 2017.

SUTAK, R. *et al.* Crusade for iron: iron uptake in unicellular eukaryotes and its significance for virulence. **Trends in Microbiology**, v. 16, n. 6, p. 261-268, jun. 2008.

TAKEUCHI, S. *et al.* Effects of oral moisturising gel containing egg yolk antibodies against *Candida albicans* in older people. **Gerodontology**, v. 33, n. 1, p. 128-134, mar. 2016.

TAYLOR, A. I.; SUTTON, B. J.; CALVERT, R. A. Mutations in an avian IgY-Fc fragment reveal the locations of monocyte Fc receptor binding sites. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 34, n. 2, p. 97–101, fev. 2010.

TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ, H. *et al.* Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. **Immunology Letters**, v. 93, n. 2-3, p. 97-108, 15 maio 2004.

VAN DE WIJGERT, J. H. H. M *et al.* The vaginal microbiota: what have we learned

after a decade of molecular characterization?. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. e105998, 22 ago. 2014.

WANG, J.; PANTOPOULOS, K. Regulation of cellular iron metabolism. **Biochemical Journal**, v. 434, n. 3, p. 365–381, 15 mar. 2011.

WANG, X. Z. *et al.* *In vitro* inhibition of oral *Candida albicans* by chicken egg yolk antibody (IgY). **Mycopathologia**, v. 165, n. 6, p. 381, 14 mar. 2008.

WEISSMAN, Z.; KORNITZER, D. A family of *Candida* cell surface haem-binding proteins involved in haemin and haemoglobin-iron utilization. **Molecular Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 1209–1220, ago. 2004.

WEISSMAN, Z.; SHEMER, R.; KORNITZER, D. Deletion of the copper transporter CaCCC2 reveals two distinct pathways for iron acquisition in *Candida albicans*. **Molecular Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 1551–1560, jun. 2002.

WELCH, K. D.; VAN EDEN, M. E.; AUST, S. D. Modification of ferritin during iron loading. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, n. 8, p. 999–1006, 15 out. 2001.

XU, N. *et al.* Novel role of the *Candida albicans* ferric reductase gene *CFL1* in iron acquisition, oxidative stress tolerance, morphogenesis and virulence. **Research in Microbiology**, v. 165, n. 3, p. 252–261, abr. 2014.

XU, W. *et al.* Activation and alliance of regulatory pathways in *C. albicans* during mammalian infection. **PLoS Biology**, v. 13, n. 2, p. e1002076, 18 fev. 2015.

YANG, D. *et al.* The protective efficacy of specific egg yolk immunoglobulin Y (IgY) against *Riemerella anatipestifer* infections. **Veterinary Microbiology**, v. 243, p. 108642, abr. 2020.

ZHANG, W. The use of gene-specific IgY antibodies for drug target discovery. **Drug Discovery Today**, v. 8, n. 8, p. 364-371, 15 abr. 2003.

ZHAO, X. *et al.* ALS3 and ALS8 represent a single locus that encodes a *Candida albicans* adhesin; functional comparisons between Als3p and Als1p. **Microbiology**, v. 150, n. 7, p. 2415-2428, 1 jul. 2004.

ZIEGLER, L. *et al.* Functional characterization of the ferroxidase, permease high-affinity iron transport complex from *Candida albicans*. **Molecular Microbiology**, v. 81, n. 2, p. 473–485, jul. 2011.

## 5 ARTIGO CIENTÍFICO Nº 2

O artigo foi publicado na revista “*Journal of Fungi*”, ISSN 2309-608X e fator de impacto 4,621 (2019).

Pelo fato da revista ter sido criada recentemente, em 2015, esse periódico não possui classificação Qualis na lista de 2013-2016. Além disso, é provável que a nova lista de classificação Qualis provisória de 2019 tenha sido divulgada antes da publicação do fator de impacto do periódico, pois nessa lista a revista ainda é classificada como C.

### **An Invertebrate Host to Study Fungal Infections, Mycotoxins and Antifungal Drugs: *Tenebrio molitor***

Author's: Patricia Canteri de Souza<sup>1</sup>; Carla Custódio Caloni<sup>1</sup>; Duncan Wilson<sup>2</sup>; Ricardo Sergio Almeida<sup>1,\*</sup>.

Affiliation:

<sup>1</sup>Department of Microbiology, Center of Biological Science, State University of Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, Pr 445, Km 380, Londrina 86.057-970, Brazil; pcanteri@yahoo.com.br (P.C.d.S.); carlacalonic@gmail.com (C.C.C.)

<sup>2</sup>Aberdeen Fungal Group, Institute of Medical Sciences, 4.15 ext. 7162, University of Aberdeen, Aberdeen AB24 3FX, Scotland; duncan.wilson@abdn.ac.uk

\*Correspondence: almeidar@uel.br; Tel.: +55-43-3371-4976

Open Access Review

# An Invertebrate Host to Study Fungal Infections, Mycotoxins and Antifungal Drugs: *Tenebrio molitor*

by  Patrícia Canteri de Souza <sup>1</sup>,  Carla Custódio Caloni <sup>1</sup>,  Duncan Wilson <sup>2</sup> and  Ricardo Sergio Almeida <sup>1,\*</sup>  

<sup>1</sup> Department of Microbiology, Center of Biological Science, State University of Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, Pr 445, Km 380, Londrina 86.057-970, Brazil

<sup>2</sup> Aberdeen Fungal Group, Institute of Medical Sciences, 4.15 ext. 7162, University of Aberdeen, Aberdeen AB24 3FX, Scotland

\* Author to whom correspondence should be addressed.

*J. Fungi* **2018**, *4*(4), 125; <https://doi.org/10.3390/jof4040125>

Received: 10 October 2018 / Revised: 3 November 2018 / Accepted: 7 November 2018 / Published: 12 November 2018

(This article belongs to the Special Issue *Alternative Models for the Study of Fungal Host-Pathogen Interactions*)

## Abstract

Faced with ethical conflict and social pressure, researchers have increasingly chosen to use alternative models over vertebrates in their research. Since the innate immune system is evolutionarily conserved in insects, the use of these animals in research is gaining ground. This review discusses *Tenebrio molitor* as a potential model host for the study of pathogenic fungi. Larvae of *T. molitor* are known as cereal pests and, in addition, are widely used as animal and human feed. A number of studies on mechanisms of the humoral system, especially in the synthesis of antimicrobial peptides, which have similar characteristics to vertebrates, have been performed. These studies demonstrate the potential of *T. molitor* larvae as a model host that can be used to study fungal virulence, mycotoxin effects, host immune responses to fungal infection, and the action of antifungal compounds.

**Keywords:** alternative method of infection, *Candida* spp. *Cryptococcus* spp., invertebrate host model, mycotoxins, innate immunity, hemocytes, mealworm, tenecin, fungal infection

## 1. Alternative Methods of Infection

Vertebrate animals, such as mice, are widely used in basic scientific and medical research for studies of microbial pathogenicity, testing of substances of pharmacological interest, the production of vaccines, evaluation of the effectiveness of antibiotics, and in the development of new therapies [1,2]. However, the pain, distress, and sacrifice of animals during scientific experiments has been questioned by researchers and society [3]. Thus, the ethics of this practice began to be reformulated since the nineteenth century [4], which determined the approval of laws and actions to control the use of animals in research.

In addition to ethical concerns, the use of animals in research requires a high economic investment, skilled labor, and time-consuming protocols [5,6]. In this context, several industrial sectors and regulators of product quality are increasingly being pressured to replace, or reduce, animal experimentation with alternative methodologies. Alternative proposals are based on the principle of the 3Rs, which was introduced to the scientific community in 1959 by William Russell and Rex Burch in the book *Principles of Humane Experimental Technique* [5]. The acronym stands for “Refinement”, which proposes to better plan the procedures performed on animals, with the aim of minimizing pain and/or stress; “Reduction” of the number of animals in the experiments, using alternative techniques to obtain reliable results; and “Replacement”, which advocates the replacement of vertebrate use by non-sentient animals. Indeed, the use of invertebrate animals as alternative model hosts has increased dramatically in the last decade, in order to avoid and/or reduce the use of vertebrates in experiments [6].

Insects have been increasingly chosen as a model host to study microbial infections [7]. This is due to the presence of an innate immune system similar to vertebrates. Although the responses of the insect’s immune system are not specific, because they do not produce antibodies, they possess a complex innate immune system with both cellular and humoral elements [8,9]. The innate humoral response of insects is orchestrated by processes that inhibit the proliferation of pathogens and assist in their elimination, such as melanization, hemolymph coagulation, induction of the synthesis of reactive species, and antimicrobial peptides [10,11]. Cellular responses are mediated by cells called hemocytes, which play an important role in

defense, as they are involved in phagocytosis, nodule formation, and encapsulation [12].

The use of insects as an alternative model also provides other advantages, such as the absence of ethical restriction. In addition, when compared to traditional mammalian models, breeding is inexpensive and easy to maintain, as it does not require a sophisticated laboratory. In addition, the lifecycle is short, allowing large-scale experiments in a short period of time. Thus, several insects have been widely used, notably, the fruit fly *Drosophila melanogaster*, and some species of Lepidoptera and Coleoptera [13,14].

Here, we will discuss the use of *Tenebrio molitor* larvae (mealworm) as an alternative host model in the study of pathogenic fungi, including the biological characteristics of the animal, particularities regarding its immunity, as well as the first studies involving medically important fungi.

## 2. *Tenebrio molitor*

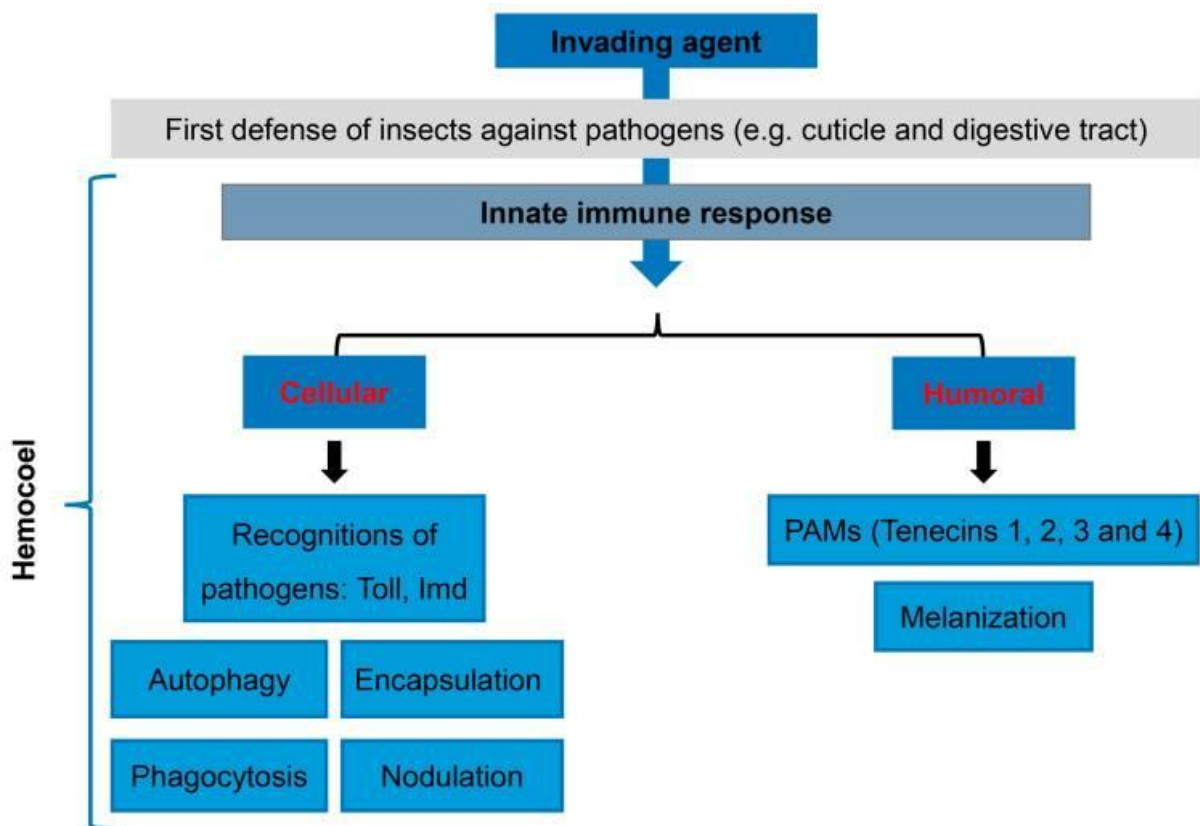
*Tenebrio molitor* (Linnaeus, 1758), popularly known as the mealworm, belongs to the order Coleoptera and family Tenebrionidae. It is found worldwide, however, it has climatic preferences for temperate regions of the northern hemisphere [15,16]. This insect exhibits holometabolism (complete metamorphosis), in which its lifecycle is composed of 4 stages: embryo stage (eggs), larval phase, pupa phase, and adult phase (Figure 1). In addition, the larval phase presents a series of stages or instars, which is reached after the ecdysis process [15,16]. According to Park et al. [17], *T. molitor* presents up to 20 instars.



**Figure 1** - Lifecycle of the beetle *Tenebrio molitor*: (A) larval stage, (B) pupal stage, and (C) adult stage.

### 3. Cellular and Humoral Immunology of *T. molitor* as a Tool to Study Human Immunity

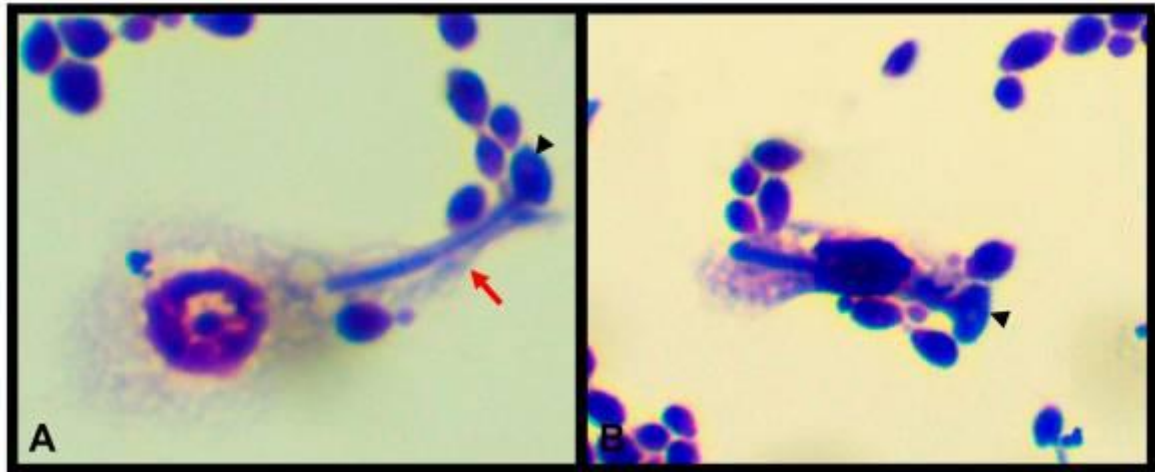
In order to protect against potentially pathogenic microbes, the integument and digestive tract represent the first line of defense, which plays an important role against infections. However, when these barriers are overcome, the invading pathogen is exposed to a range of cellular and humoral mechanisms (Figure 2) [35].



