



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

HUGO FELIX PERINI

**AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE LINHAGENS
DERIVADAS DE SWITCHING FENOTÍPICO DE *Candida
tropicalis* E LARVAS DE *Galleria mellonella***

Londrina
2017

HUGO FELIX PERINI

**AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE LINHAGENS
DERIVADAS DE *SWITCHING* FENOTÍPICO DE *Candida
tropicalis* E LARVAS DE *Galleria mellonella***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de mestre em Microbiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Cristina Furlaneto

Londrina
2017

HUGO FELIX PERINI

**AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE LINHAGENS DERIVADAS DE
SWITCHING FENOTÍPICO DE *Candida tropicalis* E LARVAS DE
*Galleria mellonella***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito final à obtenção do título de mestre em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Cristina
Furlaneto
Universidade Estadual de Londrina - UEL

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

Profa. Dra. Luciana Furlaneto-Maia
Universidade Tecnológica Federal do Paraná –
UTFPR

Londrina, 28 de Abril de 2017.

PERINI, Hugo Felix. **Avaliação da interação entre linhagens derivadas de *switching* fenotípico de *Candida tropicalis* e larvas de *Galleria mellonella***. 2017. 69f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

Dentre os fatores de virulência descritos para *Candida tropicalis*, *switching* fenotípico tem se destacado por gerar variabilidade fenotípica dentro de populações. *Galleria mellonella* se apresenta responsiva no estudo de virulência de variantes fenotípicas advindos de *switching* fenotípico, no entanto, pouco se conhece da relação parasito/hospedeiro desse lepdóptero com tais linhagens. O presente trabalho teve como objetivo analisar repostas celulares e humorais de *G. mellonella* à infecção com linhagens fenotípicas (Parental, anel, rugosa, revertente de anel e revertente de rugosa) de *C. tropicalis*, assim como observar a interação diferenciada da levedura com componentes do sistema imune da larva. Em relação à resposta humoral, todos os morfotipos analisados foram capazes de induzir melanização nas larvas de *G. mellonella*. Após 24 horas de infecção, todos os derivantes de *switching* apresentaram maior indução de melanização em relação ao parental. Além da melanização, houve estímulo após uma hora de infecção, da expressão do gene responsável pela síntese de Gallimicina em todos os morfotipos, com exceção do morfotipo Anel. Esse morfotipo apresentou a maior indução desse gene após 4 horas de infecção, mostrando que a resposta da larva é mais tardia para essa característica para esse morfotipo. A expressão de Gallerimicina, outro peptídeo antimicrobiano, se manteve baixa nos dois tempos analisados. Parental, Anel e Rugosa apresentaram diminuição na expressão desse peptídeo, enquanto os respectivos revertentes mantiveram a mesma taxa de expressão das larvas que receberam apenas inóculo com PBS. Além do componente humoral, o componente celular também mostrou respostas diferenciadas frente ao contato com os morfotipos analisados. O morfotipo Anel, mais virulento no modelo invertebrado, induziu maior diminuição no número de hemócitos e maior sobrevivência quando cultivado na presença dessas células, além disso, seu revertente, embora morfologicamente semelhante ao parental, mostrou semelhança nas características analisadas à morfologia mais estruturada, mostrando que embora ocorra o retorno à morfologia parental, morfologias revertentes podem manter fatores de resposta semelhante aos de morfologias mais estruturadas. Com isso o presente trabalho conclui que diferenças na virulência dos morfotipos advindos do evento de *switching* fenotípico, estão ligadas a eventos multifatoriais relacionados não só à capacidade de resposta imune do hospedeiro, mas também à características expressas pelas leveduras que culminam tanto na expressão tardia de padrões de resposta humoral, quanto na capacidade de escape da resposta celular.

Palavras-chave: *Candida tropicalis*. *switching* fenotípico. *Galleria mellonella*. virulência.

PERINI, Hugo Felix. **Evaluation of interaction between lineages derived from phenotypic switching of *Candida tropicalis* and *Galleria mellonella* larvae.** 2017. 69f. Dissertation (Master degree in Microbiology) – State University of Londrina, Londrina, 2017.

ABSTRACT

Among the virulence factors described for *Candida tropicalis*, phenotypic switching has been notable for generating phenotypic variability within populations. *Galleria mellonella* is a responsive model in the study of virulence of phenotypic variants from phenotypic switching, however, the knowledge about the parasite/host relationship of this lepidopteran with such strains is short. The present work had as objective to analyze cellular and humoral responses of *G. mellonella* to the infection with phenotypic lines (Parental, crepe, rough, crepe revertant and rough revertant) of *C. tropicalis*, and observe the differentiated interaction of yeast with components of the larval immune system. Regarding the humoral response, all analyzed morphotypes were able to induce melanization in *G. mellonella* larvae. After 24 hours of infection, all the variants of switching had a greater induction of melanization in relation to the Parental morphotype. In addition to the melanization, there was stimulation after one hour of infection, the expression of the gene responsible for the synthesis of Gallinomycin in all morphotypes, except for the Crepe morphotype. This morphotype showed the highest induction of this gene after 4 hours of infection, showing that the response of the larva is later for this characteristic for this morphotype. The expression of Gallerimycin, another antimicrobial peptide, remained low in the two analyzed times. Parental, Crepe and Rough showed decreased expression of this peptide, while the respective revertants maintained the same rate of expression of the larvae that received only PBS. In addition to the humoral component, the cellular component also showed differentiated responses to contact with the analyzed morphotypes. The morphotype crepe, more virulent in the invertebrate model, induced a greater decrease in the number of hemocytes and greater survival when cultured in the presence of these cells; moreover, its revertant, although morphologically similar to the parental, showed similarity in the analyzed characteristics to the more structured morphology, showing that although the return to the parental morphology occurs, revertant morphologies can maintain response factors similar to those of more structured morphologies. The present work concludes that differences in the virulence of the morphotypes resulting from the phenotypic switching event are linked to multifactorial events related not only to the host's immune response capacity but also to the characteristics expressed by the yeasts that culminate both in late pattern expression of humoral response, as well as the ability to escape the cellular response.

Keywords: *Candida tropicalis*. Phenotypic switching. *Galleria mellonella*. virulence.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Melanização apresentada por larvas de <i>Galleria mellonella</i> após infecção por 2 e 24 horas com 5×10^5 células/larva de linhagens derivadas de <i>switching</i> fenotípico do sistema 49.07 de <i>Candida tropicalis</i>	50
Figura 2 -	Expressão gênica dos peptídeos antimicrobianos galiomicina e gallerimicina após uma e quatro horas de infecção com linhagens morfológicas do isolado 49.07 derivadas de <i>switching</i> fenotípico.....	51
Figura 3 -	Porcentagem de hemócitos contendo células internalizadas das linhagens morfológicas derivadas de <i>switching</i> fenotípico do isolado 49.07 de <i>Candida tropicalis</i>	52
Figura 4 -	Micrografia eletrônica de varredura demonstrando processo de fagocitose entre hemócitos de <i>Galleria mellonella</i> e células fúngicas derivadas de <i>switching</i> fenotípico de <i>Candida tropicalis</i>	53
Figura 5 -	Densidade de hemócitos por ml de hemolinfa de larvas infetadas com 5×10^5 células/larva de linhagens derivadas de <i>switching</i> fenotípico do sistema 49.07 de <i>Candida tropicalis</i> durante 2, 4 e 24 horas de infecção.....	54
Figura 6 -	Unidades formadoras de colônia (UFC) após co-cultivo por 4 horas de linhagens morfológicas derivadas de <i>switching</i> fenotípico com hemócitos de <i>Galleria mellonella</i>	55
Figura 7 -	Expressão do gene <i>Hwp1</i> e dos fatores de transcrição <i>Efg1</i> e <i>Bcr1</i> , após uma e quatro horas de infecção com linhagens morfológicas do isolado 49.07 derivadas de <i>switching</i> fenotípico	56

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 -** Oligonucleotídeos utilizados para a análise de expressão gênica empregando qPCR.....48
- Tabela 2 -** Comparação das características das interações entre *Galleria mellonella* e as linhagens fenotípicas de *Candida tropicalis*. Cores mais escuras indicam maior expressão dessas características, cores mais claras indicam menor demonstração das mesmas em relação ao Parental Liso49

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1 GÊNERO CANDIDA.....	14
2.2 <i>Candida tropicalis</i>	18
2.3 SWITCHING FENOTÍPICO	19
2.4 <i>Galleria mellonella</i> COMO MODELO PARA TESTES IN VIVO	21
2.5 <i>Galleria mellonella</i> COMO MODELO PARA O ESTUDO DE <i>Candida spp.</i>	24
3 OBJETIVOS.....	25
3.1 OBJETIVO GERAL.....	25
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO	26

1 INTRODUÇÃO

Leveduras pertencentes ao gênero *Candida* podem estar presentes na microbiota normal de indivíduos saudáveis, no entanto podem agir como patógenos oportunistas no caso de distúrbios imunológicos (HA et al., 2010; NUCCI, 2010). Dentre as principais espécies patogênicas do gênero esta *Candida tropicalis* (NAGLIK, 2003; PAPON et al., 2013; MERSEGUEL et al., 2015). Indivíduos dessa espécie estão ligados a casos de infecções sanguíneas em surtos hospitalares, principalmente em regiões tropicais (SHIN et al., 2002; COLOMBO et al., 2006; NUCCI; COLOMBO, 2007), levando à grandes taxas de mortalidade (KONTOYIANNIS et al., 2001; COLOMBO et al., 2007).

Por ser uma espécie patogênica, *C. tropicalis* expressa diversos fatores de virulência. Esses fatores estão diretamente relacionados com o sucesso na colonização e infecção de hospedeiros (COLOMBO et al., 2007; CONDE-ROSA et al., 2010; FURLANETO et al., 2011; COSTA et al., 2014). Um importante fator de virulência descrito para a espécie é a capacidade de apresentar *Switching* fenotípico (SOLL, 2009), esse evento epigenético é caracterizado pela emergência de colônias com morfologia alterada dentro de uma população. Essas alterações ocorrem a níveis transcricionais e podem gerar diversidade, levando a uma microevolução pontual que pode alterar perfis de virulência de isolados isogênicos, culminando no sucesso da infecção (SOLL, 1992; EGGER et al., 2004; JAIN et al., 2008; MULLER; PRADO, 2008).

Diversos são os modelos *in vivo* para o estudo de virulência fúngica, no entanto, tem ocorrido uma tendência à substituição de modelos mamíferos, por modelos invertebrados. Esses modelos, além de não apresentarem sentiência, impedindo conflitos éticos, podem ser mantidos por uma fração do valor que modelos vertebrados exigem (MESA-ARANGO et al., 2013). Embora filogeneticamente invertebrados estejam distantes de mamíferos e não apresentem sistema imune adaptativo, esses animais apresentam mecanismos de resposta inata muito semelhantes aos de vertebrados, podendo assim mostrar eficiência no estudo de infecções fúngicas (BRENNAN et al., 2002; PELEG et al., 2009; GAGO et al., 2014).

Larvas de *Galleria mellonella* tem se mostrado eficientes modelos para esses estudos. Esses animais possuem respostas celulares e humorais sensíveis à

infecções por espécies do gênero *Candida* (NEMETH et al., 2013; GAGO et al., 2014) e apresentam sobrevivência diferenciada quando infectadas por um mesmo número de células de variantes fenotípicas de um mesmo isolado de *Candida tropicalis*, mostrando que o modelo de *switching* fenotípico difere na indução de resposta imune nessas larvas e o hospedeiro alberga sensibilidade para o estudo do evento epigenético (MORALEZ et al., 2016).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 GÊNERO CANDIDA

Caracterizadas como fungos oportunistas, espécies do gênero *Candida* são reconhecidas como um dos principais agentes colonizadores e infecciosos do ser humano (RICHARDSON; LASS-FLÖRL, 2008; NUCCI et al., 2010). Dentre as espécies patogênicas do gênero, algumas são capazes de causar micoses superficiais ou em casos mais graves infecções disseminadas (DOSTÁL et al., 2003).