**Figure 2** - Schematic diagram of *T. molitor* immune response.

In a study carried out by Urbański and collaborators [36], four hemocyte types were observed: granulocytes, plasmatocytes, oenocytoids, and prohemocytes, according to their size and morphology. Prohemocytes have been considered to be stem cells, with the ability to differentiate into other cell types [12]. In addition, granulocytes and plasmatocytes are the most abundant types in hemolymph, the only ones with adherent properties, and are the cells responsible for phagocytic activity (Figure 3), encapsulation, and nodulation [37,38]. The enzyme phenoloxidase (PO) plays a key role in mediating this important defense mechanism. This enzyme is the

main component responsible for the melanization process of hemocytes attached to the pathogen [39]. Studies indicate that prophenoloxidase (proPO) is predominantly synthesized by granulocyte and oenocytoid hemocytes, and depends on the insect species [40].



**Figure 3** - Plasmatocyte (A) and granulocyte (B) phagocytizing *Candida albicans*. May-GrünwaldGiemsa staining and 2 h of co-incubation. Cytoplasmic projections (pseudopodium—red arrow) towards the fungus (arrowhead) is observed. 100× objective lens.

The process of phagocytosis refers to the internalization of foreign bodies by a single hemocyte through the formation of pseudopods (Figure 3) [41]. The similarity of phagocytic activity between hemocytes and neutrophils in vertebrates has been noted [42]. In addition, autophagy, which is another evolutionary mechanism conserved in insects, has already been demonstrated in *T. molitor* [43]. This autophagic response assists in cellular homeostasis, and also plays an important role in cellular innate immune responses because it contributes to the phagocytic elimination of pathogens [41,43,44].

When the pathogen burden is too large to be phagocytosed, nodulation and encapsulation processes occur. These mechanisms, unlike phagocytosis, refer to the multiple actions of hemocytes, which aggregate around the target [12]. These processes are complex and exhibit cellular and humoral immune reactions, including activators of a complex enzyme system, termed prophenoloxidase (proPO) [45]. In the process of melanization, the isolation of pathogens usually occurs through encapsulation. In addition, the microorganisms that are involved in a melanized layer of hemocytes die from lack of oxygen or from the release of compounds produced by phenoloxidase activity [46], such as reactive oxygen species [11]. It has been

demonstrated that melanin is crucial for *T. molitor* immunity, including cuticular melanization, which results in a resistance to pathogen infection [47]. Barnes and Siva-Jothy [48] observed that larvae with higher degrees of cuticular melanization showed greater resistance when exposed to the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*.

Beyond melanization, the synthesis of peptides with antimicrobial activity (PAMs), is one of the main mechanisms of humoral immunity against pathogens, both in insects and vertebrates [49,50]. In *T. molitor*, 4 different types of PAMs are known: tenecins 1, 2, 3, and 4. Tenecin 2, which acts against Gram-negative bacteria and fungi, is a molecule similar to coleopteracin and holotricin, which are PAMs produced by the coleopterae *Zophobas atratus* and *Holotrichia diomphalia*, respectively [51,52]. Tenecin 3 is a glycine-rich peptide which targets fungi [53,54,55,56], whereas tenecins 1 and 4 have activity only against Gram-positive and Gram-negative bacteria, respectively [56,57].

Immunogenic molecules of microorganisms, such as fungi  $\beta$ -1,3-glucan, or lipopolysaccharides of Gram-negative bacteria and peptidoglycans of Gram-positive bacteria, can induce the synthesis of PAMs in insects through the activation of two main signaling pathways: the Toll-like pathway and the immunodeficiency pathway (Imd) [56,58]. Toll-like membrane receptors are an evolutionarily conserved receptor family, and the Imd pathway is analogous to the tumor necrosis factor (TNF) signaling pathway in humans [59]. It is known that tenecins 1 and 2 are activated mainly by the Toll signaling pathway [52]. Tenecin 4 is activated by both the Toll pathway and the Imd pathway [56]. Tenecin 3, on the other hand, is constitutively produced (without the need for induction) and the molecular mechanisms involved in its synthesis have not yet been determined [56,60].

In addition, a recent study has discovered a novel membrane receptor produced by *T. molitor*. This receptor is a class C hijacker, which plays a key role in phagocytosis of fungi and Gram-positive and Gram-negative bacteria [61].

Although insects do not have an adaptive immune response, studies with *T. molitor* larvae and entomopathogenic fungi have demonstrated that the innate immune response of this insect can be long-lasting, even when the immunogenic agent no longer present. The process has been termed as immune priming, and is known to provide a prophylactic effect, being functionally similar to the adaptive immune response of vertebrates [62]. For example, a previous exposure of larvae to a nylon

monofilament increased insect protection when challenged by *Beauveria bassiana* after a week after the first exposure. The material injected into the animal apparently induced the encapsulation response, indicated by darkening of the body of the insect due to melanization [63]. Another study showed that larvae that were pre-challenged with lipopolysaccharides also presented greater resistance to *M. anisopliae* infection [62].

Another important attribute related to immune priming is its species-specific character. Larvae that were exposed two times to the same pathogen (*M. anisopliae*) presented a higher survival rate than larvae that were challenged with this fungus and later exposed to *Bacillus thuringiensis* and *Serratia marcescens* [64]. In addition, immune priming has the ability to be transmitted between generations. Immune-challenged mothers can improve their offspring immunity through transgenerational immune priming. It has been proven that enhancement of offspring immunity increases egg hatching success and larval survival [65].

Thus, despite the lack of a true adaptive immune system, *T. molitor* exhibits complex immune responses with evidence of recall, demonstrating its potential as an alternative infection model.

#### **4. *T. molitor* as an Alternative Host in the Study of Human Pathogenic Fungi**

When compared to other alternative host models used in the study of human fungal pathogens, *T. molitor* has some major advantages. The mealworm can be incubated at 37 °C which, for many pathogens, is a critical environmental cue for the expression of virulence factors. For example, physiological temperature stimulates the production of invasive hyphal filaments by *C. albicans*. Other models, however, do not support such high temperatures. *D. melanogaster* survives at a temperature of 18 °C to 30 °C, and the best temperature to perform tests with the *Caenorhabditis elegans* worm is 15 °C to 25 °C [66].

A second important feature is the size of the larva. Since *T. molitor* larvae are relatively large, this allows the extraction of a considerable volume of hemolymph (5–10 µL/larva of the 12th instar) to analyze. This represents an advantage over other model organisms, such as the fruit fly, since its size allows the extraction of only small volumes of hemolymph (0.05–0.3 µL/larva of 3rd instar) [67]. Another advantage is that the inoculum is administered by injection, allowing direct introduction into the

hemolymph of the animal [68]. Additionally, dead larvae are easily identified because they turn brown through melanization, as illustrated in Figure 4.



**Figure 4** - *T. molitor* larva infected with  $10^6$  *C. albicans* yeasts. (A) 24 h after infection. (B) 30 h after infection.

Another widely used model is the wax moth larva *Galleria mellonella*. This insect has similar characteristics as *T. molitor* as an alternative host, since it can be incubated at 37 °C, the inoculum can be supplied by injection [66], and it also has a substantial volume of hemolymph. However, its breeding in laboratory conditions is more laborious, and *G. mellonella* is not marketed in some countries, forcing institutions to maintain their own supply. This raises the costs of the experiments, and requires the technical manpower responsible for their maintenance. In Brazil, there are several commercial suppliers of *T. molitor*.

## 5. Investigating Physiological Changes Due to Ingestion of Mycotoxins

In 1973, Reiss [69] published the first work involving the use of *T. molitor* in the investigation of diseases caused by fungi. Beetle larvae were used as an animal model to understand the physiological changes that occurred after ingestion of food contaminated with mycotoxin-producing fungi. In this study, the larvae were fed with bread contaminated with *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium expansum*, *Cladosporium herbarum*, and *Neurospora sitophila*, and their masses were measured daily. It was observed that all isolates, except for *N. sitophila*, presented toxicity. *A. flavus* had the greatest inhibitory effect on larval development. These findings

demonstrated the similarity of the physiological response of the insect to mammals, since exposure to aflatoxin (FA), produced by *A. flavus*, is associated with weight loss and reduced stature in children [70,71]. In addition, it is also related to economic losses due to the reduction of the body mass of pigs and cattle [72,73,74].

Similarly, insect feeding with cereals colonized by species of the genus *Fusarium* also leads to a reduction of growth [75], and even death of the larvae [76]. These findings, again, correlate with research on vertebrates. Fumonisin (FM), the mycotoxin produced by *Fusarium* spp., is associated with reduced food consumption and weight in pigs [77]. In addition, Kimanya *et al.* [78] showed that children who ingested FM in more than the maximum provisional daily dose, grew less and were lighter than children who did not exceed this limit.

On the other hand, Bosh *et al.* (2017) demonstrated that *T. molitor* larvae fed with an aflatoxin B1-contaminated diet did not present alterations in survival rate and body weight, nor was there an accumulation of the substance in the animal [79]. An explanation for these findings is based on the ability of fungi to produce different types of mycotoxins. In the studies cited above, the fungus was mixed into the diet, and was then heat inactivated, leaving the mycotoxins secreted by it in the samples [69,70,71,72,73,74,75,76,77,78]. Thus, these findings suggest that their toxic effects are due to a combination of toxins, rather than the action of an isolated mycotoxin.

## **6. Studying Infections Caused by Fungi of Clinical Interest and Evaluating the Antifungal Activity of Compounds**

Yeasts are the primary fungi isolated from disseminated infections, with *Candida* and *Cryptococcus* species being the most frequently isolated. Both of these species are dimorphic, however, *C. albicans* hyphae have the invasive morphology and are associated with virulence, whilst *Cryptococcus* grow as yeast during infection [80,81,82,83]. In this context, our research group showed, for the first time, the utility of *T. molitor* as a model host to study infections caused by *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* [84]. In this work, *T. molitor* larvae were infected with different concentrations of *C. albicans* and *C. neoformans*, and the mortality was determined. We found that the larval survival decreased proportionally to the increase in inoculum concentration [84], similar to that of *G. mellonella* and mice when challenged with these yeasts [85].

In addition, histological sections of the infected tissue demonstrated the formation of *C. albicans* hyphae and mycelia [84], similar to what is observed in other models, including mice [86], hemoperfused porcine liver [87], chicken chorioallantoic membrane [88], and *G. mellonella* [85]. In the tissue infected with *C. neoformans*, the pathogenic yeast morphology was observed, as in *Galleria* and mice models, and clinically [85,89].

This insect was also recently chosen to study the virulence of *Malassezia furfur*. It was shown that yeasts cultivated under conditions of nutrients scarcity were more virulent to *T. molitor* larva than those cultivated in complete medium [90]. Nutritional stress leads to a change in microorganism metabolism which, in order to adapt to these conditions, can express their virulence factors [91]. The authors obtained similar results using *C. elegans* as an animal model and concluded that, in this sense, the methodology using *T. molitor* was efficient [90].

*T. molitor* can also be used to study infections caused by filamentous fungi. [92] infected *T. molitor* larvae with *Fonsecaea* species (etiological agents responsible for human chromoblastomycosis, a granulomatous and chronic skin infection) [93] and found structures similar to muriform cells in the tissue infected with *Fonsecaea pedrosoi*. In an earlier study performed with *G. mellonella*, this event was not observed [94]. However, conidia of *F. pedrosoi* presenting this morphology are common in histological samples of mice previously infected by the fungus [95,96].

Given the utility of the mealworm as an alternative model in the evaluation of different anthelmintic compounds [97], Morey and collaborators [98] used this model to verify the efficacy of a potential antifungal agent. In this work, the larvae of *T. molitor* were infected with *Candida tropicalis*, and treated with a tannin-rich fraction from a *Stryphnodendron adstringens* extract. The survival of the insects that received the inoculum containing the fraction of the plant extract was significantly higher compared to the group without treatment, indicating not only that the larvae are sensitive to *C. tropicalis* infection, but can also be used as an alternative host model to evaluate the activity of potential antifungal compounds [98].

## 7. Conclusions

*T. molitor* has a complex innate immune system, consisting of humoral and cellular responses and, because it is sensitive to infection with a range of medically

important microorganisms, its use as an alternative host in the study of pathogenic fungi is now being recognized. As discussed here, *T. molitor* represents a potential invertebrate host that could be used to study the virulence of fungi, toxicity due to the ingestion of mycotoxin-producing fungi, the host's immune responses to fungal infections, and the action of antifungal compounds. However, the current number of studies is limited. In addition, there is a need to standardize the tests using *T. molitor* larvae in the study of pathogenic fungi.

### **Acknowledgments**

We thank Junqueira J.C. and Mylonakis E. for the invitation to participate in this Special Issue.

### **Author Contributions**

P.C.d.S. and C.C.C.: literature search, manuscript writing; D.W.: graphical abstract design, manuscript revision; R.S.A.: manuscript formatting, writing, figure design, and manuscript revision.

### **Funding**

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior —Brasil (CAPES)—Finance Code 001. C.C.C. and P.C.S. were financed by CAPES scholarships.

### **Conflicts of Interest**

The authors declare no conflict of interest.

### **References**

1. Hendriksen C.F. Replacement, reduction and refinement alternatives to animal use in vaccine potency measurement. *Expert Rev. Vaccines*. 2009;8:313–322. doi: 10.1586/14760584.8.3.313. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

2. Giacomotto J., Segalat L. High-throughput screening and small animal models, where are we? *Br. J. Pharmacol.* 2010;160:204–216. doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.00725.x. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
3. Rollin B.E. Toxicology and new social ethics for animals. *Toxicol. Pathol.* 2003;31:128–131. doi: 10.1080/01926230390175011. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
4. Franco N.H. Animal experiments in biomedical research: A historical perspective. *Animals (Basel)* 2013;19:238–273. doi: 10.3390/ani3010238. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
5. Balls M. Replacement of animal procedures: Alternatives in research, education and testing. *Lab. Anim.* 1994;28:193–211. doi: 10.1258/002367794780681714. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
6. Doke S.K., Dhawale S.C. Alternatives to animal testing: A review. *Saudi Pharm. J.* 2015;23:223–229. doi: 10.1016/j.jsps.2013.11.002. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
7. Trevijano-Contador N., Zaragoza O. Expanding the use of alternative models to investigate novel aspects of immunity to microbial pathogens. *Virulence.* 2014;15:454–456. doi: 10.4161/viru.28775. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
8. Vilmos P., Kurucz E. Insect immunity: Evolutionary roots of the mammalian innate immune system. *Immunol. Lett.* 1998;62:59–66. doi: 10.1016/S0165-2478(98)00023-6. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
9. Browne N., Heelan M., Kavanagh K. An analysis of the structural and functional similarities of insect hemocytes and mammalian phagocytes. *Virulence.* 2013;1:597–603. doi: 10.4161/viru.25906. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

10. Tokura A., Fu G.S., Sakamoto M., Endo H., Tanaka S., Kikuta S., Tabunoki H., Sato R. Factors functioning in nodule melanization of insects and their mechanisms of accumulation in nodules. *J. Insect Physiol.* 2014;60:40–49. doi: 10.1016/j.jinsphys.2013.11.003. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
11. Dubovskii I.M., Grizanova E.V., Chertkova E.A., Slepneva I.A., Komarov D.A., Vorontsova Y.L., Glupov V.V. Generation of reactive oxygen species and activity of antioxidants in hemolymph of the moth larvae *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Piralidae) at development of the process of encapsulation. *Zh. Evol. Biokhim. Fiziol.* 2010;46:30–36. doi: 10.1134/S0022093010010044. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
12. Lavine M.D., Strand M.R. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2002;32:1295–1309. doi: 10.1016/S0965-1748(02)00092-9. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
13. Lionakis M.S. *Drosophila* and *Galleria* insect model hosts: New tools for the study of fungal virulence, pharmacology and immunology. *Virulence.* 2011;2:521–527. doi: 10.4161/viru.2.6.18520. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
14. Wilson-Sanders S.E. Invertebrate models for biomedical research, testing, and education. *ILAR J.* 2011;52:126–152. doi: 10.1093/ilar.52.2.126. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
15. Hill D.S. *Pests: Class Insecta. Pests of Stored Foodstuffs and Their Control.* Kluwer Academic Publishers; New York, NY, USA; Boston, MA, USA; Dordrecht, The Netherlands; London, UK; Moscow, Russia: 2003. pp. 135–315. [[Google Scholar](#)]
16. Ghaly A.E., Alkoaik F.N. The yellow mealworm as a novel source of protein. *Am. J. Agric. Biol. Sci.* 2009;4:319–331. doi: 10.3844/ajabssp.2009.319.331. [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

17. Park J.B., Choi W.H., Kim S.H., Jin H.J., Han Y.S., Lee Y.S., Kim N.J. Developmental characteristics of *Tenebrio molitor* larvae (Coleoptera: Tenebrionidae) in different instars. *Int. J. Ind. Entomol.* 2014;28:5–9. doi: 10.7852/ijie.2014.28.1.5. [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
18. Cotton R.T. Notes on the biology of the meal worms *Tenebrio molitor* Linne and *T. obscurus* Fab. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 1927;20:81–86. doi: 10.1093/aesa/20.1.81. [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
19. Morales-Ramos J.A., Kay S., Rojas M.G., Shapiro-Ilan D.I., Tedders W.L. Morphometric analysis of instar variation in *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) *Ann. Entomol. Soc. Am.* 2015;108:146–159. doi: 10.1093/aesa/sau049. [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
20. Ludwig D. Effect of temperature and parental age in the life cycle of the mealworm, *Tenebrio molitor* Linnaeus (Coleoptera, Tenebrionidae) *Ann. Entomol. Soc. Am.* 1956;49:12–15. doi: 10.1093/aesa/49.1.12. [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
21. Bjørge J.D., Overgaard J., Malte H., Gianotten N., Heckmann L.H. Role of temperature on growth and metabolic rate in the tenebrionid beetles *Alphitobius diaperinus* and *Tenebrio molitor*. *J. Insect Physiol.* 2018;107:89–96. doi: 10.1016/j.jinsphys.2018.02.010. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
22. Urs K.C.D., Hopkins T.L. Effect of moisture on growth rate and development of two strains of *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera, Tenebrionidae) *J. Stored Prod. Res.* 1973;8:291–297. doi: 10.1016/0022-474X(73)90045-3. [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
23. Loudon C. Development of *Tenebrio molitor* in low oxygen levels. *J. Insect Physiol.* 1988;34:97–103. doi: 10.1016/0022-1910(88)90160-6. [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
24. Morales-Ramos J.A., Rojas M.G., Shapiro-Ilan D.I., Tedders W.L. Developmental plasticity in *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae): Analysis of instar variation

- in number and development time under different diets. *J. Entomol. Sci.* 2010;45:75–90. doi: 10.18474/0749-8004-45.2.75. [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
25. Connat J.L., Delbecque J.P., Glitho I., Delachambre J. The onset of metamorphosis on *Tenebrio molitor* larvae (Insecta, Coleoptera) under grouped, isolated, and starved conditions. *J. Insect Physiol.* 1991;37:653–662. doi: 10.1016/0022-1910(91)90042-X. [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
26. Cotton R.T. *Pests of Stored Grain and Grain Products*. Burgess Publishing Company; Minneapolis, MN, USA: 1963. p. 318. [[Google Scholar](#)]
27. Phillips T.W., Throne J.E. Biorational approaches to managing stored-product Insect. *Annu. Rev. Entomol.* 2010;55:375–397. doi: 10.1146/annurev.ento.54.110807.090451. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
28. Grau T., Vilcinskas A., Joop G. Sustainable farming of the mealworm *Tenebrio molitor* for the production of food and feed. *Z. Naturforsch.* 2017;72:337–349. doi: 10.1515/znc-2017-0033. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
29. Ng W.K., Liew F.L., Ang L.P., Wong K.W. Potential of mealworm (*Tenebrio molitor*) as an alternative protein source in practical diets for African catfish, *Clarias gariepinus*. *Aquac. Res.* 2002;32:273–280. doi: 10.1046/j.1355-557x.2001.00024.x. [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
30. Font E., Molina-Borja M. Ultraviolet reflectance of color patches in *Gallotia galloti* lizards from Tenerife, Canary Islands. In: Mellado V.P., editor. *The Biology of Lacertid Lizards: Evolutionary and Ecological Perspectives*. Volume 8. Institut Menorquí d'Estudis; Balearic Islands, Spain: 2004. pp. 201–221. [[Google Scholar](#)]
31. Martinson T.J., Flaspohler D.J. Winter bird feeding and localized predation on simulated bark-dwelling arth. *Wildl. Soc. Bull.* 2003;31:510–516. [[Google Scholar](#)]

32. McCartney J., Stringer I.A.N., Potter M.A. Feeding activity in captive New Zealand lesser short-tailed bats (*Mystacina tuberculata*) *N. Z. J. Zool.* 2007;34:227–238. doi: 10.1080/03014220709510081. [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
33. Kim H.W., Setyabrata D., Lee Y.J., Jones O.G., Kim Y.H.B. Pre-treated mealworm larvae and silkworm pupae as a novel protein ingredient in emulsion sausages. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 2016;38:116–123. doi: 10.1016/j.ifset.2016.09.023. [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
34. Adámková A., Miček J., Kouřimská L., Borkovcová M., Bušina T., Adámek M., Bednářová M., Krajsa J. Nutritional Potential of Selected Insect Species Reared on the Island of Sumatra. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2017;14:521. doi: 10.3390/ijerph14050521. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
35. Anggraeni T., Ratcliffe N.A. Studies on cell-cell co-operation during phagocytosis by purified haemocyte populations of the wax moth, *Galleria mellonella*. *J. Insect Physiol.* 1991;37:453–460. doi: 10.1016/0022-1910(91)90055-5. [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
36. Urbański A., Adamski Z., Rosiński G. Developmental changes in haemocyte morphology in response to *Staphylococcus aureus* and latex beads in the beetle *Tenebrio molitor* L. *Micron.* 2018;104:8–20. doi: 10.1016/j.micron.2017.10.005. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
37. Ratcliffe N.A. Cellular defense responses of insects: Unresolved problems. In: Beckage N.E., Thompson S.N., Federici B.A., editors. *Parasites and Pathogens of Insects*. Volume 1. Academic Press; San Diego, CA, USA: 1993. pp. 267–304. [[Google Scholar](#)]
38. Strand M.R., Pech L.L. Immunological basis for compatibility in parasitoid–host relationships. *Annu. Rev. Entomol.* 1995;40:31–56. doi: 10.1146/annurev.en.40.010195.000335. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

39. Pech L.L., Strand M.R. Plasmatocyte from the moth *Pseudoplusia includens* induce apoptosis of granular cells. *J. Insect Physiol.* 2000;42:1565–1573. doi: 10.1016/S0022-1910(00)00083-4. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
40. Ribeiro C., Brehelin M. Insect hemocytes: What type of cell is that? *J. Insect Physiol.* 2006;52:417–429. doi: 10.1016/j.jinsphys.2006.01.005. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
41. Oczypok E.A., Oury T.D., Chu C.T. It's a cell-eat-cell world, Autophagy and phagocytosis. *Am. J. Pathol.* 2013;182:612–622. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.12.017. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
42. Strand M.R. The insect cellular immune response. *Insect Sci.* 2008;15:1–14. doi: 10.1111/j.1744-7917.2008.00183.x. [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
43. Tindwa H., Jo Y.H., Patnaik B.B., Lee Y.S., Kang S.S., Han Y.S. Molecular cloning and characterization of autophagy-related gene TmATG8 in *Listeria*-invaded hemocytes of *Tenebrio molitor*. *Dev. Comp. Immunol.* 2015;51:88–98. doi: 10.1016/j.dci.2015.02.017. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
44. Yuk J.-M., Yoshimori T., JO E.-K. Autophagy and bacterial infectious diseases. *Exp. Mol. Med.* 2012;44:99–108. doi: 10.3858/emm.2012.44.2.032. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
45. Dubovskiy I.M., Kryukova N.A., Glupov V.V., Ratcliffe N.A. Encapsulation and nodulation in insects. *Invertebr. Surviv. J.* 2016;13:229–246. [[Google Scholar](#)]
46. Sugumaran H. Comparative biochemistry of eumelanogenesis and the protective roles of phenoloxidase and melanin in insects. *Pigment Cell Res.* 2002;15:2–9. doi: 10.1034/j.1600-0749.2002.00056.x. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

47. Armitage S.A.O., Siva-Jothy M.T. Immune function responds to selection for cuticular colour in *Tenebrio molitor*. *Heredity (Edinb.)* 2005;94:650–656. doi: 10.1038/sj.hdy.6800675. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
48. Barnes A.I., Siva-Jothy M.T. Density-dependent prophylaxis in the mealworm beetle *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae): Cuticular melanization is an indicator of investment in immunity. *Proc. Biol. Sci.* 2000;22:177–182. doi: 10.1098/rspb.2000.0984. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
49. Bulet P., Hetru C., Dimarcq J.L., Hoffmann D. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Dev. Comp. Immunol.* 1999;23:329–344. doi: 10.1016/S0145-305X(99)00015-4. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
50. Auvynet C., Rosenstein Y. Multifunctional host defense peptides: Antimicrobial peptides, the small yet big players in innate and adaptive immunity. *FEBS J.* 2009;276:6497–6508. doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07360.x. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
51. Lee S.Y., Moon H.J., Kurata S., Kurama T., Natori S., Lee B.L. Purification and molecular cloning of cDNA for an inducible antibacterial protein of larvae of a coleopteran insect, *Holotrichia diomphalia*. *J. Biochem.* 1994;115:82–86. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a124309. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
52. Roh K.B., Kim C.H., Lee H., Kwon H.M., Park J.W., Ryu J.H., Kurokawa K., Ha N.C., Lee W.J., Lemaitre B., *et al.* Proteolytic cascade for the activation of the insect toll pathway induced by the fungal cell wall component. *J. Biol. Chem.* 2009;284:19474–19481. doi: 10.1074/jbc.M109.007419. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
53. Lee Y.J., Chung T.J., Park C.W., Hahn Y., Chung J.H., Lee B.L., Han D.M., Jung Y.H., Kim S., Lee Y. Structure and expression of the tenecin 3 gene in *Tenebrio molitor*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996;218:6–11. doi: 10.1006/bbrc.1996.0002. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

54. Lee Y.-T., Kim D.H., Suh J.Y., Chung J.H., Lee B.L., Lee Y., Choi B.S. Structural characteristics of tenecin 3, an insect antifungal protein. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1999;47:369–376. doi: 10.1080/15216549900201393. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
55. Kim D.H., Lee D.G., Kim K.L., Lee Y. Internalization of tenecin 3 by a fungal cellular process is essential for its fungicidal effect on *Candida albicans*. *Eur. J. Biochem.* 2001;268:4449–4458. doi: 10.1046/j.1432-1327.2001.02364.x. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
56. Chae J.H., Kurokawa K., So Y.I., Hwang H.O., Kim M.S., Park J.W., Jo Y.H., Lee Y.S., Lee B.L. Purification and characterization of tenecin 4, a new anti-Gram-negative bacterial peptide, from the beetle *Tenebrio molitor*. *Dev. Comp. Immunol.* 2012;36:540–546. doi: 10.1016/j.dci.2011.09.010. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
57. Moon H.J., Lee S.Y., Kurata S., Natori S., Lee B.L. Purification antibacterial molitorI and molecular protein from cloning larvae of cDNA for an inducible of the coleopteran, *Tenebrio molitor*. *J. Biochem.* 1994;116:53–58. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a124502. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
58. Kim D.H., Patnaik B.B., Seo G.W., Kang S.M., Lee Y.S., Lee B.L., Han Y.S. Identification and expression analysis of a novel R-type lectin from the coleopteran beetle, *Tenebrio molitor*. *J. Invertebr. Pathol.* 2013;114:226–229. doi: 10.1016/j.jip.2013.08.002. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
59. Chamilos G., Lionakis M.S., Lewis R.E., Kontoyiannis D.P. Role of mini-host models in the study of medically important fungi. *Lancet Infect. Dis.* 2007;7:42–55. doi: 10.1016/S1473-3099(06)70686-7. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
60. Maistrrou S., Paris V., Jensen A.B., Rolff J., Meyling N.V., Zanchi C. A constitutively expressed antifungal peptide protects *Tenebrio molitor* during a natural infection by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Dev. Comp.*

*Immunol.* 2018;86:26–33. doi: 10.1016/j.dci.2018.04.015. [[PubMed](#)]  
[[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

61. Kim S.G., Jo Y.H., Seong J.H., Park K.B., Noh M.Y., Cho J.H., Ko H.J., Kim C.E., Tindwa H., Patnaik B.B., *et al.* TmSR-C, scavenger receptor class C, plays a pivotal role in antifungal and antibacterial immunity in the coleopteran insect *Tenebrio molitor*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2017;89:31–42. doi: 10.1016/j.ibmb.2017.08.007. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

62. Moret Y., Siva-Jothy M.T. Adaptive innate immunity? Responsive-mode prophylaxis in the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. *Proc. Biol. Sci.* 2003;270:2475–2480. doi: 10.1098/rspb.2003.2511. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

63. Krams I., Daukste J., Kivleniece I., Krama T., Rantala M.J. Previous encapsulation response enhances within individual protection against fungal parasite in the mealworm beetle *Tenebrio molitor*. *Insect Sci.* 2013;20:771–777. doi: 10.1111/j.1744-7917.2012.01574.x. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

64. Gomez H.M., Rivas G.A., Hernández-Quintero A., Hernández A.G., Guzmán J.C.T., Mendoza H.L., Contreras-Garduño J. The occurrence of immune priming can be species-specific in entomopathogens. *Microb Pathog.* 2018;118:361–364. doi: 10.1016/j.micpath.2018.03.063. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

65. Dhinaut J., Chogne M., Moret Y. Trans-generational immune priming in the mealworm beetle protects eggs through pathogen-dependent mechanisms imposing no immediate fitness cost for the offspring. *Dev. Comp. Immunol.* 2018;79:105–112. doi: 10.1016/j.dci.2017.10.017. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

66. Desalermos A., Fuchs B.B., Mylonakis E. Selecting an invertebrate model host for the study of fungal pathogenesis. *PLoS Pathog.* 2012;8:e1002451. doi: 10.1371/journal.ppat.1002451. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