Infecções superficiais podem estar associadas com morbidade significativa, como em casos de candidíase mucocutânea crônica ou candidíase vaginal recorrente. Além disso, as espécies de *Candida* podem causar infecções sistêmicas potencialmente fatais onde taxas de mortalidade alcançam até 80% (WHIBLEY; GAFFEN, 2015).

Fungos pertencentes ao gênero *Candida* podem ser naturalmente encontrados como organismos comensais na microbiota normal de superfícies mucosas e cutâneas em uma grande parte da população, no entanto, podem agir como patógenos oportunistas em casos de distúrbios imunológicos. Dentre as mais de 200 espécies do gênero *Candida*, cerca de 20 espécies já foram identificadas como agentes etiológicos de infecções humanas (HA et al., 2010; NUCCI et al., 2010). Dentro desse subconjunto capaz de causar doenças, estão incluídas *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. dubliniensis* (NAGLIK; CHALACOMBE; HUBE, 2003; PAPON et al., 2013; MERSEGUEL et al., 2015). Filogeneticamente essas espécies estão predominantemente posicionadas no clado CTG, esses microrganismos são agrupados dessa forma por traduzir o códon CTG como serina ao invés de leucina (PAPON et al., 2013).

Das espécies patogênicas, *C. albicans* é a espécie mais estudada, visto que corresponde à levedura mais comumente diagnosticada entre isolados do gênero (COLOMBO et al., 2006). Embora *C. albicans* seja reconhecida como o principal agente causador de infecções, o número de espécies de não *C. albicans* tem aumentado consideravelmente, principalmente em casos de candidíases invasivas como candidemia (COLOMBO et al., 2007; CONDE-ROSA et al., 2010; FURLANETO et al., 2011; COSTA et al., 2014).

Embora *C. albicans* continue a ser a espécie mais frequentemente isolada e estudada, os fatores de risco para candidíase variam por espécie. *C. glabrata* está particularmente associada à candidíase bucal em idosos e usuários de próteses dentárias, enquanto que *C. dubliniensis* é frequentemente isolada de indivíduos soropositivos que apresentam candidíase oral (SULLIVAN; COLEMAN, 1998). Neonatos, indivíduos que receberam algum tipo de transplante, e pacientes que são submetidos à nutrição parenteral, apresentam risco aumentado de infecção por *C. parapsilosis* em comparação com outras espécies de *Candida*. Além disso, as diferenças geográficas na prevalência das espécies de *Candida* são evidentes. *C. albicans* e *C. glabrata* são proeminentes na América do Norte e Europa, enquanto *C. tropicalis* é tipicamente isolada em regiões tropicais, como Índia e América Latina (PFALLER et al., 2015). Estudos epidemiológicos em diversas partes do mundo, inclusive no Brasil, têm revelado um aumento significativo na incidência de espécies do gênero diferentes de *Candida albicans*, dentre as quais *Candida tropicalis* tem se destacado (COLOMBO et al., 2006; BRUDER-NASCIMENTO et al., 2010; COSTA et al., 2014).

Microrganismos patogênicos desenvolveram mecanismos que propiciam sucesso na colonização e infecção do hospedeiro. Dentre os determinantes de virulência atribuídos às espécies do gênero *Candida* tem-se a capacidade de diferenciação celular (formação de hifas e pseudo-hifas); secreção de enzimas hidrolíticas e de fator hemolítico; capacidade de adesão, formação de biofilme, invasão de tecidos e outros substratos e *switching* fenotípico (FRANÇA et al., 2011; SILVA et al., 2012; MORALES et al., 2014). A transição de um comensal a um patógeno tem sido relacionada a alterações expressão desses fatores de virulência juntamente com uma debilitação dos mecanismos de defesa do hospedeiro (COLOMBO et al., 2007; CONDE-ROSA et al., 2010; FURLANETO et al., 2011; COSTA et al., 2014).

A parede celular de *Candida* é composta por uma camada interna de polissacarídeos de quitina e β -1,3-glucano, e uma camada externa de mananas covalentemente associada a proteínas (GOZALBO et al., 2004; NETEA et al., 2008). Muitos dos padrões moleculares associados a patógenos conhecidos derivam da parede celular (GOW et al., 2012), destacando a importância desta estrutura em resposta à *Candida*. De fato, as diferenças na composição da parede celular e no reconhecimento de *Candida* são conhecidas por influenciar a resposta imunitária. Variações nas proteínas associadas à parede celular antigênica foram detectadas entre *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. guilliermondii* (GIL et al., 1991). Além disso, estudos recentes indicam que existem diversas proteínas associadas à parede celular com função antigênica em *C. tropicalis* (LEE et al., 2014).

A parede celular de *Candida* é uma estrutura dinâmica e representa um local privilegiado para interagir também com células epiteliais orais. *Hwp1* é a primeira proteína de superfície celular conhecida como necessária para a formação de biofilmes de *C. albicans in vivo* (NOBILE et al., 2008). *Hwp1* funciona como adesina na parede celular, promovendo a ligação de células fúngicas à superfície mucosa do hospedeiro. Embora tenha sido descrito como uma classe de adesina específica de hifas (STAAB et al., 1999), estudos mais recentes demonstraram que *Hwp1* pode surgir também quando a levedura expressa forma pseudo-hifal (SNIDE; SUNDSTROM, 2006)

A morfogênese fúngica envolve alterações na composição da parede celular e, portanto, os morfotipos de *C. albicans* expõem diferentes fatores de reconhecimento. Por exemplo, *Als3* e *Hyr1*, reguladores da fase hifal, dão origem a proteínas da parede celular específicas da hifa que contribuem para a resistência de *C. albicans* aos mecanismos de defesa do hospedeiro. *Als3* está envolvido na adesão e invasão de células hospedeiras e também é um receptor de ferritina, mediando assim a aquisição de ferro (LIU; FILLER, 2011). Além disso, ambos os fatores são alvos de vacinas, uma vez que a vacinação de cobaias com proteínas *Als3* ou *Hyr1* recombinantes melhora a depuração contra *C. albicans* (LUO et al 2011; LIN et al 2009).

Bcr1 é um fator transcricional que também está envolvido na regulação da formação de biofilme em *C. albicans* (NOBILE; MITCHELL, 2005; NOBILE et al., 2009). A deleção de *Bcr1* não tem efeito sobre o crescimento filamentoso da fase *White* do sistema *White-opaque*, no entanto, resulta na hiperfilamentação de células

da fase *Opaque* em *C. albicans*. Com isso, tem-se que *Bcr1* é um repressor específico de filamentação da fase *Opaque* em *C. albicans* (NOBILE; MITCHELL, 2005; GUAN et al., 2013). Em *C. tropicalis* verificou-se que a superexpressão ou a deleção de *Bcr1* estimula o a diferenciação em formas filamentosas (ZHANG et al., 2016).

C. albicans apresenta características polimórficas, ou seja, é capaz de apresentar formas unicelulares leveduriformes, pseudo-hifas e hifas verdadeiras. A transição entre essas morfologias é um traço chave no potencial de virulência para a espécie (GOW et al., 2012). Embora seja uma característica que confere vantagem adaptativa para essa espécie, nem todas as espécies de *Candida* são polimórficas. O crescimento como hifas filamentosas verdadeiras foi por muito tempo, associado a apenas a *C. albicans* e *C. dubliniensis*, no entanto, *C. tropicalis* também compartilha dessa característica. (MARTIN, WHITE, 1980; WHIBLEY et al., 2015). Estudos *in vitro* apontam que *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. glabrata* não formam hifas verdadeiras, embora tenha sido relatado que essas espécies são capazes de formação de pseudo-hifas (THOMPSON; CARLISLE; KADOSH, 2011; BRUNKE et al., 2014).

Efg1 é um dos fatores de transcrição responsável por formação de hifas (STOLDT et al., 1997). Em *C. albicans* é um importante ativador ou repressor da formação de hifas relacionadas a condições ambientais (LO et al., 1997; STOLDT et al., 1997; TEBARTH et al., 2003). *Efg1* é um dos seis fatores de transcrição responsáveis pelo controle da formação de biofilme em *C. albicans* e sua deleção causa mudanças drásticas na capacidade de formar biofilme na espécie (NOBILE et al., 2012). No sistema *White-opaque*, *Efg1* esta diretamente relacionado com o estado fenotípico *White* (SONNEBORN et al., 1999; SRIKANTHA et al., 2000; ZORDAN et al., 2007). *Efg1* liga as sequências de cinco outros fatores de transcrição e é responsável pela repressão do principal regulador da fase *Opaque* (*Wor1*) (ZORDAN et al., 2007; HERNDAY et al., 2013). Além do seu papel fenotípico, *Efg1* desempenha papel importante da colonização do trato gastrointestinal após infecção em *C. albicans* (PIERCE; KUMAMOTO, 2012; PANDE et al., 2013; HIRAKAWA et al., 2014).

2.2 CANDIDA TROPICALIS

Candida tropicalis juntamente com todas as outras espécies do gênero *Candida* são membros do reino Fungi, filo Ascomycota, classe Hemiascomycetes, e ordem Saccharomycetales (CHAI et al., 2010). *C. tropicalis* é uma levedura diploide, e se reproduz majoritariamente por brotamento, sendo capaz de se diferenciar em pseudo-hifas, quando uma cadeia de blastoconídios gerados por brotamento não se separa, ou em hifas verdadeiras, propriedade unicamente compartilhada com *C. albicans* e *C. dubliniensis* (SUZUKI et al., 1991). A proximidade filogenética entre *C. tropicalis* e *C. albicans* faz com que essas duas espécies acabem por compartilhar alguns atributos morfológicos e características de virulência (CHAI et al., 2010).

Diversos estudos apontam que após a colonização, *C. tropicalis* tem capacidade de se disseminar rapidamente em hospedeiros imunocomprometidos e causar alta mortalidade (CHAI et al., 2010). A epidemiologia da espécie aponta que isolados de *C. tropicalis* estão amplamente associados a surtos hospitalares (SHIN et al., 2002; COLOMBO et al., 2006; NUCCI e COLOMBO, 2007). Nacionalmente *C. tropicalis* esta relacionada a mais de 20% dos casos de candidemia, superando dados relatados para América do Norte e Europa (NUCCI e COLOMBO, 2007). Em alguns estudos epidemiológicos, candidemia causada por *C. tropicalis* tem sido associada a mortalidade superior a observada por outras espécies de *Candida* (KONTOYIANNIS et al., 2001; COLOMBO et al., 2007). Regionalmente, entre 2010 e 2011 *C. tropicalis* foi responsável por 30,9% dos episódios de candidemia no Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina (COSTA et al., 2014).

C. tropicalis apresenta polimorfismo, ou seja, é capaz de exibir múltiplas formas morfo genéticas, incluindo fases blastoconidiais, hifais e pseudo-hifais. A diferenciação de blastoconídio, forma predominante em fungos leveduriformes, em hifas e pseudohifas, pode estar relacionada com padrões de invasão de tecidos e sucesso na colonização, uma vez que blastoconídios são reconhecidos como meios de disseminação e formas filamentosas como meios de invasão, sendo essas últimas, as únicas formas capazes de invadir epitélio humano reconstituído (LACAZ et al., 2002; SILVA et al., 2010).