67. Piyankarage S.C., Augustin H., Grosjean Y., Featherstone D.E., Shippy S.A. Hemolymph amino acid analysis of individual *Drosophila* larvae. *Anal. Chem.* 2008;80:1201–1207. doi: 10.1021/ac701785z. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
68. Oppert B., Dowd S.E., Bouffard P., Li L., Conesa A., Lorenzen M.D., Toutges M., Marshall J., Huestis D.L., Fabrick J., *et al.* Transcriptome profiling of the intoxication response of *Tenebrio molitor* larvae to *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa protoxin. *PLoS ONE*. 2012;7:e34624. doi: 10.1371/journal.pone.0034624. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
69. Reiss J. Toxicity of molds to the larvae of *Tenebrio molitor*. *J. Invertebr. Pathol.* 1973;21:112–113. doi: 10.1016/0022-2011(73)90120-1. [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
70. Gong Y.Y., Cardwell K., Hounsa A., Egal S., Turner P.C., Hall A.J., Wild C.P. Dietary aflatoxin exposure and impaired growth in young children from Benin and Togo: Cross sectional study. *BMJ*. 2002;325:20–21. doi: 10.1136/bmj.325.7354.20. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
71. Gong Y., Hounsa A., Egal S., Turner P.C., Sutcliffe A.E., Hall A.J., Cardwell K., Wild C.P. Postweaning exposure to aflatoxin results in impaired child growth: A longitudinal study in Benin, West Africa. *Environ. Health Perspect.* 2004;112:1334–1338. doi: 10.1289/ehp.6954. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
72. Helferich W.G., Garrett W.N., Hsieh D.P.H., Baldwin R.L. Feedlot performance and tissue residues of cattle consuming diets containing aflatoxins. *J. Anim. Sci.* 1986;62:691–696. doi: 10.2527/jas1986.623691x. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
73. Panangala V.S., Giambrone J.J., Diener U.L., Davis N.D., Hoerr F.J., Mitra A., Schultz R.D., Wilt G.R. Effects of aflatoxin on the growth, performance, and immune

responses of weanling swine. *Am. J. Vet. Res.* 1986;47:2062–2067. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

74. Choudhary P.L.R., Sharmn S., Borkhatarin V.N., Desaii M.C. Effect of feeding aflatoxin B1 on feed consumption through naturally contaminated feeds. *Indian J. Anim. Sci.* 1998;68:400–401. [[Google Scholar](#)]

75. Davis G.R.F., Smith J.D., Schiefer B., Loew F.M. Screening for mycotoxins with larvae of *Tenebrio molitor*. *J. Invertebr. Pathol.* 1975;26:299–303. doi: 10.1016/0022-2011(75)90225-6. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

76. Guo Z., Döll K., Dastjerdi R., Karlovsky P., Dehne H.W., Altincicek B. Effect of fungal colonization of wheat grains with *Fusarium* spp. on food choice, weight gain and mortality of meal beetle larvae (*Tenebrio molitor*) *PLoS ONE*. 2014;16:e100112. doi: 10.1371/journal.pone.0100112. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

77. Dilkin P., Zorzete P., Mallmann C.A., Gomes J.D., Utiyama C.E., Oetting L.L., Corrêa B. Toxicological effects of chronic low doses of aflatoxin b-1 and fumonisin b-1 containing *Fusarium moniforme* culture material in weaned piglets. *Food Chem. Toxicol.* 2003;41:1345–1353. doi: 10.1016/S0278-6915(03)00137-6. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

78. Kimanya M.E., De Meulenaer B., Roberfroid D., Lachat C., Kolsteren P. Fumonisin exposure through maize in complementary foods is inversely associated with linear growth of infants in Tanzania. *Mol. Nutr. Food Res.* 2010;54:1659–1667. doi: 10.1002/mnfr.200900483. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

79. Bosch G., van der Fels-Klerx H.J., Rijk T.C.D., Oonincx D.G. Aflatoxin B1 tolerance and accumulation in black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) and yellow mealworms (*Tenebrio molitor*) *Toxins*. 2017;9:185. doi: 10.3390/toxins9060185. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

80. Magalhães Y.C., Bomfim M.R., Melônio L.C., Ribeiro P.C., Cosme L.M., Rhoden C.R., Marques S.G. Clinical significance of the isolation of *Candida* species from hospitalized patients. *Braz. J. Microbiol.* 2015;31:117–123. doi: 10.1590/S1517-838246120120296. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
81. Pfaller M.A., Messer S.A., Jones R.N., Castanheira M. Antifungal susceptibilities of *Candida*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus* from the Asia and Western Pacific region: Data from the SENTRY antifungal surveillance program (2010–2012) *J. Antibiot.* 2015;68:556–561. doi: 10.1038/ja.2015.29. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
82. Chen M., Xu Y., Hong N., Yang Y., Lei W., Du L., Zhao J., Lei X., Xiong L., Cai L., *et al.* Epidemiology of fungal infections in China. *Front. Med.* 2018;12:58–75. doi: 10.1007/s11684-017-0601-0. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
83. Klingspor L., Ullberg M., Rydberg J., Kondori N., Serrander L., Swanberg J., Nilsson K., Jendle Bengtén C., Johansson M., Granlund M., *et al.* Epidemiology of fungaemia in Sweden: A nationwide retrospective observational survey. *Mycoses.* 2018;61:777–785. doi: 10.1111/myc.12816. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
84. de Souza P.C., Morey A.T., Castanheira G.M., Bocate K.P., Panagio L.A., Ito F.A., Furlaneto M.C., Yamada-Ogatta S.F., Costa I.N., Mora-Montes H.M., *et al.* *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) as an alternative host to study fungal infections. *J. Microbiol. Methods.* 2015;118:182–186. doi: 10.1016/j.mimet.2015.10.004. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
85. Fuchs B.B., O'Brien E., Khoury J.B., Mylonakis E., Mylonakis E. Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. *Virulence.* 2010;1:475–482. doi: 10.4161/viru.1.6.12985. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
86. Wilson D., Thewes S., Zakikhany K., Fradin C., Albrecht A., Almeida R., Brunke S., Grosse K., Martin R., Mayer F., *et al.* Identifying infection-associated genes of

*Candida albicans* in the postgenomic era. *FEMS Yeast Res.* 2009;9:688–700. doi: 10.1111/j.1567-1364.2009.00524.x. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

87. Thewes S., Reed H.K., Grosse-Siestrup C., Groneberg D.A., Meissler M., Schaller M., Hube B. Haemoperfused liver as an *ex vivo* model for organ invasion of *Candida albicans*. *J. Med. Microbiol.* 2007;56:266–270. doi: 10.1099/jmm.0.46760-0. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

88. Jacobsen I.D., Grosse K., Berndt A., Hube B. Pathogenesis of *Candida albicans* infections in the alternative chorio-allantoic membrane chicken embryo model resembles systemic murine infections. *PLoS ONE.* 2011;6:e19741. doi: 10.1371/annotation/1912450a-b5a7-4dbe-bc2a-cd93579fb0dd. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

89. Eastman A.J., He X., Qiu Y., Davis M.J., Vedula P., Lyons D.M., Park Y.D., Hardison S.E., Malachowski A.N., Osterholzer J.J., *et al.* Cryptococcal heat shock protein 70 homolog Ssa1 contributes to pulmonary expansion of *Cryptococcus neoformans* during the afferent phase of the immune response by promoting macrophage M2 polarization. *J. Immunol.* 2015;194:5999–6010. doi: 10.4049/jimmunol.1402719. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

90. Silva A.P.R., Valerio A.D., Viana R.O., Ricoy A.C.S., Johann S., Alves V. *Caenorhabditis elegans* and *Tenebrio molitor*—New tools to investigate *Malassezia* species. *Preprints.* 2018 doi: 10.20944/preprints201810.0001.v1. [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

91. Brown A.J.P., Brown G.D., Netea M.G., Gow N.A.R. Metabolism impacts upon *Candida* immunogenicity and pathogenicity at multiple levels. *Trends Microbiol.* 2014;22:614–622. doi: 10.1016/j.tim.2014.07.001. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

92. Fornari G., Gomes R.R., Degenhardt-Goldbach J., dos Santos S.S., de Almeida S.R., dos Santos G.D., Muro M.D., Bona C., Scola R.H., Trindade E.S., *et al.* A model for trans-kingdom pathogenicity in *Fonsecaea* agents of human

chromoblastomycosis. *Front. Microbiol.* 2018;9:2211. doi:

10.3389/fmicb.2018.02211. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

93. Gomes R.R., Vicente V.A., de Azevedo C.M., Salgado C.G., da Silva M.B., Queiroz-Telles F., Marques S.G., Santos D.W., de Andrade T.S., Takagi E.H., *et al.* Molecular epidemiology of agents of human chromoblastomycosis in Brazil with the description of two novel species. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2016;10:e0005102. doi: 10.1371/journal.pntd.0005102. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

94. Vicente V.A., Najafzadeh M.J., Sun J., Gomes R.R., Robl D., Marques S.G., Azevedo C.M.P.S., De Hoog G.S. Environmental siblings of black agents of human chromoblastomycosis. *Fungal Divers.* 2013;65:47–63. doi: 10.1007/s13225-013-0246-5. [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

95. Sousa Mda G., Reid D.M., Schweighoffer E., Tybulewicz V., Ruland J., Langhorne J., Yamasaki S., Taylor P.R., Almeida S.R., Brown G.D. Restoration of pattern recognition receptor costimulation to treat chromoblastomycosis, a chronic fungal infection of the skin. *Cell Host Microbe.* 2011;9:436–443. doi: 10.1016/j.chom.2011.04.005. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

96. Siqueira I.M., Castro R.J.A., Leonhardt L.C.M., Jeronimo M.S., Soares A.C., Raiol T., Nishibe C., Almeida N., Tavares A.H., Hoffmann C., *et al.* Modulation of the immune response by *Fonsecaea pedrosoi* morphotypes in the course of experimental chromoblastomycosis and their role on inflammatory response chronicity. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2017;11:e0005461. doi: 10.1371/journal.pntd.0005461. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

97. Dhakal S., Meyling N.V., Williams A.R., Mueller-Harvey I., Fryganas C., Kapel C.M., Fredensborg B.L. Efficacy of condensed tannins against larval *Hymenolepis diminuta* (Cestoda) *in vitro* and in the intermediate host *Tenebrio molitor* (Coleoptera)

*in vivo*. *Vet. Parasitol.* 2015;207:49–55. doi: 10.1016/j.vetpar.2014.11.006. [[PubMed](#)]  
[[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

98. Morey A.T., de Souza F.C., Santos J.P., Pereira C.A., Cardoso J.D., de Almeida R.S., Costa M.A., de Mello J.C., Nakamura C.V. Pinge-Filho, P.; *et al.* Antifungal activity of condensed tannins from *Stryphnodendron adstringens*: effect on *Candida tropicalis* growth and adhesion properties. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2016;17:365–375. doi: 10.2174/1389201017666151223123712. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

## 6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Em suma, foi produzido anticorpos IgY específicos contra um peptídeo derivado da permease de ferro Ftr1 de *C. albicans*. Esse anticorpo, além de apresentar atividade candidacida foi capaz de aumentar a sobrevivência de larvas de *G. mellonella* infectadas com uma concentração letal de *C. albicans*. Esses fatos indicam que provavelmente a atividade da IgY anti-Ftr1 está relacionada com o bloqueio da captação de ferro pela interferência na via redutora. Através da semelhança do epítipo alvo, supostamente a IgY anti-Ftr1 pode reagir com a permease de ferro Ftr2 de *C. albicans* e também apresentar atividade antifúngica contra outras espécies de fungos.

Os modelos alternativos à experimentação animal estão cada vez mais sendo contemplados na pesquisa científica. Foi utilizado nesse projeto três modelos inovadores: produzimos anticorpos através da imunização de galinhas poedeiras em vez de mamíferos, utilizamos como hospedeiro nos testes *in vivo* larvas de mariposa e também foi realizada uma revisão bibliográfica a respeito do uso de larvas de um besouro, *T. molitor*, como hospedeiro no estudo de fungos patogênicos. No artigo de revisão foi concluído que o inseto possui um sistema imunológico inato constituído de respostas humorais e celulares, que assim como o dos humanos, é capaz de reconhecer e atuar contra fungos de importância médica. Além disso, *T. molitor* representa um modelo de hospedeiro que pode ser utilizado no estudo da virulência fúngica, dos efeitos das micotoxinas, das respostas imunológicas do hospedeiro à infecção fúngica e da ação de compostos antifúngicos.

Embora este estudo tenha alcançado seus objetivos na produção e caracterização biológica de anticorpos contra a Ftr1 de *C. albicans* e na pesquisa a respeito do uso de *T. molitor* como modelo alternativo no estudo de infecções fúngicas, os resultados apresentados nesta tese abrem caminhos para pesquisas futuras: (i) a busca na literatura revelou que outras proteínas importantes na captação de ferro podem ser utilizadas em testes futuros como alvo de novas terapias antifúngicas. São elas o receptor de hemoglobina Pga7 e a redutase férrica Cfl1; (ii) como há uma limitação na quantidade de trabalhos que utilizam *T. molitor* como hospedeiro invertebrado, necessitam-se padronizar os testes com mais espécies de fungos de importância médica.

## REFERÊNCIAS

- ACOSTA-ZALDÍVAR, M. *et al.* Human lactoferrin triggers a mitochondrial- and caspase-dependent regulated cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. **Apoptosis**, v. 21, n. 2, p. 163–173, fev. 2016.
- ADÁMKOVÁ, A. *et al.* Nutritional potential of selected insect species reared on the island of Sumatra. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 14, n. 5, p. 521, 12 maio 2017.
- AGGOR, F. E. Y. *et al.* Oral epithelial IL-22/STAT3 signaling licenses IL-17-mediated immunity to oral mucosal candidiasis. **Science Immunology**, v. 5, n. 48, 5 jun. 2020.
- AISEN, P.; LEIBMAN, A.; ZWEIER, J. Stoichiometric and site characteristics of the binding of iron to human transferrin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 253, n. 6, p. 1930–1937, 25 mar. 1978.
- AJDIDI, A. *et al.* Assessment of the *in vitro* and *in vivo* activity of atorvastatin against *Candida albicans*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 68, n. 10, p. 1497-1506, out. 2019.
- AKPAN, A.; MORGAN, R. Oral candidiasis. **Postgraduate Medical Journal**, v. 78 n. 922, p. 455-459, ago. 2002.
- ALBAR, A. *et al.* Structural heterogeneity and multifunctionality of lactoferrin. **Current Protein & Peptide Science**, v. 15, n. 8, p. 778–797, 27 set. 2014.
- ALMEIDA, C. M. C. *et al.* Development of snake antivenom antibodies in chickens and their purification from yolk. **Veterinary Record**, v. 143, n. 21, p. 579-584, 21 nov 1998.
- ALMEIDA, R. S. *et al.* The hyphal-associated adhesin and invasin Als3 of *Candida albicans* mediates iron acquisition from host ferritin. **PLoS Pathogens**, v. 4, n. 11, p. e1000217, nov. 2008.
- ALMEIDA, R. S.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* iron acquisition within the host. **FEMS Yeast Research**, v. 9, n. 7, p. 1000–1012, out. 2009.
- AMES, L. *et al.* *Galleria mellonella* as a host model to study *Candida glabrata* virulence and antifungal efficacy. **Virulence**, v. 8, n. 8, p. 1909-1917, 28 jun. 2017.
- AMORIM, E. A. D. F. *et al.* Antimicrobial potential of *Streptomyces ansochromogenes* (PB3) isolated from a plant native to the amazon against *Pseudomonas aeruginosa*. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 9 out. 2020.
- AMRO, W. A.; AL-QAISI, W.; AL-RAZEM, F. Production and purification of IgY antibodies from chicken egg yolk. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 99-103, jun. 2018.
- ANDERSON, G. J.; VULPE, C. D. Mammalian iron transport. **Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS**, v. 66, n. 20, p. 3241–3261, out. 2009.