Além de diferenciação em formas filamentosas, reconhecido fator de virulência para a espécie, *C. tropicalis* é capaz de expressar diversos outros fatores que auxiliam no sucesso contra o hospedeiro. Dentre esses fatores, *switching* fenotípico tem se destacado por gerar variabilidade morfológica dentro de

populações da espécie (MANNNS et al., 1994; AL-FATTANI; NAGLIK et al., 2003; DOUGLAS, 2006; NOBILE et al., 2008; LUO et al., 2010; JAYATILAKE, 2011).

2.3 SWITCHING FENOTÍPICO

Switching fenotípico tem se destacado como importante fator de virulência para espécies de *Candida*. Sugere-se que a alteração fenotípica fornece variabilidade dentro das populações colonizadoras para desafios em diferentes ambientes (SOLL, 2009). O evento é acompanhado de alterações na expressão de propriedades antigênicas, morfologia das colônias, capacidade de formação de biofilme, expressão de polimorfismo e mudanças nas afinidades com diferentes tecidos em diversas espécies de *Candida* (CALDERONE; FONZI, 2001; LOHSE; JOHNSON, 2009).

Switching fenotípico ocorre em uma pequena fração de uma população. Este evento epigenético é caracterizado por ser aleatório e reversível, com altas taxas de interconvertibilidade, não sendo necessariamente induzido por sinais externos (SLUTSKY et al., 1987). Para fungos *switching* fenotípico é definido pela ocorrência de mudança reversível da morfologia da colônia que ocorre em frequências superiores às de mutações somáticas. Por ser um evento epigenético, as mudanças ocorrem a níveis transcricionais, e podem ser transmitidas às células filhas (EGGER et al., 2004; MULLER e PRADO, 2008). Tais mudanças a nível transcricional podem ajudar a infecção de diferentes sítios anatômicos, assim como auxiliar na sobrevivência em um ambiente desfavorável (SOLL, 1992). O processo de *switching* fenotípico confere aos fungos resiliência a pressões seletivas, dando a eles a possibilidade de gerar diversidade (JAIN et al., 2008). Estima-se que microrganismos capazes de realizar *switching* fenotípico são submetidos a uma microevolução rápida, que lhes permite adaptar-se a um microambiente em constante mudança (STRAUB et al., 2001; JAIN et al., 2008).

Os sistemas de *switching* têm sido caracterizados em *C. albicans* (SLUTSKY et al., 1987; SOLL et al., 1992), e em outras espécies de *Candida*, como *C. tropicalis* (SOLL et al., 1988), *Candida parapsilosis* (LOTT et al., 1993), *Candida lusitanae* (YOON et al., 1999) e *Candida glabrata* (LACHKE et al., 2000).

A observação de variações morfológicas dentro de populações isogênicas começou com a caracterização do sistema White-opaque em *C. albicans*. Macroscopicamente, colônias apresentavam diferenças na cor e vivacidade,

enquanto microscopicamente o tamanho celular também diferia entre esses morfotipos (SLUTSKY et al., 1987). Atualmente para o sistema *White-opaque* em *C. albicans* já foram descritos mais de 373 genes que são expressos diferencialmente em variantes de *switching* (LAN et al., 2002). Aproximadamente um terço desses genes está relacionado a vias metabólicas, no entanto, outros genes podem estar relacionados a diversas funções, incluindo adesão, composição da superfície celular, respostas a estresse, vias de sinalização e virulência (JAIN et al., 2008). Xie e colaboradores (2012), propuseram a inserção de mais um tipo de morfotipo dentro do sistema *White-opaque*, mostrando que a indução de *switching* por N-acetilglicosamina gera uma terceira morfologia de colônia diferente das duas já observadas, esses autores sugeriram então o sistema *Tristable* ou *White-grey-opaque*.

Em *C. tropicalis*, *switching* fenotípico foi primeiramente descrito por Soll e colaboradores em 1988. Segundo estes autores, isolados advindos de casos de candidemia apresentaram alta frequência de *switching*. Em 2011, Porman e colaboradores observaram presença do sistema *White-opaque* nessa espécie, eles demonstraram que esse sistema regula o programa de *matting* sexual, aumentando potencialmente a virulência de morfotipos originados pelo evento, uma vez que somente células advindas de colônias opacas eram capazes de formar biofilme. Nesse mesmo ano, França e colaboradores mostraram que morfotipos de *C. tropicalis* derivados de *switching* fenotípico diferem quanto à capacidade de formação de biofilme em poliestireno.

Além dos potenciais de formação de biofilme, linhagens fenotípicas advindas de *switching* podem apresentar atividade hemolítica diferenciada, assim como perfis de suscetibilidade a antifúngicos distintos. Esses potenciais diferenciados podem estar ligados diretamente com a capacidade de diferenciação em formas filamentosas, uma vez que alguns desses morfotipos apresentaram potencial de filamentação conspícuo (MORALEZ et al, 2014). Recentemente, Moralez e colaboradores (2016), mostraram que variantes morfológicas isogênicos podem apresentar potencial de dano celular diferenciado em células epiteliais humanas, assim como potencial em causar morte em larvas de *Galleria mellonella*.

2.4 GALLERIA MELLONELLA COMO MODELO PARA TESTES IN VIVO

Modelos animais têm sido usados nas últimas décadas para o estudo de virulência de diferentes patógenos microbianos. Além de questões éticas, o uso de mamíferos requer um alto investimento em alimentação, instalações adequadas e atendimento das exigências jurídicas para a utilização dos mesmos (MESA-ARANGO et al., 2013). Nas últimas décadas tem ocorrido uma conscientização internacional, visando a diminuição do uso de mamíferos na rotina laboratorial. Para isso, se têm buscado modelos alternativos, que gerem dados compatíveis com os dados já encontrados na literatura para a substituição dos modelos empregados usualmente (MESA-ARANGO et al., 2013).

Insetos e mamíferos compartilham alto grau de homologia estrutural e funcional da resposta imune inata. Essa resposta é a principal linha de defesa de vertebrados contra diversos agentes microbianos. Estudos mais detalhados sobre a resposta imune de insetos apontaram que esses invertebrados possuem um sistema altamente eficaz e adaptado, que é capaz de lidar com uma vasta gama de microrganismos com cargas que seriam letais para vertebrados (LEVY, 2001).

Como abordagem alternativa, diferentes modelos de infecções em invertebrados têm sido desenvolvidos. Entre eles estão: *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, e as larvas de *G. mellonella* (JACOBSEN, 2014).

G. mellonella pertence à ordem Lepidoptera e à família Pyralidae. Alimenta-se de pólen e é naturalmente parasita de colméias. As larvas são brancas sem brilho, no entanto, apresentam forte melanização quando contaminadas com algum patógeno. Medem cerca de três centímetros de comprimento, pesam em torno de 0,3 a 0,4 gramas. Passam por metamorfose completa para dar origem a uma mariposa acinzentada. Em alguns países, as larvas de *G. mellonella* podem ser adquiridas a partir de uma variedade de fontes comerciais e podem ser mantidas por uma pequena fração do custo comparado com os modelos mamíferos utilizados nos testes convencionais *in vivo* de patogenicidade (KAVANAGH, 2004).

A manipulação de larvas de *G. mellonella* é relativamente simples. O tamanho grande, comparado a outros insetos, facilita o manuseio assim como a injeção de um inóculo definido. Esse modelo também pode ser utilizado para testes de eficiência de antimicrobianos. Além disso, em contraste com outros hospedeiros invertebrados, as larvas de *G. mellonella* podem ser mantidas a temperaturas de até 37°C, essas temperaturas, além de serem equivalentes às temperaturas de hospedeiros

mamíferos, favorecem a expressão de alguns fatores de virulência microbianos, que só se manifestam nessas condições (BRENNAN et al., 2002; PELEG et al., 2009).

Várias são as linhas e os mecanismos de defesa desses insetos. A primeira dessas linhas é a cutícula. A cutícula é uma barreira física, estruturalmente e quimicamente complexa, que tem como objetivo barrar a entrada de patógenos na hemocele (cavidade do corpo de insetos preenchida por hemolinfa). (LECUONA et al., 1997). Uma vez lesionada a cutícula ativa a resposta imunitária humoral, que por sua vez leva à produção de cecropinas e atacinas, que podem exibir atividade antibacteriana (TEETOR-BARSCH E ROBERTS, 1983; KAVANAGH, 2010).

Embora a cutícula seja a primeira linha de defesa dos insetos, é na hemolinfa onde ocorrem os principais mecanismos de defesa dos mesmos (MORTON et al., 1987). Esse fluido contém células de defesa e peptídeos antimicrobianos que auxiliam na resposta imune do indivíduo. Os hemócitos tem função semelhante aos fagócitos dos mamíferos, eles podem compor até 30% da hemolinfa de algumas espécies de insetos, e podem ser encontrados associados ao corpo gorduroso, à traqueia ou ao sistema digestório (RATCLIFE, 1985).

Os insetos produzem uma variedade de peptídeos antimicrobianos em resposta a infecção microbiana ou lesão corporal (BULET et al., 1999). A maioria desses peptídeos é sintetizada pelo corpo gorduroso, que é um dos principais tecidos ligados à resposta imune. Eles são secretados para a hemolinfa e funcionam na remoção dos microrganismos numa fase precoce da resposta imune. Tem sido relatado que alguns peptídeos antimicrobianos também são expressos no intestino médio e no epitélio integumental (TZOU et al., 2000). Os peptídeos antimicrobianos de insetos são frequentemente classificados em helicais, (semelhantes à cecropina), peptídeos ricos em cisteína (defensina de insetos como drosomicina e thanatina), peptídeos ricos em prolina (como drosomicina) e peptídeos ricos em glicina (atacinas, sacotoxinas e dipterocinas). Esses quatro grupos são divididos de acordo com os seus padrões estruturais (BULET et al., 1999). Após o primeiro isolamento de cecropinas a partir da hemolinfa de pupas de *Hyalophora cecropia* infectadas por bactérias (HULTMARK et al., 1980), também foram descritos vários peptídeos antimicrobianos semelhantes à cecropina, com estrutura helicoidal em diversas ordens de insetos (LEE et al, 2004).

Existem certas discrepâncias na literatura quanto à caracterização dos tipos de hemócitos presentes na hemolinfa dos diferentes insetos. No entanto, Wu e

colaboradores (2016), trazem que em *Galleria mellonella* estão presentes quatro tipos de hemócitos. São eles: Plasmócitos, células granulares, esferulócitos e oenócitos. Tomiotto-Pellissier e colaboradores (2016), mostraram que apenas plasmócitos e células granulares exibem capacidade de fagocitose em *Leishmania (Viannia) brasiliensis*.

O processo de fagocitose em insetos e mamíferos parece ser muito semelhante. Em ambos os casos, há a ligação de ligantes opsônicos na superfície da partícula exógena. Uma cascata intracelular resulta na internalização do corpo estranho (TOJO et al., 2000). Esse processo é mediado por lectinas, que por sua vez são encontradas na hemolinfa de insetos juntamente com lisozima, um antimicrobiano peptídico associado normalmente com a resposta humoral. A lisozima foi encontrada dentro de hemócitos, e os níveis intra-hemolinfa de lisozima e lectina aumentam com a infecção, indicando que estes atuam sinergicamente após o processo de fagocitose (WILSON; RATCLIFFE, 2000). Estudos apontam que ao contrário do que se pensava inicialmente, não só os plasmócitos estão envolvidos no processo de fagocitose de partículas exógenas, como também células granulares participam desse processo (TOJO et al., 2000; TOMIOTTO-PELLISSIER et al., 2016). Hemócitos que são capazes de fagocitar são capazes de eliminar patógenos usando peptídeos antimicrobianos e espécies reativas de oxigênio produzidas pela via respiratória. Em *G. mellonella*, essas células apresentam várias propriedades semelhantes a fagócitos de mamíferos (LAVINE; STRAND, 2002; BERGIN et al., 2005).

O processo de fagocitose requer um sinal sequencial de eventos transducionais, e receptores de superfície de plasmócitos hemolíticos e granulócitos são similares aos de fagócitos de mamíferos (VILMOS; KURUCZ, 1998). O processo de fagocitose em hemócitos ainda não é completamente compreendido, mas plasmócitos e hemócitos mostram ter receptores similares aos de macrófagos (FRANC et al., 1996). Estudos apontam a similaridade entre a capacidade de fagocitar *Candida albicans* de neutrófilos e hemócitos. A fagocitose de partículas exógenas por hemócitos estimula a via de ruptura respiratória envolvendo a atividade de NADPH-oxidase e ilustra que a produção de superóxido é necessária para a morte microbiana eficiente por neutrófilos e hemócitos (BERGIN et al., 2005).

As semelhanças entre as vias de explosão oxidativa de hemócitos de insetos e neutrófilos de mamíferos levantam a possibilidade de que os complexos

que geram espécies reativas de oxigênio também possam conter componentes homólogos. Relatos forneceram evidências para o envolvimento de proteínas homólogas a neutrófilos humanos p47phox e p67phox (BANFI et al, 2003; GEISZT, et al., 2003).

Além da fagocitose, outros processos imunológicos também são desencadeados com a infecção do inseto, como a nodulação, a encapsulação, a coagulação e a melanização (KAVANAGH, 2004).

Após contaminação com patógenos microbianos as larvas de *G. mellonella* apresentam cor escura devida à acumulação de melanina nas células (MOWLDS; KAVANAGH, 2008). Os insetos também são capazes de sintetizar uma gama de compostos antimicrobianos incluindo defensinas, lisozimas e proteínas catiônicas, que são ativas contra uma gama de bactérias (POWNING; AMP; DAVIDSON, 1973; ENGSTROM et al., 1984; RAJ; DENTINO, 2002).

2.5 *GALLERIA MELLONELLA COMO MODELO PARA O ESTUDO DE CANDIDA SPP.*

Diferentes modelos de testes em mamíferos foram desenvolvidos para mimetizar diferentes formas de candidíases. Modelos murinos são considerados como a principal fonte para estudar e analisar a patogênese e a eficácia de tratamento com antifúngicos *in vivo*. No entanto, as considerações econômicas, logísticas e éticas limitam o uso de mamíferos em experimentos de infecção, especialmente quando o modelo em questão exige a análise de um grande número de isolados fúngicos (JACOBSEN, 2014).

A alta virulência de *C. albicans* em modelos murinos correlaciona-se com a situação clínica atual, em que esta levedura é responsável por grande parte das infecções causadas por *Candida*. No entanto, infecções por espécies não *Candida albicans* são emergentes, incluindo espécies como *Candida glabrata* e *Candida parapsilosis*. A comparação de potenciais de virulência diferentes em *Candida spp.* foi realizada em *G. mellonella*, confirmando que *C. albicans* e *C. tropicalis* são as espécies mais virulentas (ARENDRUP; HORN; FRIMONT-MOLLER, 2002). Além disso, esses estudos também revelaram potencial de virulência substancial de *C. parapsilosis* em *G. mellonella*, levando a uma mortalidade significativa de larvas infectadas (KAVANAGH, 2004).

Algumas espécies de *Candida* ao infectarem larvas de *G. mellonella* são capazes de se diferenciar em formas filamentosas. As formas filamentosas podem

ser um dos fatores responsáveis pela penetração em tecidos, o que por sua vez mediará uma evasão ou destruição das células fagocitárias do sistema imune, uma vez que a filamentação dificulta o reconhecimento dessas células. Essa característica é reconhecida como um fator de virulência para espécies de *Candida* (NEMETH et al., 2013; GAGO et al., 2014). Particularmente, morfologias filamentosas, são responsáveis pela adesão em células epiteliais e tecidos, promovendo assim a invasão e subsequente dano ao hospedeiro (SUDBERY; GOW; BERMAN, 2004). Há relatos de que o número de hemócitos de insetos são alterados pela presença de estímulos patogênicos ou componentes da parede celular de *Candida* (MOWLDS et al., 2010; RODRIGUES et al., 2010).

Como a diferenciação em formas filamentosas pode permitir as células de *Candida* dificultarem a fagocitose das células do sistema imunológico, Gago e colaboradores (2014) analisaram os hemócitos em larvas infectadas de *G. mellonella*. O número de hemócitos foi significativamente inferior em larvas infectadas com *C. parapsilosis* e *C. orthopsilosis* em comparação com *C. metapsilosis*. Correlações do número de hemócitos com a sobrevivência após a infecção também foram analisadas pelos autores. Esses autores também sugeriram que a produção de pseudohifas por células de leveduras fagocitadas pode danificar hemócitos, contribuindo assim para o menor número de hemócitos no ensaio. Esta hipótese é reforçada pelos resultados de Nemeth e colaboradores (2013), que demonstraram um maior potencial citotóxico de *C. parapsilosis* e *C. orthopsilosis* contra macrófagos de mamíferos.

Moralez e colaboradores (2014) mostraram que morfotipos de um mesmo isolado de *Candida tropicalis* podem diferir quanto ao potencial de filamentação, assim como outros fatores de virulência. Além disso, Moralez e colaboradores (2016) apontaram que larvas de *G. mellonella* respondem de forma diferenciada à infecção por variantes morfológicas advindos de *switching* fenotípico. Esses dados apontam que esse modelo pode ser usado para a observação de diferenças de virulência em morfotipos de *C. tropicalis*.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar interações entre componentes do sistema imune de *Galleria mellonella* com linhagens fenotípicas do isolado 49.07 de *Candida tropicalis*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a diferença entre os variantes morfológicos comparados com morfotipo Parental (Morfologia lisa) na interação com componentes do sistema imune inato de *Galleria mellonella*.
- Analisar fatores associados à morfologia de colônia na interação parasito-hospedeiro.
- Avaliar respostas diferenciadas do hospedeiro invertebrado frente à infecção com linhagens fenotípicas de um mesmo isolado de *Candida tropicalis*.
- Analisar diferenças nos potenciais de virulência de linhagens morfológicas, com componentes de resposta imune de larvas de *Galleria mellonella*.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão do presente trabalho serão apresentados na forma de artigo.

REFERENCIAS

ARENDRUP, M.; HORN, T.; FRIMONT-MOLLER, N. *In vivo* pathogenicity of eight medically relevant *Candida* species in an animal model. **Infection**, v.30, p. 286-291, 2002.

AL-FATTANI, M. A.; DOUGLAS, L. J. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. **Journal of Medical Microbiology**. v. 55, 2006.

BANFI, B.; CLARK, R. A.; STEGER, K.; KRAUSE, K. H. Two novel proteins activate superoxide generation by the NADPH oxidase NOX1. **The Journal of Biological Chemistry**. 2003.

BERGIN, D.; REEVES, E. P.; RENWICK, J.; WIENTJES, F. B.; KAVANAGH, K. Superoxide Production in *Galleria mellonella* Hemocytes: Identification of Proteins Homologous to the NADPH Oxidase Complex of Human Neutrophils. **Infection and Immunity**. 2005.

BULET, P.; HETRU, C.; DIMARCQ, J.; HOFFMAN, D. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. **Developmental e Comparative immunology**. V. 23, 1999.

BRENNAM, M.; THOMAS, D. Y.; WHITEWAY, M.; KAVANAGH, K. Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae . **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. V. 34, 2002.

BRUDER-NASCIMENTO, A; CAMARGO, C. H.; SUGIZAKI, M. F.; SADATSUNE, T.; MONTELLI, A. C.; MONDELLI, A. L.; BAGAGLI, E. Species distribution and susceptibility profile of *Candida* species in a Brazilian public tertiary hospital. **BMC Research Notes**, v. 3, p. 1-5, 2010.

BRUNKE, S.; SEIDER, K.; FISCHER, D.; JACOBSEN, I. D.; KASPER, L.; JABLONOWSKI, N.; WARTENBERG, A.; BADER, O.; ENACHE-ANGOUUVANT, A.; SCHALLER, M.; d'ENFERT, C.; HUBE, B. One small step for a yeast -- microevolution within macrophages renders *Candida glabrata* hypervirulent due to a single point mutation. **Plos Pathogens**. 2014.

CALDERONE, R. A; FONZI, W. A. Virulence factors of *Candida albicans*. **TRENDS in Microbiology** Vol.9, No.7, 2001.

CHAI, L.Y.A.; DENNING, D.W.; WARN, P. *Candida tropicalis* in human disease. **Informa Health Care**. p. 1-17. 2010.

COLOMBO, A.L.; NUCCI, M.; PARK, B.J.; NOUÉR, S.A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; MATTA, D.A.; WARNOCK, D.; MORGAN J. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, n. 8, p. 2816-2823, 2006.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T.; SILVA, L. R. B.; MONFARDINI, P. A.; CUNHA, A. K. B.; RADY, P.; ALVES, T.; ROSAS, R. C. Prospective observational study of candidemia in São Paulo, Brazil: incidence rate, epidemiology, and predictors of mortality. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 28, p. 570-576, 2007.

CONDE-ROSA, A.; AMADOR, R.; PÉREZ-TORRES, D.; COLÓN, E.; SÁNCHEZRIVERA, C.; NIEVES-PLAZA, M.; GONZÁLEZ-RAMOS, M.; BERTRÁN PASARELL, J. Candidemia distribution, associated risk factors, and attributed mortality at a University-based medical center. **Puerto Rico Health Sciences Journal**, v. 29, p. 26-29, 2010.

COSTA, V.G.; QUESADA, R.M.B.; STIPP-ABE, A.T.; FURLANETO-MAIA, L.; FURLANETO, M.C. Nosocomial bloodstream *Candida* infections in a tertiary-care hospital in South Brazil: a 4-year survey. **Mycopathologia**, v. 178, p. 243-250, 2014.

DOSTÁL, J.; HAMAL, P.; PAVLÍCKOVÁ, L.; SOUCEK, M.; RUML, T.; PICHOVÁ, I.; HEIDINGSFELDOVÁ, O. H. Simple method for screening *Candida* species isolates for the presence of secreted proteinases: a tool for the prediction of successful inhibitory treatment. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 712–716, 2003.

EGGER, G; LIANG, G.; APARICIO, A.; JONES, P. A. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. **Nature**, v. 429, p. 456-463, 2004.

ENGSTROM, P.; CARLSSOM, A.; ENGSTROM, A.; TAO, Z. J.; BENNICH, H. The antibacterial effect of attacins from the silk moth *Hyalophora cecropia* is directed against the outer membrane of *Escherichia coli*. **The EMBO Journal**. 1984.

FRANC, N. C.; DIMARCQ, J. L.; LAGUEUX, M.; HOFFMAN, J.; EZEKOWITZ, R. A. B. Croquemort, a novel *Drosophila* hemocyte/macrophage receptor that recognizes apoptotic cells. **Immunity**. v. 4. 1996.

FRANÇA, E. J. G.; ANDRADE, C. G. T. J.; FURLANETO-MAIA, L.; SERPA, R.; OLIVEIRA, M. T.; QUESADA, R. M. B.; FURLANETO, M. C. Ultrastructural architecture of colonies of different morphologies and biofilm produced by phenotypic switching of *Candida tropicalis*. **Micron**, v. 42, n. 7, p. 726-732, 2011.