- ANDREA, A.; KROGFELT, K. A.; JENSSEN, H. Methods and challenges of using the greater wax moth (*Galleria mellonella*) as a model organism in antimicrobial compound discovery. **Microorganisms**, v. 7, n. 3, p. 85, 2019.
- ANDREWS, S. C.; ROBINSON, A. K.; RODRÍGUEZ-QUIÑONES, F. Bacterial iron homeostasis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, n. 2–3, p. 215–237, jun. 2003.
- ARMITAGE, A. E. *et al.* Hepcidin regulation by innate immune and infectious stimuli. **Blood**, v. 118, n. 15, p. 4129–4139, 13 out. 2011.
- AROSIO, P.; ADELMAN, T.; DRYSDALE, J. On ferritin heterogeneity. Further evidence for heteropolymers **The Journal of Biological Chemistry**, v. 253, n. 12, p. 4451–4458, 25 jun. 1978.
- BALLS, M. The principles of humane experimental technique: timeless insights and unheeded warnings. **ALTEX-Alternatives to Animal Experimentation**, v. 27, n. 2, p. 144–148, 1 maio 2010.
- BALI, P. K.; AISEN, P. Receptor-induced switch in site-site cooperativity during iron release by transferrin. **Biochemistry**, v. 31, n. 16, p. 3963–3967, 28 abr. 1992.
- BANDARA, H. M. H. N.; PANDUWAWALA, C. P.; SAMARANAYAKE, L. P. Biodiversity of the human oral mycobiome in health and disease. **Oral Diseases**, v. 25, n. 2, p. 363–371, mar. 2019.
- BEINERT, H.; HOLM, R. H.; MÜNCK, E. Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures. **Science**, v. 277, n. 5326, p. 653–659, 1 ago. 1997.
- BEINERT, H.; KENNEDY, M. C. Aconitase, a two-faced protein: enzyme and iron regulatory factor. **The FASEB Journal**, v. 7, n. 15, p. 1442–1449, dez. 1993.
- BLANKENSHIP, J. R.; MITCHELL, A. P. *Candida albicans* adds more weight to iron regulation. **Cell Host and Microbe**, v. 10, n. 2, p. 93–94, 18 ago. 2011.
- BLATZER, M.; BINDER, U.; HAAS, H. The metalloreductase FreB is involved in adaptation of *Aspergillus fumigatus* to iron starvation. **Fungal Genetics and Biology**, v. 48, n. 11, p. 1027–1033, nov. 2011.
- BOMBASSARO, A. *et al.* Genomics and virulence of *Fonsecaea pugnacius*, agent of disseminated chromoblastomycosis. **Frontiers in Genetics**, v. 11, p. 822, 4 ago. 2020.
- BONGOMIN, F. *et al.* Global and multi-national prevalence of fungal diseases-estimate precision. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 4, 18 out. 2017.
- BONHOMME, J.; D'ENFERT, C. *Candida albicans* biofilms: building a heterogeneous, drug-tolerant environment. **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, n. 4, p. 398–403, ago. 2013.
- BORREGAARD, N.; COWLAND, J. B. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin, a siderophore-binding eukaryotic protein. **BioMetals**, v. 19, n. 2, p. 211–215, abr. 2006.

BOSCH, G. *et al.* Aflatoxin B1 tolerance and accumulation in black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) and yellow mealworms (*Tenebrio molitor*). **Toxins**, v. 9, n. 6, p. 185, 2 jun. 2017.

BRASIL. Decreto-lei nº 24.645, de 10 de julho de 1934. Estabelece medidas de proteção aos animais. **Diário Oficial da União**, Brasília, D.F., Seção 1, pt. 1. 10 jul. 1934.

BRASIL. Lei nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998. Dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, D.F., 12 fev. 1998. Seção 1, pt. 1, 12 fev. 1998.

BRAUN, B. R. *et al.* Identification and characterization of TUP1-regulated genes in *Candida albicans*. **Genetics**, v. 156, n. 1, p. 31–44, set. 2000.

BRAUNER, A. *et al.* Psoriasin, a novel anti-*Candida albicans* adhesin. **Journal of Molecular Medicine**, v. 96, n. 6, p. 537–545, jun. 2018.

BRENNAN, M. *et al.* Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 153-157, out. 2002.

BROPHY, M. B.; NOLAN, E. M. Manganese and microbial pathogenesis: sequestration by the mammalian immune system and utilization by microorganisms. **ACS Chemical Biology**, v. 10, n. 3, p. 641–651, 20 mar. 2015.

BROWNE, N.; HEELAN, M.; KAVANAGH, K. An analysis of the structural and functional similarities of insect hemocytes and mammalian phagocytes. **Virulence**, v. 4, n. 7, p. 597-603, 6 ago. 2013.

BULLEN, J. J.; ROGERS, H. J.; GRIFFITHS, E. Role of iron in bacterial infection. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, p. 1-35, 1978.

BYRD, T. F.; HORWITZ, M. A. Regulation of transferrin receptor expression and ferritin content in human mononuclear phagocytes: Coordinate upregulation by iron transferrin and downregulation by interferon gamma. **Journal of Clinical Investigation**, v. 91, n. 3, p. 969–976, mar. 1993.

CANELA, H. M. S. *et al.* Prevalence, virulence factors and antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from bloodstream infections in a tertiary care hospital in Brazil. **Mycoses**, v. 61, n. 1, p. 11–21, jan. 2018.

CARLANDER, D. *et al.* Chicken antibodies: a clinical chemistry perspective. **Upsala Journal of Medical Sciences**, v. 104, n. 3, p. 179-89, 1999.

CARLANDER, D. *et al.* Peroral immunotherapy with yolk antibodies for the prevention and treatment of enteric infections. **Immunologic Research**, v. 21, n. 1, p. 1-6, 2000.

CARVALHO, C. A. M. *et al.* Bovine lactoferrin activity against Chikungunya and Zika viruses. **Journal of General Virology**, v. 98, n. 7, p. 1749–1754, 1 jul. 2017.

- CAZA, M; KRONSTAD, J. W. Shared and distinct mechanisms of iron acquisition by bacterial and fungal pathogens of humans. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 3, n. 80, p. 1-23, 19 nov. 2013.
- CHACANA, P. A. *et al.* Tecnología IgY o aplicaciones de los anticuerpos de yema de huevo de gallina. **Revista de Medicina Veterinaria**, v. 85, n. 5, p. 179-89, 2004.
- CHAKRABORTY, S. *et al.* The multifaceted roles of neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) in inflammation and cancer. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, v. 1826, n. 1, p. 129–169, 2012.
- CHAVEZ-CORTEZ, E. *et al.* Production and evaluation of an avian IgY immunotoxin against CD133+ for treatment of carcinogenic stem cells in malignant glioma: IgY immunotoxin for the treatment of glioblastoma. **Journal of Oncology**, v. 2019, 2 jun. 2019.
- CHEN, C. *et al.* An iron homeostasis regulatory circuit with reciprocal roles in *Candida albicans* commensalism and pathogenesis. **Cell Host and Microbe**, v. 10, n. 2, p. 118–135, 18 ago. 2011.
- CHEN, C.; NOBLE, S. M. Post-transcriptional regulation of the Sef1 transcription factor controls the virulence of *Candida albicans* in its mammalian host. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 11, p.e1002956, 1 nov. 2012.
- CHENG, X. *et al.* Novel insight into the expression and function of the multicopper oxidases in *Candida albicans*. **Microbiology (United Kingdom)**, v. 159, n. 6, p. 1044–1055, jun. 2013.
- CHEN, Y. Y. *et al.* Dynamic transcript profiling of *Candida albicans* infection in zebrafish: a pathogen-host interaction study. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, 3 set. 2013.
- CLEARY, I. A. *et al.* Examination of the pathogenic potential of *Candida albicans* filamentous cells in an animal model of haematogenously disseminated candidiasis. **FEMS Yeast Research**, v. 16, n. 2, 1 mar. 2016.
- COLASSO, A. H. M. *et al.* The latex of *Euphorbia tirucalli* inhibits staphyloxanthin production and protects *Tenebrio molitor* larvae against *Staphylococcus aureus* infection. **Natural Product Research**, v. 34, n. 24, p. 3536-3539, dez. 2020.
- COLEMAN, M. *et al.* Using egg antibodies to treat diseases. **Egg Nutrition and Biotechnology**, p. 351-370, 1999.
- COLOMBO, A. L.; DE ALMEIDA JÚNIOR, J. N.; GUINEA, J. Emerging multidrug-resistant *Candida species*. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 30, n. 6, p. 528-538, dez. 2017.
- CORDEIRO, B. M. P. C. *et al.* Anticryptococcal activity of hexane extract from *Spondias tuberosa* Arruda and associated cellular events. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 30, n. 2, p. 100965, jun. 2020.
- COTTON R. T. **Pests of Stored Grain and Grain Products**. 3. ed. Minneapolis, MN, USA: Burgess Publishing Company, 1956. p. 318.

CRICHTON, R. R.; CHARLOTEAUX-WAUTERS, M. Iron transport and storage. **European Journal of Biochemistry**, v. 164, n. 3, p. 485–506, 4 maio 1987.

CRUZ, L. I. B. *et al.* Anti-*Candida albicans* activity of thiazolylhydrazone derivatives in invertebrate and murine models. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 4, p. 134, 12 dez. 2018.

CUTULI, M. A. *et al.* *Galleria mellonella* as a consolidated *in vivo* model hosts: new developments in antibacterial strategies and novel drug testing. **Virulence**, v. 10, n. 1, p. 527-541, 29 maio 2019.

D' ALESSANDRO, A. *et al.* Red blood cell proteomics update: Is there more to discover? **Blood Transfusion**, v. 15, n. 2, p. 182–187, mar. 2017.

DA GLÓRIA SOUSA, M. *et al.* Restoration of pattern recognition receptor costimulation to treat chromoblastomycosis, a chronic fungal infection of the skin. **Cell Host & Microbe**, v. 9, n. 5, p. 436-443, 11 maio 2011.

DA SILVA, M. C. *et al.* Production and application of anti-nucleoprotein IgY antibodies for influenza A virus detection in swine. **Journal of Immunological Methods**, v. 461, p. 100-105, out. 2018.

DA SILVA, R. B. *et al.* Candidemia in a public hospital in Northeastern Brazil: Epidemiological features and risk factors in critically ill patients. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 36, n. 4, p. 181–185, 1 out. 2019.

DAVEY, M. E.; O'TOOLE, G. A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 4, p. 847–867, dez. 2000.

DE ALBUQUERQUE MARANHÃO, F. C. *et al.* Mycoses in northeastern Brazil: epidemiology and prevalence of fungal species in 8 years of retrospective analysis in Alagoas. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 969-978, 28 maio 2019.

DE ANDRADE, F. G. *et al.* The production and characterization of anti-botherpic and anti-crotalic IgY antibodies in laying hens: A long term experiment. **Toxicon**, v. 66, p. 18-24, maio 2013.

DE CASTRO SPADARI *et al.* Alginate nanoparticles as non-toxic delivery system for miltefosine in the treatment of candidiasis and cryptococcosis. **International Journal of Nanomedicine**, v. 14, p. 5187-5199, 12 jul. 2019a.

DE CASTRO SPADARI *et al.* Efficacy of voriconazole *in vitro* and in invertebrate model of cryptococcosis. **Archives of Microbiology**, p. 1-12, 12 dez. 2019b.

DE LACORTE, J. S. *et al.* Evaluation of the efficacy of antifungal drugs against *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii* in a *Galleria mellonella* model. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 48, n. 3, p. 292-297, set. 2016.

DE LUCA, N. G.; WOOD, P. M. Iron uptake by fungi: Contrasted mechanisms with internal or external reduction. **Advances in Microbial Physiology**, v. 43, p. 39–74, 2000.

- DE MEDEIROS, M. A. P. *et al.* Epidemiology and prognostic factors of nosocomial candidemia in Northeast Brazil: A six-year retrospective study. **PLoS ONE**, v. 14, n. 8, 22 ago. 2019.
- DESALERMOS, A.; FUCHS, B. B.; MYLONAKIS, E. Selecting an invertebrate model host for the study of fungal pathogenesis. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 2, p. e1002451, fev. 2012.
- DE SÁ, N. P. *et al.* Thiazole derivatives act on virulence factors of *Cryptococcus* spp. **Medical Mycology**, v. 57, n. 1, p. 84-91, jan. 2019.
- DE SOUZA, P. C. *et al.* An invertebrate host to study fungal infections, mycotoxins and antifungal drugs: *Tenebrio molitor*. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 4, p. 125, 12 nov. 2018.
- DE SOUZA, P. C. *et al.* *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) as an alternative host to study fungal infections. **Journal of Microbiological Methods**, v. 118, p. 182–186, 8 out. 2015.
- DHINAUT, J.; CHOGNE, M.; MORET, Y. Trans-generational immune priming in the mealworm beetle protects eggs through pathogen-dependent mechanisms imposing no immediate fitness cost for the offspring. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 79, p. 105-112, fev. 2018.
- DIAS DA SILVA, W.; TAMBOURGI, D. V. IgY: A promising antibody for use in immunodiagnostic and in immunotherapy. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 135, n. 3–4, p. 173–180, 15 jun. 2010.
- DORLING, J.; MORAES, C.; ROLFF, J. Recognition, survival and persistence of *Staphylococcus aureus* in the model host *Tenebrio molitor*. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 48, n. 2, p. 284–290, fev. 2015.
- DRAKESMITH, H.; PRENTICE, A. M. Hepcidin and the Iron-Infection Axis. **Science**, v. 338, n. 6108, p. 768-772, 9 nov. 2012.
- DUBOVSKII, I. M. *et al.* Generation of reactive oxygen species and activity of antioxidants in hemolymph of the moth larvae *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Piralidae) at development of the process of encapsulation. **Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology**, v. 46, n. 1, p. 35-43, 6 abr. 2010.
- EASTMAN, A. J. *et al.* Cryptococcal heat shock protein 70 homolog Ssa1 contributes to pulmonary expansion of *Cryptococcus neoformans* during the afferent phase of the immune response by promoting macrophage M2 polarization. **The Journal of Immunology**, v. 194, n. 12, p. 5999-6010, 15 jun. 2015.
- ECK, R. *et al.* A multicopper oxidase gene from *Candida albicans*: Cloning, characterization and disruption. **Microbiology**, v. 145, n. 9, p. 2415–2422, set. 1999.
- ELLEDGE, S. J.; ZHOU, Z.; ALLEN, J. B. Ribonucleotide reductase: regulation, regulation, regulation. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 17, n. 3, p. 119–123, mar. 1992.

ELLIS, J. D.; GRAHAM, J. R.; MORTENSEN, A. Standard methods for wax moth research. **Journal of Apicultural Research**, v. 52, n. 1, p. 1-17, 2013.

EVANS, D. M.; FRAZER, I. H.; MARTIN, N. G. Genetic and environmental causes of variation in basal levels of blood cells. **Twin Research**, v. 2, n. 4, p. 250–257, dez. 1999.

EVANS, R. W.; WILLIAMS, J. Studies of the binding of different iron donors to human serum transferrin and isolation of iron-binding fragments from the N-and C-terminal regions of the protein. **Biochemical Journal**, v. 173, n. 2, p. 543-552, 25 nov. 1978.

FAGUNDES, D. J.; TAHA, M. O. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 19, n. 1, p. 59-65, jan. 2004.

FAN, J. *et al.* Preparation and physicochemical property of chicken yolk immunoglobulin (IgY) against porcine transmissible gastroenteritis virus (TGEV). **Frontiers of Agriculture in China**, v. 3, n. 4, p. 466, 15 jun. 2009.

FETHERSTON, J. D. *et al.* The Yersiniabactin transport system is critical for the pathogenesis of bubonic and pneumonic plague. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 5, p. 2045–2052, maio 2010.

FINBERG, K. E. Regulation of systemic iron homeostasis. **Current Opinion in Hematology**, v. 20, n. 3, p. 208–214, maio 2013.

FISHER, M. C. *et al.* Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. **Science**, v. 360, n. 6390, p. 739-742, 18 maio 2018.

FLEMING, D.; WOOD, R. J. Plasma Transferrin receptor helps to predict iron deficiency in the anemia of chronic disease. **Nutrition Reviews**, v. 53, n. 6, p. 167–169, jun. 1995.

FORBES, J. R. *et al.* Divalent-metal transport by NRAMP proteins at surface of host pathogen interaction. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 397–403, 8 ago. 2001.

FORNARI, G. *et al.* A model for trans-kingdom pathogenicity in *Fonsecaea* agents of human chromoblastomycosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 2211, 9 out. 2018.

FOURIE, R. *et al.* Iron at the centre of *Candida albicans* interactions. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, n.185, p. 1–14, 5 jun. 2018.

FUCHS, B. B. *et al.* Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. **Virulence**, v. 1, n. 6, p. 475-482, 1 nov. 2010.

FUJIBAYASHI, T. *et al.* Effects of IgY against *Candida albicans* and *Candida* spp. adherence and biofilm formation. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 62, n. 5, p. 337-342, set. 2009.

FURLANETO, M. C. *et al.* How much do we know about hemolytic capability of pathogenic *Candida* species?. **Folia Microbiologica**, v. 63, n. 4, p. 405-412, 15 jan.

2018.

GALLO, D. (*in memoriam*), *et al.* Os insetos e o reino animal. In: GALLO, D. (*in memoriam*), *et al.* **Entomologia Agrícola**. Piracicaba, SP: FEALQ, 2002. p. 11-106.

GÁLVEZ, D.; CHAPUISAT, M. Immune priming and pathogen resistance in ant queens. **Ecology and Evolution**, v. 4, n. 10, p. 1761-1767, 11 abr. 2014.

GANZ, T. Hcpidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. **Blood American Society of Hematology**, v. 102, n. 3, p. 783-788, 1 ago. 2003.

GANZ, T.; NEMETH, E. Hcpidin and iron homeostasis. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1823, n. 9, p. 1434–1443, 26 jan. 2012.

GANZ, T.; NEMETH, E. Iron homeostasis in host defence and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 8, p. 500–510, 15 ago. 2015.

GASSMANN, M. *et al.* Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. **The FASEB Journal**, v. 4, n. 8, p. 2528-2532, 1 maio 1990.

GERWIEN, F. *et al.* Metals in fungal virulence. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 42, n. 1, p. fux050, 1 jan. 2018.

GHALY, A. E. *et al.* The yellow mealworm as a novel source of protein. **American Journal of Agricultural and Biological Sciences**, v. 4, n. 4, p. 319-331, 2009.

GIACOMOTTO, J.; SÉGALAT, L. High-throughput screening and small animal models, where are we?. **British Journal of Pharmacology**, v. 160, n. 2, p. 204-216, 26 abr. 2010.

GLAMPEDAKIS, E. *et al.* Efficacy of antifungal monotherapies and combinations against *Aspergillus calidoustus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 12, 26 nov. 2018.

GOBIN J.; HORWITZ M. A. Exochelins of *Mycobacterium tuberculosis* remove iron from human iron-binding proteins and donate iron to mycobactins in *the M. tuberculosis* cell wall. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 183, n. 4, p. 1527-1532, 1 abr. 1996.

GOMEZ, H. M. *et al.* The occurrence of immune priming can be species-specific in entomopathogens. **Microbial Pathogenesis**, v. 118, p. 361-364, maio 2018.

GRAU, T.; VILCINSKAS, A.; JOOP, G. Sustainable farming of the mealworm *Tenebrio molitor* for the production of food and feed. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 72, n. 9-10, p. 337-349, 26 set. 2017.

GRESSLER, M. *et al.* Phytotoxin production in *Aspergillus terreus* is regulated by independent environmental signals. **eLife**, v. 4, p. 1–29, 14 jul. 2015.

GUINEA, J. Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia.

**Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, p. 5-10, jun. 2014.

GUITARD, J. *et al.* Invasive infections due to *Candida norvegensis* and *Candida inconspicua*: Report of 12 cases and review of the literature. **Medical Mycology**, v. 51, n. 8, p. 795–799, nov. 2013.

GUO, Z. *et al.* Effect of fungal colonization of wheat grains with *Fusarium* spp. on food choice, weight gain and mortality of meal beetle larvae (*Tenebrio molitor*). **PLoS one**, v. 9, n. 6, p. e100112, 16 jun. 2014.

HAAS, H. Molecular genetics of fungal siderophore biosynthesis and uptake: The role of siderophores in iron uptake and storage. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 62, n. 4, p. 316–330, set. 2003.

HALEY, K. P.; SKAAR, E. P. A battle for iron: host sequestration and *Staphylococcus aureus* acquisition. **Microbes and Infection**, v. 14, n. 3, p. 217-227, mar. 2012.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals, lipid peroxidation, and cell damage. **The Lancet**, v. 324, n. 8411, p. 1095, 10 nov. 1984.

HAMMACOTT, J. E.; WILLIAMS, P. H.; CASHMORE, A. M. *Candida albicans* CFL1 encodes a functional ferric reductase activity that can rescue a *Saccharomyces cerevisiae* Fre1 mutant. **Microbiology**, v. 146, n. 4, p. 869–876, abr. 2000.

HAN, Y. The identification of surface interaction of apotransferrin with *Candida albicans*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 37, n. 10, p. 1301–1307, 2014.

HAN, Y. Utilization of ferroproteins by *Candida albicans* during candidastasis by apotransferrin. **Archives of Pharmacal Research**, v. 28, n. 8, p. 963-969, ago. 2005.

HARRISON, H.; ADAMS, P. C. Hemochromatosis. Common genes, uncommon illness? **Canadian Family Physician**, v. 48, n. 8, p. 1326-1333, ago. 2002.

HARRISON, P. M.; AROSIO, P. The ferritins: Molecular properties, iron storage function and cellular regulation. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1275, n. 3, p. 161–203, jul 1996.

HATTA, H. *et al.* Productivity and some properties of egg yolk antibody (IgY) against human rotavirus compared with rabbit IgG. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 57, n. 3, p. 450-454, 1993.

HENDRIKSEN, C. F. M. Replacement, reduction and refinement alternatives to animal use in vaccine potency measurement. **Expert Review of Vaccines**, v. 8, n. 3, p. 313-322, mar. 2009.

HEYMANN, P. *et al.* The siderophore iron transporter of *Candida albicans* (Sit1p/Arn1p) mediates uptake of ferrichrome-type siderophores and is required for epithelial invasion. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 9, p. 5246–5255, set. 2002.

HILL D.S. Pests: Class Insecta. In HILL D.S. **Pests of Stored Foodstuffs and Their Control**. New York, NY, USA: Boston, MA, USA: Dordrecht, The Netherlands:

London, UK; Moscow, Russia: Kluwer Academic Publishers, 2003. p. 135–315.

HOLZBERG, M.; ARTIS, W. M. Hydroxamate siderophore production by opportunistic and systemic fungal pathogens. **Infection and Immunity**, v. 40, n. 3, p. 1134–1139, jun. 1983.

HONG, K. S. *et al.* Preventive effect of anti-VacA egg yolk immunoglobulin (IgY) on *Helicobacter pylori*-infected mice. **Vaccine**, v. 36, n. 3, p. 371-380, 8 jan. 2018.

HOOD, M. I.; SKAAR, E. P. Nutritional immunity: Transition metals at the pathogen-host interface. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 8, p. 525-537, 16 jul. 2012.

HOYER, L. L.; PAYNE, T. L.; BELL, M.; MYERS, A. M.; SCHERER, S. *Candida albicans* ALS3 and insights into the nature of the ALS gene family. **Current Genetics**, v. 33, n. 6, p. 451-459, jun. 1998.

HUANG, S.; MILLAR, A. H. Succinate dehydrogenase: The complex roles of a simple enzyme. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 16, n. 3, p. 344-349, jun. 2013.

HU, C. J. *et al.* Characterization and functional analysis of the siderophore-iron transporter CaArn1p in *Candida albicans*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 34, p. 30598–30605, 23 ago. 2002.

IBRAHIM, E. M. *et al.* *In vitro* and *in vivo* effectiveness of egg yolk antibody against *Candida albicans* (anti-CA IgY). **Vaccine**, v. 26, n. 17, p. 2073-2080, 16 abr. 2008.

JACOBS, C. G. C *et al.* Endogenous egg immune defenses in the yellow mealworm beetle (*Tenebrio molitor*). **Developmental & Comparative Immunology**, v. 70, p. 1-8, 2017.

JARROS, I. C. *et al.* Microbiological and virulence aspects of *Rhodotorula mucilaginosa*. **EXCLI Journal**, v. 19, p. 687, 27 maio 2020.

JEEVES, R. E. *et al.* Ferric reductase genes involved in high-affinity iron uptake are differentially regulated in yeast and hyphae of *Candida albicans*. **Yeast (Chincherter, England)**, v. 28, n. 9, p. 629-644, set. 2011.

JEMEL, S. *et al.* *Galleria mellonella* for the evaluation of antifungal efficacy against medically important fungi, a narrative review. **Microorganisms**, v. 8, n. 3, p. 390, 11 mar. 2020.

JOHNSON, E. E.; WESSLING-RESNICK, M. Iron metabolism and the innate immune response to infection. **Microbes and Infection**, v. 14, n. 3, p. 207-216, mar. 2012.

JOLLÈS, J. *et al.* The N-terminal sequence of human lactotransferrin: Its close homology with the amino-terminal regions of other transferrins. **FEBS Letters**, v. 69, n. 1–2, p. 27–31, 15 out. 1976.

JOMOVA, K.; VALKO, M. Importance of iron chelation in free radical-induced oxidative stress and human disease. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, n. 31, p. 3460–3473, 2011.

KADOSH, D.; JOHNSON, A. D. Induction of the *Candida albicans* filamentous growth program by relief of transcriptional repression: a genome-wide analysis. **Molecular Biology of the Cell**, v. 16, n. 6, p. 2903-2912, jun. 2005.

KALIA, N.; SINGH, J.; KAUR, M.. Microbiota in vaginal health and pathogenesis of recurrent vulvovaginal infections: a critical review. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 19, n. 1, p. 1-19, 28 jan. 2020.

KAMIKAWA, Y. *et al.* Use of *Candida*-specific chicken egg yolk antibodies to inhibit the adhering of *Candida* to denture base materials: prevention of denture stomatitis. **Gerodontology**, v. 33, n. 3, p. 342-347, set. 2016.

KANAMORI, Y. *et al.* Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) transcriptionally activates hepcidin by inducing CCAAT enhancer-binding protein  $\delta$  (C/EBP $\delta$ ) expression in hepatocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 24, p. 10275–10287, 16 jun. 2017.

KAVANAGH, K.; SHEEHAN, G. The use of *Galleria mellonella* larvae to identify novel antimicrobial agents against fungal species of medical interest. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 3, p. 113, 19 set. 2018.

KAWABATA, H. Transferrin and transferrin receptors update. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 133, n. June 2018, p. 46–54, mar. 2019.

KIM, H-W. *et al.* Pre-treated mealworm larvae and silkworm pupae as a novel protein ingredient in emulsion sausages. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 38, p. 116-123, dez. 2016.

KLOEZEN, W. *et al.* Amphotericin B and terbinafine but not the azoles prolong survival in *Galleria mellonella* larvae infected with *Madurella mycetomatis*. **Medical Mycology**, v. 56, n. 4, p. 469-478, jun. 2018.

KNIGHT, S. A. B.; DANCIS, A. Reduction of 2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide inner salt (XTT) is dependent on CaFRE10 ferric reductase for *Candida albicans* grown in unbuffered media. **Microbiology**, v. 152, n. 8, p. 2301–2308, ago. 2006.

KNIGHT, S. A. B. *et al.* Iron acquisition from transferrin by *Candida albicans* depends on the reductive pathway. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 9, p. 5482–5492, set. 2005.

KNIGHT, S. A. B. *et al.* Reductive iron uptake by *Candida albicans*: role of copper, iron and the TUP1 regulator. **Microbiology**, v. 148, n. 1, p. 29-40, jan. 2002.

KONDORI, N. *et al.* *Candida* species as commensal gut colonizers: A study of 133 longitudinally followed Swedish infants. **Medical Mycology**, v. 58, n. 4, p. 485–492, jun. 2020.

KOSMAN, D. J. Molecular mechanisms of iron uptake in fungi. **Molecular Microbiology**, v. 47, n. 5, p. 1185–1197, mar. 2003.

KOVACS-NOLAN, J.; MINE, Y. Avian egg antibodies: basic and potential applications. **Avian and Poultry Biology Reviews**, v. 15, n. 1, p. 25-46, 2004.

KRONSTAD, J. W.; CADIEUX, B.; JUNG, W. H. Pathogenic yeasts deploy cell surface receptors to acquire iron in vertebrate hosts. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 8, p. 8–11, ago. 2013.

KRONVAL, G. *et al.* Phylogenetic aspects of staphylococcal protein A-reactive serum globulins in birds and mammals. **Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Section B Microbiology and Immunology**, v. 82, n. 1, p. 12-18, fev. 1974.

KÜHBACHER, A.; BURGER-KENTISCHER, A.; RUPP, S. Interaction of *Candida* species with the skin. **Microorganisms**, v. 5, n. 4, p. 32, 7 jul. 2017.

KUIPERS, M. E. *et al.* Design and fungicidal activity of mucoadhesive lactoferrin tablets for the treatment of oropharyngeal candidosis. **Drug Delivery: Journal of Delivery and Targeting of Therapeutic Agents**, v. 9, n. 1, p. 31–38, jan-mar. 2002.

KULKARNI, R. D.; KELKAR, H. S.; DEAN, R. A. An eight-cysteine-containing CFEM domain unique to a group of fungal membrane proteins. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 28, n. 3, p. 118-121, mar. 2003.

KUMAR, S.; BANDYOPADHYAY, U. Free heme toxicity and its detoxification systems in human. **Toxicology Letters**, v. 157, n. 3, p. 175–188, 4 jul. 2005.

KUZNETS, G. *et al.* A relay network of extracellular heme-binding proteins drives *C. albicans* iron acquisition from hemoglobin. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 10, 2 out. 2014.

KWADHA, C. A. *et al.* The biology and control of the greater wax moth, *Galleria mellonella*. **Insects**, v. 8, n. 2, p. 61, jun. 2017.

LAN, C. Y. *et al.* Regulatory networks affected by iron availability in *Candida albicans*. **Molecular Microbiology**, v. 53, n. 5, p. 1451–1469, set. 2004.

LARSSON, A.; CARLANDER, D.; WILHELMSSON, M. Antibody response in laying hens with small amounts of antigen. **Food and Agricultural Immunology**, v. 10, n. 1, p. 29-36, 1998.

LARSSON, A. *et al.* Chicken antibodies: taking advantage of evolution—a review. **Poultry Science**, v. 72, n. 10, p. 1807-1812, 1 out. 1993.

LARSSON, A.; SJÖQUIST, J. Chicken antibodies: a tool to avoid false positive results by rheumatoid factor in latex fixation tests. **Journal of Immunological Methods**, v. 108, n. 1-2, p. 205-208, 23 abr. 1988.