FURLANETO, M.C.; ROTA, J. F.; QUESADA, R. M. B.; FURLANETO-MAIA, L. Species distribution and *in vitro* fluconazole susceptibility of clinical *Candida* isolates in a Brazilian tertiary-care hospital over a 3-year period. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, p. 595-599, 2011.

GAGO, S.; GARCÍA-RODAS, R.; CUESTA, I.; MELLADO, E.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A. *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* virulence in the non-conventional host *Galleria mellonella*. **Virulence** v.5: p. 278-85. 2014.

GEISZT, M.; LEKSTROM, K.; WITTA, J.; LETO, T. L. Proteins homologous to p47 pho x and p67phox support superoxide production by NAD(P)H oxidase 1 in colon epithelial cells. **The Journal of Biological Chemistry**. 2003.

GIL, M. L.; CASANOVA, M.; MARTINEZ, J. P.; SENTANDREU. Antigenic cell wall mannoproteins in *Candida albicans* isolates and in other *Candida* species. **Journal of General Microbiology**. 1991.

GOW, N. A.; VAN DE VEERDONK, F. L .; BROWN, A. J.; NETEA, M. G. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. **Nature Reviews Microbiology**. V.10, 2012.

GOZALBO, D.; ROIG, P.; VILLAMON, E.; GIL, M. L. *Candida* and candidiasis: the cell wall as a potential molecular target for antifungal therapy. **Current Drug Targets - Infectious Disorders**. V.4, n. 2, 2004.

GUAN, G.; XIE, J.; TAO, L.; NOBILE, C. J.; SUN, Y.; CAO, C. Bcr1 plays a central role in the regulation of opaque cell filamentation in *Candida albicans*. **Molecular Microbiology**. v.89, 2013.

HA, J. F.; ITALIANO, C. M.; HEATH, C. H.; SHIH, S.; REA, S.; WOOD, F. M. Candidemia and invasive candidiasis: A review of the literature for the burns surgeon. **Burns**, v. 37, p. 181-195, 2010.

HERNDAY, A. D.; LOHSE, M. B.; FORDYCE, P. M.; NOBILE, C. J.; DeRISI, L. Structure of the transcriptional network controlling white-opaque switching in *Candida albicans*. **Molecular microbiology**. v.90, 2013.

HIRAKAWA, M. P.; MARTINEZ, D. A.; SAKTHIKUMAR, S.; ANDERSON, M.; BERLIN, A. Genetic and phenotypic intra-species variation in *Candida albicans*. **Genome Research**. V.25, 2014.

HULTMARK, D.; STEINER, H.; RASMUSON, T.; BOMAN, H. G. Insect immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins for hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. **The FEBS Journal**. 1980.

JACOBSEN, I. D. *Galleria mellonella* as a model host to study virulence of *Candida*. **Virulence**, V. 5, p. 237-239. 2014.

JAIN, N.; HASAN, F.; FRIES, B. Phenotypic *switching* in fungi. **Current Fungal Infection Reports**, v. 2, p. 180-188, 2008.

JAYATILAKE, J. A. M. S. A review of the ultrastructural features of superficial candidiasis. **Mycopathologia**, v. 171, 2011.

KAVANAGH, K; FALLON, J. P. *Galleria mellonella* larvae as models for studying fungal virulence. **Fungal Biology Review**, v. 24, p. 79-83, 2010.

KAVANAGH, K; REEVES, E.P. Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 28, p. 101–112, 2004.

KONTOYIANNIS, D. P.; VAZIRI, I.; HANNA, H. A.; BOKTOUR, M.; THORNBY, J.; HACHEM, R.; BODEY, G. P.; RAAD, I. I. Risk factors for *Candida tropicalis* fungemia in patients with cancer. **Clinical Infectious Disease**. v. 33, p. 1676–1681, 2001.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, C. E.; HEINZ-VACARI, E. M.; MELO, N. T. **Tratado de Micologia Médica de Lacaz**. 9ª edição. São Paulo: Sarvier, 2002.

LACHKE, S. A.; SRIKANTHA, T.; TSAI, L. K.; DANIELS, K.; SOLL, D. Phenotypic switching in *Candida glabrata* involves phase-specific regulation of the metallothionein gene MT-II and the newly discovered hemolysin gene HLP. **Infection and immunity**. 2000.

LAN, C. Y.; NEWPORT, G.; MURILLO, L. A.; JONES, T.; SCHERER, S.; DAVIS, R. W.; AGABIAN, N. Metabolic specialization associated with phenotypic switching in *Candida albicans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 99, n. 23, 2002.

LAVINE, M. D.; STRAND, M. R. Insect hemocytes and their role in immunity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. V.32, 2002.

LECUONA, R.; CLEMENT, J.M.; RIBA, G.; JOULIE, C.; SPORE, J.P. Germination and hyphal growth of *Beauveria* sp. O insect lipids. **Journal of Economic Entomology**. v. 90, p.119–123. 1997.

LEE, Y. S.; YUN, E. K.; JANG, W. S.; KIM, I.; LEE, J. H.; PARK, S. Y.; RYU, K. S.; SEO, S. J.; KIM, C. H.; LEE, I. H. Purification, cDNA cloning and expression of an insect defensin from the great wax moth, *Galleria mellonella*. **Insect Molecular Biology**. V. 13, 2004.

LEVY, J.A. The importance of the innate immune system in controlling HIV infection and disease. **TRENDS Immunology**. v. 22, p. 312–316. 2001.

LIN, L.; IBRAHIM, A. S.; XU, X.; FARBER, J. M.; AVANESIAN, V.; BAQUIR, B.; FU, Y.; FRENCH, S. W.; Jr EDWARDS, J.E.; SPELLBERG, B. Th1-Th17 cells mediate protective adaptive immunity against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* infection in mice. **Plos Pathogens**. 2009.

LIU, Y.; FILLER, S. G. *Candida albicans* Als3, a multifunctional adhesin and invasin. **Eukaryotic Cell**. 2011.

LUO, G.; IBRAHIM, A. S.; SPELLBERG, B.; NOBILE, C. J.; MITCHELL, A. P. FU, Y. *Candida albicans* Hyr1p confers resistance to neutrophil killing and is a potential vaccine target. **The journal of Infectious Diseases**. 2010.

LUO, G.; IBRAHIM, A. S.; FRENCH, S. W.; Jr EDWARDS, J. E.;FU, Y. Active and passive immunization with rHyr1p-N protects mice against hematogenously disseminated candidiasis. **Plos one**. 2011.

MARTIN, M. V.; WHITE, F. H. A microbiologic and ultrastructural investigation of germ-tube formation by oral strains of *Candida tropicalis*. **American Society of Clinical Pathologists** 1980.

MERSEGUEL, K.B.; NISHIKAKU, A.S.; RODRIGUES, A. M.; PADOVAN, A.C.; CARMONA E FERREIRA, R.; MELO, A. S. A.; BRIONES, M. R.S.; COLOMBO, A. S. Genetic diversity of medically important and emerging *Candida* species causing invasive infection. **BMC Infectious Diseases**. 2015.

MESA-ARANGO, A.C.; FORASTIERO, A.; BERNAL-MARTINEZ,L. CUENCA-ESTRELLA,M.; MELLADO, E.; ZARAGOZA, O. The non-mammalian host *Galleria mellonella* can be used to study the virulence of the fungal pathogen *Candida tropicalis* and the efficacy of antifungal drugs during infection by this pathogenic yeast. **Medical Mycology**. v.51, p.461-472. 2013.

MORALEZ, A. T. P.; FRANÇA, E. J. G.; FURLANETO-MAIA, L.; QUESADA, R. M. B.; FURLANETO, M. C . Phenotypic switching in : association with modification of

putative virulence attributes and antifungal drug sensitivity. **Medical Mycology**, v. 51, p. 106-114, 2014.

MORALEZ, A. T. P.; PERINI, H. F.; FURLANETO-MAIA, L.; ALMEIDA, R. S.; PANAGIO, L. A.; FURLANETO, M. C. Phenotypic switching of *Candida tropicalis* is associated with cell damage in epithelial cells and virulence in *Galleria mellonella* model. **Virulence**. 2016.

MORTON, D.; DUNPHY, G.; CHADWICK, J. Reactions of haemocytes of immune and non-immune *Galleria mellonella* larvae to *Proteus mirabilis*. **Developmental and Comparative Immunology**. v. 11, p. 47–55. 1987.

MULLER, H. R.; PRADO, K. B. Epigenética: Um Novo Campo Da Genética. **Revista Unicenp de Biologia e Saúde**, v. 1, p. 61-69, 2008.

MOWLDS, P.; KAVANAGH, K. Effect of pre-incubation temperature on susceptibility of *Galleria mellonella* larvae to infection by *Candida albicans*. **Mycopathologia**. v. 165. 2008.

MOWLDS, P.; COATES, C.; RENWICK, J.; KAVANAGH, K. Dose-dependent cellular and humoral responses in *Galleria mellonella* larvae following beta-glucan inoculation. **Microbes and Infection**. V. 12, 2010.

NAGLIK, J. R.; CHALLACOMBE, S. J.; HUBE, B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, p. 400–428, 2003.

NEGRI, M.; SILVA, S.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R. Insights into *Candida tropicalis* nosocomial infections and virulence factors. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 31, p. 1399–1412, 2012.

NÉMETH, T.; TÓTH, A.; SZENZENSTEIN, J.; HORVÁTH, P.; NOSANCHIK, J. D.; GRÓZER, Z.; TÓTH, R.; PAPP, C.; HAMARI, Z.; VLÁGVOLGY, C. Characterization of virulence properties in the *C. parapsilosis sensu lato* species. **PLOS One**. v. 8 2013.

NETEA, M. G.; BROWN, G. G.; ULLBERG, B. J.; GOW, N. A. R. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. **Nature Reviews Microbiology**. V.6, 2008.

NOBILE, C. J.; MITCHELL, A. P. Regulation of cell-surface genes and biofilm formation by the *C. albicans* transcription factor Bcr1. **Current Biology**. V.15, 2005.

NOBILE, C. J.; SCHNEIDER, J. E.; NETT, J. E.; SHEPPARD, D. C.; FILLER, S. G.; ANDES, D. R.; MITCHELL, A. P. Complementary adhesin function in *C. albicans* biofilm formation. **Current Biology**. v. 18, n. 14, 2008.

NOBILE, C. J.; NETT, J. E.; HERNDAY, A. D.; HOMANN, O. R., DENEALD, J. S.; NANTEL, A. Biofilm matrix regulation by *Candida albicans* Zap1. **Plos Biology**. Vol.7. 2009.

NOBILE, C. J.; FOX, E. P.; NETT, J. E.; SORRELLS, T. R.; MITROVICH, Q. M.; HERNDAY, A. D. A recently evolved transcriptional network controls biofilm development in *Candida albicans*. **Cell**. V. 148. 2012.

NUCCI, M.; COLOMBO, A. L. Candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical, epidemiologic and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 58, p. 77-82, 2007.

NUCCI, M.; QUEIROZ-TELLES, F.; TOBÓN, A. M.; RESTREPO, A.; COMLOMBO, A. L. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. **Clinical Infectious Disease**, v. 51, p. 561-570, 2010.

PANDE, K.; CHEN, C.; NOBLE, S. M. Passage through the mammalian gut triggers a phenotypic switch that promotes *Candida albicans* commensalism. **Nature Genetics**. V.45, 2013.

PAPON, N.; COURDAVAULT, V.; CLASTRE, M.; BENNETT, R. J.; Emerging and emerged pathogenic *Candida* species: beyond the *Candida albicans* paradigm. **Plos Pathogens**. 2013.

PELEG, A. Y.; JARA, S.; MONGA, D.; ELIOPOULOS, G. M.; Jr MOELLERING, R. C.; MYLONAKIS, E. *Galleria mellonella* as a model system to study *Acinetobacter baumannii* pathogenesis and therapeutics . **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 2009.

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). **The Journal of Antibiotics**. V. 68, 2015.

PIERCE, J. V.; KUMAMOTO, C. A. Variation in *Candida albicans* EFG1 expression enables host-dependent changes in colonizing fungal populations. **mBIO**. V.3, 2012.

PORMAN, A. M.; ALBY, K.; HIRAKAWA, M. P.; BENNET, R. J. Discovery of a phenotypic switch regulating sexual mating in the opportunistic fungal pathogen *Candida tropicalis*. **PNAS**. 2011.

PORMAN, A. M.; HIRAKAWA, M.P.; JONES, S.K.; WANG, N.; BENNET, R.J. MTL-Independent phenotypic switching in *Candida tropicalis* and a dual role for *wor1* in regulating switching and filamentation. **PLOS Genetics**. v. 9. n.3. 2013.

POWNING, R. F.; DAVIDSON, W.; J. Studies on insect bacteriolytic enzymes. I. Lysosyme in haemolymph of *Galleria mellonella* and *Bombyx mori*. **Comparative Biochemistry and Physiology B**. v. 45, 1973.

RAJ, P. A.; DENTINO, A. R. Current status of defensins and their role in innate and adaptive immunity. **FEMS Microbiology Letters**. 2002.

RATCLIFFE, N. Invertebrate immunity – a primer for the nonspecialist. **Immunology**. v. 10, p. 253–270. 1985.

RICHARDSON, M.; FLÖRL-LASS, C. Changing epidemiology of systemic fungal infections. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, p. 5-24, 2008.

RODRIGUES, J.; BRAYNER, F. A.; ALVES, L. C.; DIXIT, R.; BARILLAS-MURY, C. Hemocyte differentiation mediates innate immune memory in *Anopheles gambiae* mosquitoes. **Science**. v.329, 2010.

SHIN, J. H.; KEE, S. J, SHIN, M. G.; KIM, S. H.; SHIN, D. H.; LEE, S. K.; SUH, S. P.; RYANG, D. W. Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 1244–1248, 2002.

SILVA, S. HOOPER, S. J.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; AZEREDO, J.; WILLIAMS, D. W. The role of secreted aspartyl proteinases in *Candida tropicalis* invasion and damage of oral mucosa. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, p.264-272, 2010

SILVA S, NEGRI M, HENRIQUES M, OLIVEIRA R, WILLIAMS DW, AZEREDO J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, p. 288–305, 2012.

SLUTSKY, B.; STAEBELL, M.; ANDERSON, J.; RISEN, L.; PFALLER, M.; SOLL, D.R. White-Opaque transition: a second high-frequency switching system in *Candida albicans*. **Journal of Bacteriology**. 1987.

SNIDE, J. L.; SUNDSTROM, P. A characterization of HWP1 promoter activation in pseudohyphal cells in *Candida albicans*." *Proceedings of the 8th ASM Conference on Candida and Candidiasis*. **American Society for Microbiology**. 2006.

SOLL, D. R.; STAEBELL, M.; LANGTIMM, C.; PFALLER, M.; HICKS, J.; RAO, T. V. GOPALA. Multiple *Candida* strains in the course of a single systemic. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, p. 1448-1459, 1988.

SOLL, D. R. High-frequency switching in *Candida albicans*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 5, n. 2, p. 183-203, 1992.

SOLL, D.R. Why does *Candida albicans* switch? **FEMS Yeast Research**, v. 9, p.973–989, 2009.

SONNEBORN, A.; TEBARTH, B.; ERNST, J. F. Control of white-opaque phenotypic switching in *Candida albicans* by the Efg1p morphogenetic regulator. **Infection Immunology**. V.67, 1999.

SRIKANTHA, T.; TSAI, L. K.; DANIELS, K.; SOLL, D. R. EFG1 null mutants of *Candida albicans* switch but cannot express the complete phenotype of white-phase budding cells. **Journal of Bacteriology**. V.182, 2000.

STOLDT, V. R.; SONNEBORN, A.; LEUKER, C. E.; ERNST, J. F. Efg1p, an essential regulator of morphogenesis of the human pathogen *Candida albicans*, is a member of a conserved class of bHLH proteins regulating morphogenetic processes in fungi. **EMBO Journal**. V.16. 1997.

STRAUB, A.; MICHEL, S.; MORSCHHÄUSER. Analysis of phase-specific gene expression at the single-cell level in the white-opaque switching system of *Candida albicans*. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 3761-3769, 2001

SUDBERRY, P.; GOW, N.; BERMAN, J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. **Trends in Microbiology**. V.12, 2004.

SULLIVAN, D.; COLEMAN, D. *Candida dubliniensis*: characteristics and identification. **Journal of Clinical Microbiology**. V. 36, n. 2. 1998.

SUZUKI, T.; MIYAMAE, Y.; ISHIDA, I. Variation of colony morphology and chromosomal rearrangement in *Candida tropicalis* pK233. **Journal of General Microbiology**, v. 137, n. 1, 1991.

TEBARTH, B.; DOEDT, T.; KRISHNAMURTHY, S.; WEIDE, M.; MONTEROLA, F. Adaptation of the Efg1p morphogenetic pathway in *Candida albicans* by negative autoregulation and PKA-dependent repression of the EFG1 gene. **Journal of Molecular Biology**. V.329, 2003.

TEETOR-BARSCH, A.; ROBERTS, D. W. Entomogenous *Fusarium* Species. **Mycopathologia**, v.43, p. 423-429, 1983.

THOMPSON, D. S.; CARLISLE, P. L.; KADOSH, D. Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. **Eukaryotic Cell**. 2011.

TOJO, S.; NAGAMUNA, F.; ARAKAWA, K. and YOKOO, S. Involvement of both granular cells and plasmatocytes in phagocytic reactions in the greater wax moth, *Galleria mellonella*. **Journal of Insect Physiology**. v. 46, p. 1129–1135. 2000.

TOMIOTTO-PELLISSIER, F.; CATANEO, A. H. D.; ORSINI, T. M.; dos THOMAZELLI, A. P. F. S.; DALEVEDO, G. A.; OLIVEIRA, A. G.; PANAGIO, L. A.; COSTA, I. N.; CONCHON-COSTA, I.; PAVANELLI, W.; ALMEIDA, R. S. *Galleria mellonella* hemocytes: A novel phagocytic assay for *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Journal of Microbiological Methods**. V. 131. 2016.

TZOU, P.; OHRESSER, S.; FERRANDON, D.; CAPOVILLA, M.; REICHHART, J. M.; LEMAITRE, B.; HOFFMANN, J. A.; IMLER, J. L. Tissue-specific inducible expression of antimicrobial peptide genes in *Drosophila* surface epithelia. **Immunity**. v.13, 2000.

VILMOS, P.; KURUCZ, E. Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. **Immunology Letters**. V. 62, 1998.

WHIBLEY, N.; GAFFEN, S. Beyond *Candida albicans*: Mechanisms of immunity to non-*albicans* *Candida* species. **Cytokine**. 2015.

WHIBLEY, N.; JAYCOX, J. R.; REID, D.; GARG, A.; TAYLOR, J.; CLANCY, C.; NGUYEN, M.; BISWAS, P.; McGEACHY, M.; BROWN, G. D.; GAFFEN, S. L. Delinking CARD9 and IL-17: CARD9 protects against *Candida tropicalis* infection through a TNF α -dependent, IL-17-independent mechanism. **The Journal of Immunology**. 2015.

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

WU, G.; LIU, Y.; DING, Y.; YI, Y. Ultrastructural and functional characterization of circulating hemocytes from *Galleria mellonella* larva: Cell types and their role in the innate immunity. **Tissue and Cell**. V. 48, 2016.

XIE, J.; DU, H.; GUAN, G.; TONG, Y.; KOURKOUNPETIS, T. K.; ZHANG, L.; BAI, F. Y.; HUANG, G. N-Acetylglucosamine induces white-to-opaque switching and mating in *Candida tropicalis*, providing new insights into adaptation and fungal sexual evolution. **Eukaryotic Cell**. 2012.

YOON, S. A., VASQUEZ, J. A., STEFFAN, P. E., SOBEL, J. D., AKINS, R. A. High frequency in vitro reversible *switching* of *Candida lusitanae* clinical isolates from amphotericin B susceptibility to resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, p. 836-845, 1999.

ZHANG, Q.; TAO, L.; GUAN, G.; YUE, H.; LIANG, W.; CAO, C.; DAI, Y.; HUANG, G. Regulation of filamentation in the human fungal pathogen *Candida tropicalis*. **Molecular Microbiology**. V. 99, 2016.

ZORDAM, R. E.; GALGOCZY, D. J.; JOHNSON, A. D. Epigenetic properties of white-opaque switching in *Candida albicans* are based on a self-sustaining transcriptional feedback loop. **Proceedings of the national Academy of Sciences of the United States of America**. v. 103, (34), 2007.

ARTIGO

**AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE LINHAGENS
DERIVADAS DE SWITCHING FENOTÍPICO DE *Candida
tropicalis* E LARVAS DE *Galleria mellonella***

RESUMO

Dentre os fatores de virulência descritos para *Candida tropicalis*, *switching* fenotípico tem se destacado por gerar variabilidade fenotípica dentro de populações. *Galleria mellonella* se apresenta responsiva no estudo de virulência de variantes fenotípicas advindos de *switching* fenotípico, no entanto, pouco se conhece da relação parasito/hospedeiro desse lepdóptero com tais linhagens. O presente trabalho teve como objetivo analisar repostas celulares e humorais de *G. mellonella* à infecção com linhagens fenotípicas (Parental, anel, rugosa, revertente de anel e revertente de rugosa) de *C. tropicalis*, assim como observar a interação diferenciada da levedura com componentes do sistema imune da larva. Em relação à resposta humoral, todos os morfotipos analisados foram capazes de induzir melanização nas larvas de *G. mellonella*. Após 24 horas de infecção, todos os derivantes de *switching* apresentaram maior indução de melanização em relação ao parental. Além da melanização, houve estímulo após uma hora de infecção, da expressão do gene responsável pela síntese de Galiomicina em todos os morfotipos, com exceção do morfotipo Anel. Esse morfotipo apresentou a maior indução desse gene após 4 horas de infecção, mostrando que a resposta da larva é mais tardia para essa característica para esse morfotipo. A expressão de Gallerimicina, outro peptídeo antimicrobiano, se manteve baixa nos dois tempos analisados. Parental, Anel e Rugosa apresentaram diminuição na expressão desse peptídeo, enquanto os respectivos revertentes mantiveram a mesma taxa de expressão das larvas que receberam apenas inóculo com PBS. Além do componente humoral, o componente celular também mostrou respostas diferenciadas frente ao contato com os morfotipos analisados. O morfotipo Anel, mais virulento no modelo invertebrado, induziu maior diminuição no número de hemócitos e maior sobrevivência quando cultivado na presença dessas células, além disso, seu revertente, embora morfologicamente semelhante ao parental, mostrou semelhança nas características analisadas à morfologia mais estruturada, mostrando que embora ocorra o retorno à morfologia parental, morfologias revertentes podem manter fatores de resposta semelhante aos de morfologias mais estruturadas. Com isso o presente trabalho conclui que diferenças na virulência dos morfotipos advindos do evento de *switching* fenotípico, estão ligadas a eventos multifatoriais relacionados não só à capacidade de resposta imune do hospedeiro, mas também à características expressas pelas leveduras que culminam tanto na expressão tardia de padrões de resposta humoral, quanto na capacidade de escape da resposta celular.