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, out. 2002.

LEE, K. *et al.* Acid stability of anti-*Helicobacter pylori* IgY in aqueous polyol Solution. **BMB Reports**, v. 35, n. 5, p. 488-493, 2002.

LEE, P. *et al.* Regulation of hepcidin transcription by interleukin-1 and interleukin-6. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 102, n. 6, p. 1906-1910, 8 fev. 2005.

- LEE, W. *et al.* Insights into the chicken IgY with emphasis on the generation and applications of chicken recombinant monoclonal antibodies. **Journal of Immunological Methods**, v. 447, p. 71-85, ago. 2017.
- LEIVA, C. L. *et al.* IgY-technology (egg yolk antibodies) in human medicine: A review of patents and clinical trials. **International Immunopharmacology**, v. 81, p. 106269, abr. 2020.
- LESLIE, G. A.; CLEM, L. W. Phylogeny of immunoglobulin structure and function: III. Immunoglobulins of the chicken. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 130, n. 6, p. 1337-1352, 1 dez. 1969.
- LEU, S. *et al.* Generation and characterization of single chain variable fragment against alpha-enolase of *Candida albicans*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 8, p. 2903, 21 abr. 2020.
- LI, D. *et al.* Using *Galleria mellonella*–*Candida albicans* infection model to evaluate antifungal agents. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 36, n. 9, p. 1482–1487, 2013.
- LIM, W. *et al.* Addressing the most neglected diseases through an open research model: The discovery of fenarimols as novel drug candidates for eumycetoma. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 4, p. e0006437, 26 abr. 2018.
- LIN, L. *et al.* Transferrin iron starvation therapy for lethal bacterial and fungal infections. **Journal of Infectious Diseases**, v. 210, n. 2, p. 254–264, 15 jul. 2014.
- LIN, Y-W; WANG J. Structure and function of heme proteins in non-native states: A mini-review. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 129, p. 162-171, dez. 2013.
- LIONAKIS, M. S. *Drosophila* and *Galleria* insect model hosts: new tools for the study of fungal virulence, pharmacology and immunology. **Virulence**, v. 2, n. 6, p. 521-527, 1 nov. 2011.
- LIU, Y.; FILLER, S. G. *Candida albicans* Als3, a multifunctional adhesin and invasin. **Eukaryotic Cell**, v. 10, n. 2, p. 168-173, fev. 2011.
- LI, X. *et al.* Effects of egg and yolk weights on yolk antibody (IgY) production in laying chickens. **Poultry Science**, v. 77, n. 2, p. 266-270, fev. 1998.
- LOCKHART, S. R. *Candida auris* and multidrug resistance: Defining the new normal. **Fungal Genetics and Biology**, v. 131, p. 103243, 20 jun. 2019.
- LUDWICZEK, S. *et al.* Cytokine-mediated regulation of iron transport in human monocytic cells. **Blood**, v. 101, n. 10, p. 4148–4154, 15 maio 2003.
- MACEDO, D. *et al.* *In vitro* and *in vivo* evaluation of voriconazole-containing antifungal combinations against *Mucorales* using a *Galleria mellonella* model of mucormycosis. **Journal of Fungi**, v. 5, n. 1, p. 5, 8 jan. 2019.
- MARCHALONIS, J. L. Immunity in evolution. **Harvard University Press.**, 1977.

MARENGO-ROWE, A. J. Structure-function relations of human hemoglobins. **Baylor University Medical Center Proceedings**, v. 19, n. 3, p. 239–245, jul. 2006.

MARINÉ, M. *et al.* The development of animal infection models and antifungal efficacy assays against clinical isolates of *Trichosporon asahii*, *T. asteroides* and *T. inkin*. **Virulence**, v. 6, n. 5, p. 476-486, 29 maio 2015.

MARTIN, J. E.; IMLAY, J. A. The alternative aerobic ribonucleotide reductase of *Escherichia coli*, NrdEF, is a manganese-dependent enzyme that enables cell replication during periods of iron starvation. **Molecular Microbiology**, v. 80, n. 2, p. 319-334, 21 fev. 2011.

MARTINSON, T. J.; FLASPOHLER, D. J. Winter bird feeding and localized predation on simulated bark-dwelling arthropods. **Wildlife Society Bulletin**, v. 31, n. 2, p. 510-516, 2003.

MATSUNO, T.; MORI, M.; AWAI, M. Distribution of ferritin and hemosiderin in the liver, spleen and bone marrow of normal, phlebotomized and iron overloaded rats. **Acta Medica Okayama**. v. 39, n. 5, p. 347-360, out. 1985.

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, 24 jun. 2015.

MAURER, E. *et al.* *Galleria mellonella* as a model system to study virulence potential of mucormycetes and evaluation of antifungal treatment. **Medical Mycology**, v. 57, n. 3, p. 351-362, abr. 2019.

MCCORD, J. M. Effects of positive iron status at a cellular level. **Nutrition Reviews**, v. 54, n. 3, p. 85–88, 27 abr. 2009.

MENDEL, G. A. Iron metabolism and etiology of iron-storage diseases: an interpretive formulation. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 189, n. 1, p. 45–53, 6 jul. 1964.

MERKX-JACQUES, A. *et al.* Evaluating the pathogenic potential of environmental *Escherichia coli* by using the *Caenorhabditis elegans* infection model. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 7, p. 2435–45, 1 abr. 2013.

MERSEGUEL, K. *et al.* Genetic diversity of medically important and emerging *Candida* species causing invasive infection. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, p. 57, 13 fev. 2015.

MESA-ARANGO, A. C. *et al.* 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. **Medical Mycology**, v. 51, n. 5, p. 461-472, jul. 2013.

MISHRA, P. K.; BAUM, M.; CARBON, J. DNA methylation regulates phenotype-dependent transcriptional activity in *Candida albicans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 29, p. 11965–11970, 19 jul. 2011.

MONTEIRO, P. T. *et al.* The PathoYeast database: An information system for the analysis of gene and genomic transcription regulation in pathogenic yeasts. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. 1, p. 597–603, 4 jan. 2017.

MONY, T. J. *et al.* Anti-urease immunoglobulin (IgY) from egg yolk prevents *Helicobacter pylori* infection in a mouse model. **Food and Agricultural Immunology**, v. 30, n. 1, p. 662-676, 21 maio 2019.

MORALES-RAMOS, J. A. *et al.* Morphometric analysis of instar variation in *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 108, n. 2, p. 146-159, 5 fev. 2015.

MORET, Y.; SIVA-JOTHY, M. T. Adaptive innate immunity? Responsive-mode prophylaxis in the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 270, n. 1532, p. 2475-2480, 7 dez. 2003.

MOREY, A. *et al.* Antifungal activity of condensed tannins from *Stryphnodendron adstringens*: effect on *Candida tropicalis* growth and adhesion properties. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 17, n. 4, p. 365-375, 1 mar. 2016.

MORGAN, E. H. Studies on the mechanism of iron release from transferrin. **BBA - Protein Structure**, v. 580, n. 2, p. 312–326, 24 out. 1979.

MORAN, G.; COLEMAN, D.; SULLIVAN, D. An introduction to the medically important *Candida* species. In: CALDERONE R. A.; CLANCY, C. J. **Candida and candidiasis**. 2. ed. Washington: American Society for Microbiology Press, 2001. p. 11-26.

MORIO, F. *et al.* Precise genome editing using a CRISPR-Cas9 method highlights the role of CoERG11 amino acid substitutions in azole resistance in *Candida orthopsilosis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 74, n. 8, p. 2230-2238, ago. 2019.

MOSTEFAOUI, Y. *et al.* *Candida albicans* and *Streptococcus salivarius* modulate IL-6, IL-8, and TNF-alpha expression and secretion by engineered human oral mucosa cells. **Cellular Microbiology**, v. 6, n. 11, p. 1085–1096, 1 nov. 2004.

MWALE, P. F. *et al.* Expression, purification, and characterization of anti-Zika virus envelope protein: polyclonal and chicken-derived single chain variable fragment antibodies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 2, p. 492, 13 jan. 2020.

NAGLIK, J. R. *et al.* *Candida albicans* interactions with epithelial cells and mucosal immunity. **Microbes and infection/Institut Pasteur**, v. 13, n. 12–13, p. 963–76, nov. 2011.

NAIRZ, M.; WEISS, G. Iron in infection and immunity. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 75, p. 1008641, 24 maio 2020.

NAKASHIGE, T. G. *et al.* Human calprotectin is an iron-sequestering host-defense protein. **Nature Chemical Biology**, v. 11, n. 10, p. 765-771, out. 2015.

- NAM, S. *et al.* Discovery and characterization of pure RhIR antagonists against *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 63, n. 15, p. 8388-8407, 13 ago. 2020.
- NARAT, M. Production of antibodies in chickens. **Food Technology and Biotechnology**, v. 41, n. 3, p. 259-267, 2003.
- NASH, A. K. *et al.* The gut mycobiome of the human microbiome project healthy cohort. **Microbiome**, v. 5, n. 1, p. 153, 25 nov. 2017.
- NASSER, L. *et al.* Structural basis of haem-iron acquisition by fungal pathogens. **Nature Microbiology**, v. 1, n. 11, p. 16156, 12 set. 2016.
- NEMETH, E. *et al.* Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. **Science**, v. 306, n. 5704, p. 2090–2093, 17 dez. 2004.
- NG, W.-K. *et al.* Potential of mealworm (*Tenebrio molitor*) as an alternative protein source in practical diets for African catfish, *Clarias gariepinus*. **Aquaculture Research**, v. 32, p. 273-280, 28 mar. 2002.
- NIKAWA, H. *et al.* The fungicidal effect of human lactoferrin on *Candida albicans* and *Candida krusei*. **Archives of Oral Biology**, v. 38, n. 12, p. 1057–1063, dez. 1993.
- NOBLE, S. M. *Candida albicans* specializations for iron homeostasis: from commensalism to virulence. **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, n. 6, p. 708–715, dez. 2013.
- NYHUS, K. J.; WILBORN, A. T.; JACOBSON, E. S. Ferric iron reduction by *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 2, p. 434–438, fev. 1997.
- OPPERT, B. *et al.* Transcriptome profiling of the intoxication response of *Tenebrio molitor* larvae to *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa protoxin. **PloS One**, v. 7, n. 4, p. e34624, jan. 2012.
- OSMANOV, A.; WISE, A.; DENNING, D. W. *In vitro* and *in vivo* efficacy of miramistin against drug-resistant fungi. **Journal of Medical Microbiology**, v. 68, n. 7, p. 1047-1052, 1 jul. 2019.
- PENDRAK, M. L.; YAN, S. S.; ROBERTS, D. D. Sensing the host environment: recognition of hemoglobin by the pathogenic yeast *Candida albicans*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 426, n. 2, p. 148–156, 15 jun. 2004.
- PHILLIPS, T. W.; THRONE, J. E. Biorational approaches to managing stored-product insects. **Annual Review of Entomology**, v. 55, 8 set. 2010.
- PHILPOTT, C. C. Iron uptake in fungi: A system for every source. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1763, n. 7, p. 636–645, jul. 2006.
- PIETRANGELO, A. Physiology of iron transport and the hemochromatosis gene. **American Journal of Physiology. Gastrointest Liver Physiology**, v. 282, n. 3, p. G403-414, mar. 2002.

PIYANKARAGE, S. C. *et al.* Hemolymph amino acid analysis of individual *Drosophila* larvae. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 4, p. 1201-1207, 15 fev. 2008.

POLKE, M.; HUBE, B.; JACOBSEN, I. D. *Candida* survival strategies. **Advances in Applied Microbiology**, v. 91, p. 139-235, 24 fev. 2015.

POSEY, J. E.; GHERARDINI, F. C. Lack of a role for iron in the Lyme disease pathogen. **Science**, v. 288, n. 5471, p. 1651–1653, 2 jun. 2000.

POULAIN, D. *Candida albicans*, plasticity and pathogenesis. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 208–217, jun. 2015.

RAMANAN, N.; WANG, Y. A high-affinity iron permease essential for *Candida albicans* virulence. **Science**, v. 288, n. 5468, p. 1062–1064, 12 maio 2000.

REEF, S. E. *et al.* Nonperinatal nosocomial transmission of *Candida albicans* in a neonatal intensive care unit: Prospective study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 5, p. 1255–1259, maio 1998.

REISS, J. Toxicity of molds to the larvae of *Tenebrio molitor*. **Journal of Invertebrate Pathology**, 1973.

ROMO, J. A.; KUMAMOTO, C. A. On commensalism of *Candida*. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 1, p. 16, 17 jan. 2020.

ROSSONI, R. D. *et al.* Effects of surface pre-reacted glass-ionomer (S-PRG) eluate on *Candida* spp.: antifungal activity, anti-biofilm properties, and protective effects on *Galleria mellonella* against *C. albicans* infection. **Biofouling**, v. 35, n. 9, p. 997-1006, 11 nov. 2019a.

ROSSONI, R. D. *et al.* *Galleria mellonella* as an experimental model to study human oral pathogens. **Archives of Oral Biology**, v. 101, p. 13-22, maio 2019b.

ROUAULT, T. A. The indispensable role of mammalian iron sulfur proteins in function and regulation of multiple diverse metabolic pathways. **Biometals**, v. 32, n. 3, p. 343-353, 28 mar. 2019.

ROY, U.; KORNITZER, D. Heme-iron acquisition in fungi. **Current Opinion in Microbiology**, v. 52, p. 77-83, 2019.

RUSSELL, W. M. S.; BURCH, R. L. **The principles of humane experimental technique**. Methuen, 1959.

RYCKMAN, C. *et al.* Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion. **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 6, p. 3233–3242, 15 mar. 2003.

SÁ, N. P. *et al.* A phenylthiazole derivative demonstrates efficacy on treatment of the cryptococcosis & candidiasis in animal models. **Future Science OA**, v. 4, n. 6, p. FSO305, 25 abr. 2018.

SARDI, J. C. O. *et al.* *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm

formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Jornal of Medical Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 10-24, jan. 2013.

SCHADE, R. *et al.* Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 33, n. 2, p. 129-154, 2005.

SCHADE, R. *et al.* The production of avian (egg yolk) antibodies: IgY: the report and recommendations of ECVAM workshop 211, 2. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 24, n. 6, p. 925-934, 1 dez. 1996.

SCORZONI, L. *et al.* Antifungal efficacy during *Candida krusei* infection in non-conventional models correlates with the yeast *in vitro* susceptibility profile. **PLoS one**, v. 8, n. 3, p. e60047, 28 mar. 2013.

SEGAL, E.; FRENKEL, M. Experimental *in vivo* models of candidiasis. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 1, p. 21, fev. 2018.

SELALEDI, L.; MBAJIORGU, C. A.; MABELEBELE, M. The use of yellow mealworm (*T. molitor*) as alternative source of protein in poultry diets: a review. **Tropical Animal Health and Production**, v. 52, n. 1, p. 7-16, jan. 2020.

SENAPATHI, J. *et al.* Sulfonate modified Lactoferrin nanoparticles as drug carriers with dual activity against HIV-1. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 191, p. 110979, jul. 2020.

SHIMIZU, M.; FITZSIMMONS, R. C.; NAKAI, S. Anti-*E. coli* immunoglobulin Y isolated from egg yolk of immunized chickens as a potential food ingredient. **Journal of Food Science**, v. 53, n. 5, p. 1360-1368, set. 1988.