Palavras-chave: *Candida tropicalis*, *switching* fenotípico, *Galleria mellonella*, virulência.

INTRODUÇÃO

Quando se estuda virulência, é necessário levar em consideração eventos multifatoriais durante a infecção que englobam características do hospedeiro e do microrganismo em questão (SCORZONI et al., 2015). Segundo a hipótese da rainha vermelha, formulada pelo evolucionista Van Valen em 1973, é necessária uma contínua mudança nos mecanismos de defesa do hospedeiro e de ataque no patógeno para que se sustentem as interações biológicas (VAN VALEN, 1973).

Insetos não possuem resposta imune adaptativa, no entanto, compartilham com mamíferos mecanismos comuns em suas respostas imunes inatas e humorais aos patógenos (LIONAKIS, 2011; MUKHERJEE et al., 2013). Larvas de *Galleria mellonella* possuem uma cutícula que atua como uma barreira física semelhante à pele de mamíferos. Uma vez que essa barreira é rompida, é acionado o mecanismo de resposta humoral, que induz a formação de peptídeos antimicrobianos, que tem como objetivo eliminar ou retardar o crescimento do patógeno em questão. Em paralelo com a resposta humoral, *G. mellonella* induz uma resposta celular a microrganismos invasores através da produção de hemócitos, que atuam similarmente aos fagócitos de mamíferos (BERGIN et al., 2003; KEMP; MASSEY, 2007).

Melanização é uma das primeiras respostas humorais das larvas e ocorre rapidamente após a infecção (TREVIJANO-CONTADOR et al., 2015). O efeito da melanização sobre a eliminação de patógenos ainda é amplamente discutido, sabe-se que a ativação da cascata de pró-fenol oxidase produz substâncias que são tóxicas aos microrganismos e ajudam na fagocitose, conferindo assim, maior possibilidade de sobrevivência para os invertebrados (CERENIUS; SÖDERHÄLL, 2008).

Além da melanização, mudanças no número de hemócitos totais é um importante fator a se observar na resposta imune de larvas de *G. mellonella* quando se estuda virulência microbiana (SCORZONI et al., 2015). Uma resposta imune elevada causada pela exposição a microrganismos é mediada pelo decréscimo do número de hemócitos e elevada expressão de peptídeos antimicrobianos (MOWLDS et al., 2010).

O componente celular, importante fator na resposta imune inata de larvas de *G. mellonella*, é mediado por hemócitos, que estão relacionados com a capacidade

de encapsulação, coagulação e fagocitose. Essas características estão diretamente ligadas à capacidade de sobrevivência das larvas de *G. mellonella* (TOJO et al., 2000; BROWNE et al., 2013; SATYAVATHI et al., 2014).

Além do componente celular, o componente humoral torna-se de grande importância no sistema imune inato de larvas de *G. mellonella*, uma vez que esses animais não apresentam sistema imune adaptativo (LIONAKIS, 2011; MUKHERJEE et al., 2013). Peptídeos de defesa constituem um componente crucial da imunidade inata de animais. A grande maioria desses peptídeos se constitui por pequenas moléculas anfipáticas e catiônicas (SOWA-JASILEK et al., 2014).

Gallerimicina é um peptídeo rico em cisteína que codifica um tipo de defensina, (SCHUMANN et al., 2003). A sequência de aminoácidos desse composto exibe semelhanças com a sequência antifúngica do peptídeo drosomicina de *Drosophila melanogaster* e heliomicina de *Heliiothis virescens*. A proteína recombinante exibe atividade contra fungos entomopatogênicos como *Metarhizium anisopliae*, mas não se mostra eficiente quando testada diretamente contra *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* e *Saccharomyces cerevisiae* (SCHUMANN et al., 2003).

Galiomicina é um peptídeo caracterizado como uma defensina. Como tipicamente acontece em defensinas de insetos, contém seis resíduos de cisteína, que formam 3 resíduos intramoleculares de dissulfureto. A proteína madura contém 43 resíduos e tem um peso molecular de 4,7 kDa. Esse peptídeo apresenta 90,7% de identidade com heliomicina e mostra atividade contra fungos filamentosos e leveduras, mas não apresenta atividade antibacteriana (WOJDA, 2016).

Candida tropicalis compreende uma das cinco principais espécies de leveduras oportunistas do gênero *Candida* que acomete o ser humano e que pode levar a grandes taxas de mortalidade quando presente em indivíduos imunocomprometidos (KONTOYIANNIS et al., 2001; GUDLAUGSSON et al., 2003; COLOMBO et al., 2007).

Dentre os diversos fatores de virulência atribuídos a *C. tropicalis*, o evento de *swtiching* fenotípico confere vantagem adaptativa para esses microrganismos. Uma vez que esse evento gera aleatoriamente mudanças reversíveis na morfologia de colônia, ele pode estar relacionado a possíveis mudanças de perfis transcricionais que estão diretamente associados à virulência do microrganismo

(SLUTSKY et al., 1987; SOLL, 1992; EGGER et al., 2004; MULLER e PRADO, 2008; MORALEZ et al., 2014).

O modelo de *G. mellonella* tem sido aplicado com sucesso para o estudo de virulência de *C. tropicalis* (MESA-ARANGO et al., 2013; MORALEZ et al., 2016). Em particular, o emprego do modelo de *G. mellonella* permitiu a detecção de diferenças na virulência de linhagens isogênicas de *C. tropicalis* originadas do evento de *switching* fenotípico (MORALEZ et al., 2016), no entanto pouco se conhece sobre a relação parasito-hospedeiro dessas linhagens neste modelo.

Dada a relevância da compreensão dos mecanismos de virulência de linhagens derivadas de *switching* fenotípico, e a semelhança das respostas imunes de *G. mellonella* com hospedeiros mamíferos, o presente trabalho tem como objetivo avaliar alguns aspectos da interação entre o hospedeiro invertebrado e *C. tropicalis*, levando em conta possíveis respostas diferenciadas entre as linhagens distintas (morfotipo parental, morfotipos variantes e morfotipos revertentes).

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL BIOLÓGICO

O material biológico utilizado no presente estudo foi derivado do isolado 49.07 de *C. tropicalis*. O isolado apresenta 5 linhagens fenotípicas (Parental – morfologia lisa característica de fungos leveduriformes; Anel – variante fenotípico de morfologia estruturada; Rugosa – variante fenotípico de morfologia estruturada; Revertente de Anel (RA) – morfologia semelhante à parental originada a partir de colônias de morfologia Anel; Revertente de Rugosa (RR) - morfologia semelhante à parental originada a partir de colônias de morfologia Rugosa).

Para a obtenção de colônias individualizadas dos diferentes morfotipos (Parental, variante Anel, variante Rugoso, Revertente de Anel (RA) e Revertente de Rugoso (RR)) do isolado 49.07 de *C. tropicalis*, uma alíquota de 30 µl do estoque, mantido à -20°C em meio YPD suplementado com 20% de glicerol, foi adicionada em meio YPD líquido (1% extrato de leveduras, 2% peptona bacteriológica e 2% glicose anidra) e incubada a 28°C, 180 rpm por 24 horas. Após, o número celular foi contado diretamente em câmara hemocitométrica e ajustou-se sua concentração para 6×10^3 células/ml. 50 µl dessa suspensão foram distribuídos com auxílio de alça

de Drigalski em meio YPD solidificado (1% extrato de leveduras, 2% peptona bacteriológica, 2% glicose anidra e 2% ágar) e, posteriormente, as placas foram incubadas em estufa BOD a 28°C por 96 horas. As linhagens utilizadas fazem parte da coleção de leveduras do Laboratório de Fisiologia e Biologia Molecular de Microorganismos da Universidade Estadual de Londrina.

Em testes realizados *in vivo*, células das colônias foram ressuspensas em tampão PBS (Phosphate-buffered saline: 137 mM NaCl; 2,7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄ e 1,8 mM KH₂PO₄) e contadas em câmara hemocitométrica. Após, a concentração celular foi ajustada para 5x10⁷ células/ml e 10 µl dessa suspensão aplicadas na última pró-leg esquerda de larvas de *G. mellonella* com auxílio de seringa Hamilton. Em testes realizados *in vitro*, células das colônias foram ressuspensas em tampão PBS e ajustadas à mesma concentração dos ensaios *in vivo* no mesmo tampão. A partir da suspensão em PBS, foi realizado o inóculo em meio sintético RPMI 1640 (Sigma-Aldich, USA) para posterior co-cultivo com hemócitos de *G. mellonella*.

MANIPULAÇÃO DAS LARVAS DE GALLERIA MELLONELLA

O fornecimento das Larvas de *G. mellonella* foi realizado pelo Laboratório de Micologia e Métodos Alternativos ao Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina. Larvas no último instar que não apresentaram melanização ou qualquer sinal de contaminação e pesaram de 0,2 a 0,3 gramas foram escolhidas para os ensaios.

Para retirada de hemolinfa, dois coletores foram necessários. O primeiro coletor posicionou a larva em posição ventral e exerceu uma leve pressão nas extremidades do animal. O segundo coletor realizou um pequeno furo na região mediana do corpo, com auxílio de uma agulha gengival (0,3 X 25 mm, C-K Dental Ind. CO, Ltd) e captou a hemolinfa com auxílio de micropipeta. A hemolinfa foi transferida para microtubos estéreis com 1 ml de tampão IPS (Insect physiological saline – 150 mM NaCl; 5 mM KCl; 10 mM Tris HCl; 10 mM EDTA; 30 mM Citrato de Sódio) pH 6,9, suplementado com 10 mM de N-ethylmaleimide (anticoagulante), e os tubos foram mantidos em gelo, para evitar coagulação e melanização da hemolinfa.

ENSAIO IN VIVO DE MELANIZAÇÃO DA HEMOLINFA

Os ensaios de quantificação da melanização foram realizados segundo Maurer et al. (2015) com modificações. Larvas de *G. mellonella* foram infectadas com 5×10^5 células dos diferentes morfotipos do isolado 49.07 de *C. tropicalis* e incubadas a 37°C. A hemolinfa foi coletada 2 e 24 horas pós-infecção. A hemolinfa foi diluída 1:10 em tampão IPS suplementado com anticoagulante e 100 µl dessa solução foram aplicados em placas de microdiluição de 96 poços. As análises de melanização foram realizadas numa densidade óptica de 405 nm. A densidade óptica de larvas infectadas foi normalizada com os controles que receberam apenas PBS.

ANÁLISE DE DENSIDADE DE HEMÓCITOS PÓS-INFECÇÃO

Os ensaios de quantificação da densidade de hemócitos pós-infecção com variantes fenotípicos do isolado 49.07 de *C. tropicalis* foram realizados segundo Scorzoni et al. (2015) com modificações. Larvas de *G. mellonella* foram infectadas com 5×10^5 células dos diferentes variantes fenotípicos e incubadas a 37°C. Após, a hemolinfa foi coletada 2, 4 e 24 horas pós-infecção e diluída 1:10 em tampão IPS suplementado com anticoagulante. As amostras foram contadas diretamente em câmara hemocitométrica. A contagem de hemócitos foi realizada em triplicata de três larvas em três experimentos independentes.