SILVA, A. P. R. *et al.* *Caenorhabditis elegans* and *Tenebrio molitor*-New tools to investigate *Malassezia* species. **Preprints**, 1 out. 2018a.

SILVA, L. N. *et al.* Virulence of *Candida haemulonii* complex in *Galleria mellonella* and efficacy of classical antifungal drugs: a comparative study with other clinically relevant non-*albicans* *Candida* species. **FEMS Yeast Research**, v. 18, n. 7, p. foy082, nov. 2018b.

SILVA, T. F. *et al.* Products derived from *Buchenavia tetraphylla* leaves have *in vitro* antioxidant activity and protect *Tenebrio molitor* larvae against *Escherichia coli*-induced injury. **Pharmaceuticals**, v. 13, n. 3, p. 46, 16 mar. 2020.

SINGER, P.; XAVIER, A. **Vida ética: os melhores ensaios do mais polêmico filósofo da atualidade**. Rio de Janeiro: Ediouro, 2002.

SINGH, R. P. *et al.* Cap2-HAP complex is a critical transcriptional regulator that has dual but contrasting roles in regulation of iron homeostasis in *Candida albicans*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 28, p. 25154–25170, 15 jul. 2011.

SINGKUM, P. *et al.* A powerful *in vivo* alternative model in scientific research: *Galleria mellonella*. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v. 66, n. 1, p. 31-55, 28 fev. 2019.

- SIQUEIRA, I. M. *et al.* Modulation of the immune response by *Fonsecaea pedrosoi* morphotypes in the course of experimental chromoblastomycosis and their role on inflammatory response chronicity. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 3, p. e0005461, 29 mar. 2017.
- SOBEL, J. D. Vulvovaginal candidosis. **Lancet**, v. 369, n. 9577, p. 1961–1971, 9 jun. 2007.
- SOMASUNDARAM, R.; CHORARIA, A.; ANTONYSAMY, M. An approach towards development of monoclonal IgY antibodies against SARS CoV-2 spike protein (S) using phage display method: A review. **International Immunopharmacology**, v. 85, p. 106654, ago. 2020.
- SPILLNER, E. *et al.* Avian IgY antibodies and their recombinant equivalents in research, diagnostics and therapy. **Biologicals**, v. 40, n. 5, p. 313-322, set. 2012.
- STANISZEWSKA, M. *et al.* New 1, 5 and 2, 5-disubstituted tetrazoles-dependent activity towards surface barrier of *Candida albicans*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 145, p. 124-139, 10 fev. 2018.
- STANISZEWSKA, M. Virulence Factors in *Candida* species. **Current Protein & Peptide Science**, v. 21, n. 3, p. 313–323, 2020.
- STRŮŽ, I.; TREBICHAŤSKÝ, I. Calprotectin-a pleiotropic molecule in acute and chronic inflammation. **Physiological Research**, v. 53, p. 245–253, 2004.
- SUDBERY, P. E. Growth of *Candida albicans* hyphae. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 10, p. 737–748, 16 ago. 2011.
- SUN, S. *et al.* Preparation and mass spectrometric study of egg yolk antibody (IgY) against rabies virus. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 15, n. 9, p. 708-712, 12 abr. 2001.
- TAKEUCHI, S. *et al.* Effects of oral moisturising gel containing egg yolk antibodies against *Candida albicans* in older people. **Gerodontology**, v. 33, n. 1, p. 128-134, mar. 2016.
- TAYLOR, A. I.; SUTTON, B. J.; CALVERT, R. A. Mutations in an avian IgY-Fc fragment reveal the locations of monocyte Fc receptor binding sites. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 34, n. 2, p. 97–101, fev. 2010.
- TAYLOR, M.; RAJA, A. **Oral Candidiasis**. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2020. Disponível em: <https://europepmc.org>. Acesso em: 25 jan. 2021.
- TETREAU, G. *et al.* Deciphering the molecular mechanisms of mother-to-egg immune protection in the mealworm beetle *Tenebrio molitor*. **PLoS Pathogens**, v. 16, n. 10, p. e1008935, 15 out. 2020.
- TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária**. 9. ed. Rio de Janeiro, Brasil: Elsevier, 2014. p. 1-568.
- TOKURA, A. *et al.* Factors functioning in nodule melanization of insects and their

mechanisms of accumulation in nodules. **Journal of insect Physiology**, v. 60, p. 40-49, jan. 2014.

TOLOSANO, E. *et al.* Heme scavenging and the other facets of hemopexin. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 12, n. 2, p. 305–320, fev. 2010.

TOMIOTTO-PELLISSIER, F. *et al.* *Galleria mellonella* hemocytes: A novel phagocytic assay for *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 131, p. 45-50, dez. 2016.

TOMITA, M. *et al.* Twenty-five years of research on bovine lactoferrin applications. **Biochimie**, v. 91, n. 1, p. 52–57, jan. 2009.

TORRES, M.; DE COCK, H.; CELIS RAMÍREZ, A. M. *In vitro* or *in vivo* models, the next frontier for unraveling interactions between *Malassezia* spp. and hosts. How much do we know?. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 3, p. 155, 28 ago. 2020.

TRAN, G., GNAEDINGER, C., MÉLIN C., 2019. **Mealworm (*Tenebrio molitor*)**. Feedipedia, um programa da INRAE, CIRAD, AFZ e FAO, 2019. Disponível em: <https://www.feedipedia.org/node/16401>. Acesso em: 10 de fev. 2021.

TRAVASSOS, L. H. *et al.* Heme and iron induce protein aggregation. **Autophagy**, p. 13, n. 3, p. 625-626. 4 mar 2017.

TREVIJANO-CONTADOR, N.; ZARAGOZA, O. Expanding the use of alternative models to investigate novel aspects of immunity to microbial pathogens. **Virulence**, v. 5, n. 4, p. 454-456, 9 abr. 2014.

TREVIÑO-RANGEL, R. de J. *et al.* *In vivo* evaluation of the antifungal activity of sertraline against *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 74, n. 3, p. 663-666, mar. 2019.

TSAI, C. J.; 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, 9 fev. 2016.

TSUI, C.; KONG, E. F.; JABRA-RIZK, M. A. Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. **Pathogens and Disease**, v. 74, n. 4, p. ftw018, jun. 2016.

URBANOWSKI, J. L.; PIPER, R. C. The iron transporter Fth1p forms a complex with the Fet5 iron oxidase and resides on the vacuolar membrane. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 53, p. 38061–38070, 31 dez. 1999.

URBAŃSKI, A.; ADAMSKI, Z.; ROSIŃSKI, G.. Developmental changes in haemocyte morphology in response to *Staphylococcus aureus* and latex beads in the beetle *Tenebrio molitor* L. **Micron**, v. 104, p. 8-20, jan. 2018.

VANCE, C. K.; MILLER, A. F. A simple proposal that can explain the inactivity of metal-substituted superoxide dismutases. **Journal of the American Chemical Society**, v. 120, n. 3, p. 461–467, 28 jan. 1998.

VAN DE WIJGERT, J. H. H. M *et al.* The vaginal microbiota: what have we learned

after a decade of molecular characterization?. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. e105998, 22 ago. 2014.

VERTYPOROKH, L.; WOJDA, I. Immune response of *Galleria mellonella* after injection with non-lethal and lethal dosages of *Candida albicans*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 170, p. 107327, fev. 2020.

VILLIS, P. *et al.* A Study of the disruptive effect of the acetate fraction of *Punica granatum* extract on *Cryptococcus* Biofilms. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 3533, 18 jan. 2021.

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.

VONK, A. G. *et al.* Endogenous interleukin (IL)-1alpha and IL-1beta are crucial for host defense against disseminated candidiasis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 193, n. 10, p. 1419-1426, 15 maio 2006.

VORLAND, L. H. Lactoferrin: A multifunctional glycoprotein **APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, v. 107, n. 11, p. 971-981, nov. 1999.

WADA, Y. Mass spectrometry of transferrin glycoforms to detect congenital disorders of glycosylation: Site-specific profiles and pitfalls. **Proteomics**, v. 16, n. 24, p. 3105–3110, dez. 2016.

WAKABAYASHI, H.; TAKASE, M.; TOMITA, M. Lactoferricin derived from milk protein lactoferrin. **Current Pharmaceutical Design**, v. 9, n. 16, p. 1277–1287, 2003.

WANG, J.; PANTOPOULOS, K. Regulation of cellular iron metabolism. **Biochemical Journal**, v. 434, n. 3, p. 365–381, 15 mar. 2011.

WANG, W. *et al.* Ferritin H is a novel marker of early erythroid precursors and macrophages. **Histopathology**, v. 62, n. 6, p. 931–940, 1 maio 2013.

WANG, X. Z. *et al.* *In vitro* inhibition of oral *Candida albicans* by chicken egg yolk antibody (IgY). **Mycopathologia**, v. 165, n. 6, p. 381, 14 mar. 2008.

WARD, D. M.; KAPLAN, J. Ferroportin-mediated iron transport: expression and regulation. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1823, n. 9, p. 1426-1333, set. 2012.

WARREN, L. O.; HUDDLESTON, P. Life history of the greater wax moth, *Galleria mellonella* L., in Arkansas. **Journal of the Kansas Entomological Society**, v. 35, n. 1, p. 212-216, jan. 1962.

WARR, G. W.; MAGOR, K. E; HIGGINS, D. A. IgY: clues to the origins of modern antibodies. **Immunology Today**, v. 16, n. 8, p. 392-398, ago. 1995.

WATANABE, T. *et al.* Characterization of a haemolytic factor from *Candida albicans*. **Microbiology (Reading, England)**, v. 145, n.3, p. 689–694, mar. 1999.

WELCH, K. D.; VAN EDEN, M. E.; AUST, S. D. Modification of ferritin during iron loading. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, n. 8, p. 999–1006, 15 out. 2001.

WEINBERG, E. D. Iron and susceptibility to infectious disease. **Science**, v. 184, n. 4140, p. 952-956, 31 maio 1974.

WEISSMAN, Z. *et al.* An endocytic mechanism for haemoglobin-iron acquisition in *Candida albicans*. **Molecular Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 201–217, 5 maio 2008.

WEISSMAN, Z.; KORNITZER, D. A family of *Candida* cell surface haem-binding proteins involved in haemin and haemoglobin-iron utilization. **Molecular Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 1209–1220, ago. 2004.

WEISSMAN, Z.; SHEMER, R.; KORNITZER, D. Deletion of the copper transporter CaCCC2 reveals two distinct pathways for iron acquisition in *Candida albicans*. **Molecular Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 1551–1560, jun. 2002.

WILSON, D. *et al.* Identifying infection-associated genes of *Candida albicans* in the postgenomic era. **FEMS Yeast Research**, v. 9, n. 5, p. 688-700, 6 jul. 2009.

WILSON-SANDERS, S. E. Invertebrate models for biomedical research, testing, and education. **ILAR Journal**, v. 52, n. 2, p. 126-152, 1 ago. 2011.

WU, G. *et al.* Priming *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae with heat-killed bacterial cells induced an enhanced immune protection against *Photobacterium luminescens* TT01 and the role of innate immunity in the process. **Journal of Economic Entomology**, v. 107, n. 2, p. 559-569, 1 abr. 2014.

XU, N. *et al.* Cellular iron homeostasis mediated by the Mrs4-Ccc1-Smf3 pathway is essential for mitochondrial function, morphogenesis and virulence in *Candida albicans*. **Biochimica et Biophysica. Acta**, v. 1843, n. 3, p. 629–639, mar. 2014a.

XU, N. *et al.* Novel role of the *Candida albicans* ferric reductase gene *CFL1* in iron acquisition, oxidative stress tolerance, morphogenesis and virulence. **Research in Microbiology**, v. 165, n. 3, p. 252–261, abr. 2014b.

XU, W. *et al.* Activation and alliance of regulatory pathways in *C. albicans* during mammalian infection. **PLoS Biology**, v. 13, n. 2, p. e1002076, 18 fev. 2015.

XU, Y. *et al.* Application of chicken egg yolk immunoglobulins in the control of terrestrial and aquatic animal diseases: a review. **Biotechnology advances**, v. 29, n. 6, p. 860-868, nov.-dez. 2011.

XU, Y. Y. *et al.* *In vitro* susceptibility of *Candida* species to lactoferrin. **Medical Mycology**, v. 37, n. 1, p. 35-41, fev. 1999.

YAMADA-OKABE, T. *et al.* Isolation of the mRNA-capping enzyme and ferric-reductase-related genes from *Candida albicans*. **Microbiology**, v. 142, n. 9, p. 2515–2523, set. 1996.

ZHANG, D. L. *et al.* Erythrocytic ferroportin reduces intracellular iron accumulation, hemolysis, and malaria risk. **Science**, v. 359, n. 6383, p. 1520–1523, 30 mar. 2018.

ZHANG, M. *et al.* Antifungal activity of ribavirin used alone or in combination with fluconazole against *Candida albicans* is mediated by reduced virulence. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 55, n. 1, p. 105804, jan. 2020.


ZHANG, W. The use of gene-specific IgY antibodies for drug target discovery. **Drug Discovery Today**, v. 8, n. 8, p. 364-371, 15 abr. 2003.

ZHANG, X. *et al.* IgY: a key isotype in antibody evolution. **Biological Reviews**, v. 92, n. 4, p. 2144–2156, nov. 2017.

ZIEGLER, L. *et al.* Functional characterization of the ferroxidase, permease high-affinity iron transport complex from *Candida albicans*. **Molecular Microbiology**, v. 81, n. 2, p. 473–485, jul. 2011.

## ANEXO

Permissão concedida pela Comissão de Ética no Uso de Animais para utilização experimental de aves da espécie *Gallus gallus domesticus* no presente projeto.



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 48/2018 Londrina, 27 de Abril de 2018.

Prezado (a) professor (a)

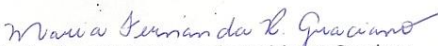
Certificamos que o projeto intitulado: “Produção e caracterização biológica de anticorpos IgY contra a permease de ferro FTR1 de *Candida albicans*” protocolo nº3205.2018.52 sob a responsabilidade de Ricardo Sérgio Couto de Almeida, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de ensino, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL) em **27/04/2018**.

O objetivo do é projeto produzir anticorpos IgY capazes de bloquear a captação de ferro pelo fungo *C. albicans*. Grau de invasividade=1

|                            |                                |
|----------------------------|--------------------------------|
| Vigência do Projeto        | 01/04/2018 a 31/03/2019        |
| Espécie/linhagem           | Ave / White Leghorns           |
| Nº de animais              | 2                              |
| Peso/Idade                 | 1,6 - 2,5 Kg                   |
| Sexo                       | Fêmeas                         |
| Origem                     | Fazenda Escola - UEL           |
| Amostras a serem coletadas | Ovos não embrionados e sangue. |

Cumpra orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários. Sem mais para o momento, subscrevo, cordialmente.

  
 Profa. Dra. Maria Fernanda Rodrigues Graciano  
 Coordenadora da CEUA/UEL

---

Ilmo.(a) Sr.(a)  
**Prof. (a) Dr (a). Ricardo Sérgio Couto de Almeida**  
 Responsável pelo projeto  
 Departamento de Microbiologia - CCB

C/C para a Chefia do Depto. de Microbiologia - CCB  
 C/C para a Direção do CCB

---

Campus Universitário: Rodovia Celso Garcia Cid (PR 445), km 380 - Fone (043) 3371-4000 PABX - Fax 3328-4440 - Caixa Postal 10.011 - CEP 86057-970 - Internet <http://www.uel.br>  
 LONDRINA - PARANÁ - BRASIL