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE CANDIDACIDA DE HEMÓCITOS DE GALLERIA MELLONELLA IN VITRO

Os ensaios de carga fúngica foram realizados a fim de se observar possível efeito candidacida de hemócitos de *G. mellonella* sobre linhagens fenotípicas do isolado 49.07 de *C. tropicalis*. A hemolinfa de 50 larvas foi retirada em tampão IPS acrescido de anticoagulante. Após, a suspensão foi centrifugada a 2000 RPM por 5 min a 4°C. O sobrenadante foi retirado, acrescentou-se tampão IPS sem anticoagulante e o número de células foi estimado por contagem direta em câmara hemocitométrica. A concentração de hemócitos foi ajustada para 1×10^7 células por ml e 100 µl dessa suspensão foram adicionados à microtubos contendo 900 µl de meio RPMI 1640 suplementado com 1% de ampicilina. Cada tubo recebeu uma concentração de 5×10^6 células dos diferentes morfotipos do isolado 49.07. Os tubos foram incubados a 37°C por 4 horas. As suspensões foram então tratadas com 1%

de Triton x-100 para lise dos hemócitos. A suspensão foi diluída 100 vezes e 50 µl foram plaqueados com auxílio de alça de Drigalski em meio YPD solidificado. Após 48 horas, o número de unidades formadoras de colônia (UFC) foi contado diretamente.

Adicionalmente, 3 µl da suspensão de co-cultivo e diluições seriadas da mesma, foram inoculados em meio YPD solidificado e incubados por 48 horas. As placas foram fotografadas para observação do crescimento fúngico.

ENSAIO FAGOCÍTICO IN VITRO

Os ensaios de mensuração da fagocitose *in vitro* foram realizados segundo Tomiotto-Pellissier et al. (2016) com modificações. Lamínulas de 13 mm de diâmetro foram previamente tratadas com ácido acético e colocadas em placas de 24 poços. Foram adicionados aos poços 1 ml de RPMI 1640 suplementado com 1% de ampicilina e 10% de soro fetal bovino com uma concentração de 5×10^5 hemócitos/ml. Incubou-se a placa por 1h a 37°C em 5% de CO₂ para adesão das células. As células não aderidas foram removidas por 2 lavagens com tampão IPS a 37°C. Adicionou-se então 1 ml de RPMI 1640 contendo 1×10^6 células dos diferentes morfotipos de *C. tropicalis* aos poços. Incubou-se por duas horas à 37°C em 5% de CO₂. Após incubação, as lamínulas foram lavadas duas vezes com tampão IPS e fixadas por 20 minutos com metanol. Na sequência as células foram coradas com corante de May Grünwald por 15 minutos, lavadas com tampão de Sorenson (0,133M Na₂HPO₄, 0,133M KH₂PO₄, pH 7.2) e imergidas em corante de Giemsa por 15 minutos. Por fim as células foram lavadas duas vezes com tampão de Sorenson para remover o excesso de corante. As lamínulas foram secas em temperatura ambiente por 24 horas e montadas com bálsamo do Canadá em lâminas de vidro.

Foram contados 20 campos de cada lamínula em duplicata de duas lâminas independentes. A porcentagem de hemócitos contendo células fúngicas foi dada pela razão entre células contendo leveduras em seu interior pelo número total de hemócitos multiplicados por 100.

ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA PÓS-INFECÇÃO DE LARVAS DE G. MELLONELLA COM LINHAGENS DE C. TROPICALIS

Larvas de *G. mellonella* foram infectadas com 5×10^5 células dos diferentes morfotipos do isolado 49.07 e incubadas por 1 e 4 horas a 37°C. Decorrido o tempo de incubação as larvas foram maceradas em nitrogênio líquido em cadinho de porcelana. O macerado foi transferido para microtubos contendo 700 µl de Trizol, e procedeu-se a extração de RNA segundo kit PureLink[®] RNA Mini (Thermo Fisher Scientific) conforme recomendações do fabricante. Após extração, a reação de transcriptase reversa foi realizada com auxílio de kit de RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). A mistura foi incubada a 42°C durante 60 min. Reações de síntese foram realizadas no sistema GeneAmp[®] PCR (Eppendorf, Gradient Mastercycler). O cDNA formado foi armazenado em freezer a -20°C.

Os oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos genes de escolha são mostrados na **Tabela 1**. As condições de ciclagem consistiram em 2 min à 50°C, 10 min 95°C e 40 ciclos a 51°C e 60 s a 60°C. Cada amostra foi analisada em duplicata e PCR em tempo real foi realizada em StepOnePlus[™] Real-Time PCR System (Applied Biosystems[®]). A reação foi executada utilizando Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR Supermix-UDG (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) com volume final de 20 µl.

Os dados de expressão gênica empregando a metodologia de PCR quantitativa (RT-qPCR) foram normalizados pela expressão do gene constitutivo da β -Actina (ACT). Uma vez os dados normalizados foi realizada análise dos níveis de expressão gênica relativa, que se deu pela equação $2^{-(\Delta-\Delta_{ct})}$. Onde o primeiro Δ trata da condição teste normalizada e o segundo trata do controle, também normalizado. Para reações de expressão de peptídeos de defesa de *G. mellonella* o controle foram larvas que receberam inóculo de PBS. Para genes relativos à características da levedura, o controle foram larvas que receberam inóculo da linhagem parental (morfotipo Liso).

MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Para observação do processo fagocítico *in vitro* em microscópio eletrônico de varredura, realizou-se o co-cultivo conforme descrito no item “Ensaio fagocítico *in vitro*”. Após, as lamínulas foram fixadas por imersão em 1 ml de fixador (2% glutaraldeído (Eletron Microscopy Sciences, Washington, USA) em 0,1M de tampão

cacodilato de sódio (Eletron Microscopy Sciences, Washington, USA), pH 7,2 por 12 horas. Após fixação, o material foi lavado duas vezes com tampão cacodilato 0,1M e pós-fixado por 1 hora com 1% de tetróxido de ósmio (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA) diluído em 0,1M de tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2. Posteriormente, lavou-se duas vezes com tampão cacodilato 0,1M e procedeu-se o passo de desidratação. As amostras foram imersas em concentrações crescentes de etanol (30, 50, 70, 90, 100°GL) por 10 minutos cada. Após, as lamínulas foram secas ao ponto crítico em CO₂ (BALTEC CPD 030 Critical Point Dryer), e montadas em stubs. Com uma fita adesiva, fez-se uma leve pressão sobre as amostras com intuito de retirar a parte superior das células de hemócitos. Após, as amostras foram recobertas com ouro (BALTEC SDC 050 Sputter Coater) e procedeu-se a observação em microscópio eletrônico de varredura (modelo Quanta 200, FEI Company, Netherlands).

ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Análises comparativas dos dados obtidos foram realizadas com auxílio do software GraphPad Prism 5. Foi realizado teste de comparações múltiplas ANOVA com pós-teste T de Tukey para todos os experimentos realizados. Os testes foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

Em análises de expressão gênica relativa, valores inferiores a 1 indicam diminuição da expressão do gene ou fator de transcrição abordado. Valores superiores a 1 indicam aumento na expressão relativa desses fatores.

RESULTADOS

MELANIZAÇÃO EM LARVAS DE G. MELLONELLA PÓS-INFECÇÃO COM LINHAGENS DO ISOLADO 49.07 DE C. TROPICALIS DERIVADAS DE SWITCHING FENOTÍPICO.

A melanização da hemolinfa pós-infecção com 5×10^5 células/larva com variantes morfológicas (Parental, Anel, Rugoso, Revertente de Anel e Revertente de Rugoso) foi realizada em dois tempos distintos (2 e 24 horas) (Figura 1). Após 2 horas de infecção, não foi observada diferença significativa nos níveis de melanização em resposta as linhagens derivadas de *switching* (variantes e revertentes), comparativamente ao observado para o morfotipo parental, embora os morfotipos Anel e Revertente de Rugoso tenham induzido melanização quando

comparados ao controle (PBS). Já após 24 horas de incubação os níveis de melanização da hemolinfa de larvas infectadas com as linhagens de *switching* foram significativamente superiores ($p < 0,05$) a melanização observada em larvas infectadas com a linhagem parental (morfotipo liso). Embora a melanização em resposta ao Revertente de Rugoso (RR) tenha sido significativamente inferior ao observado em resposta ao variante Rugoso, o nível de melanização observado foi superior ao observado em resposta ao parental liso, apesar deste revertente apresentar morfologia padrão liso. A melanização em resposta ao Revertente de Anel (RA) foi igual à do seu respectivo variante Anel ($p < 0,05$), apesar de também apresentar morfologia padrão liso (Figura 1).

EXPRESSÃO DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS APÓS INFECÇÃO DE LARVAS DE G. MELLONELLA COM LINHAGENS ADVINDAS DE SWITCHING FENOTÍPICO DE C. TROPICALIS.

A análise da expressão de Galiomicina e Gallerimicina, peptídeos associados com a resposta imune de *G. mellonella*, é importante para melhor conhecimento dos tempos de resposta, e vias que o inseto dispõe de resposta humoral pós-infecção com *C. tropicalis*. A expressão gênica dos genes que codificam Galiomicina e Gallerimicina foi realizada após uma e quatro horas de infecção com os diferentes morfotipos do isolado 49.07 de *C. tropicalis* (Figura 2). Após uma hora de infecção, a indução na expressão de Galiomicina ocorreu quando as larvas foram infectadas por todos os morfotipos, com exceção do variante Anel. Para estes morfotipos (variante rugoso e revertentes de anel e de rugoso) a indução na expressão não diferiu da expressão observada para larvas infectadas com a linhagem parental. No entanto, a expressão de Galiomicina pós-infecção com o variante Anel (que não apresentou aumento de expressão) diferiu do parental (liso) e de seu revertente ($p < 0,05$). Com 4 horas de infecção, larvas infectadas com o morfotipo Anel apresentaram maior indução da expressão de Galiomicina, sendo maior que a observada para larvas infectadas pela linhagem parental e seu revertente (RA). Já para Gallerimicina a indução, após uma hora de infecção, foi observada em larvas infectadas somente pelos morfotipos revertentes (RA e RR), sendo maior comparativamente a expressão observada em larvas infectadas pelo parental. Após 4 horas de infecção não houve diferenças na expressão de Gallerimicina entre os morfotipos analisados ($p < 0,05$).

POTENCIAL DE RESPOSTA FAGOCITÁRIA DE HEMÓCITOS DE G. MELLONELLA EM LINHAGENS DE C. TROPICALIS.

Os ensaios de fagocitose *in vitro* foram realizados com objetivo de observar possíveis diferenças nos níveis fagocitários entre os variantes morfológicos do isolado 49.07 de *C. tropicalis*. (Figura 3). Hemócitos de *G. mellonella* foram capazes de fagocitar todos os morfotipos estudados. Os morfotipos Anel e Revertente de Anel (RA) foram fagocitados em maior número em relação a fagocitose observada para a linhagem parental. Diferentemente, o morfotipo Rugoso apresentou menores taxas de fagocitose. Destaca-se o fato de que o Revertente de Anel (RA), embora tenha apresentado morfologia igual ao parental, manteve porcentagens de fagocitose iguais ao do Anel, enquanto o Revertente de Rugoso (RR), ao retornar à morfologia parental, apresentou fagocitose semelhante ao do parental ($p < 0,05$). Na micrografia eletrônica de varredura (Figura 4) pode-se observar diferentes fases da interação fagocitária entre células fúngicas de *C. tropicalis* e hemócitos de *G. mellonella*.

DENSIDADE DE HEMÓCITOS DE LARVAS DE G. MELLONELLA PÓS-INFECÇÃO COM LINHAGENS DO ISOLADO 49.07 DE C. TROPICALIS DERIVADAS DE SWITCHING FENOTÍPICO.

Os ensaios de densidade de hemócitos foram realizados em tempos de 2, 4 e 24 horas pós-infecção (Figura 5). Observou-se redução significativa do número de hemócitos em relação ao controle (PBS) de todos os morfotipos analisados nos três tempos ($p < 0,05$). Após 2 horas de infecção a hemolinfa de larvas infectadas com a linhagem Revertente de Rugosa apresentou densidade de hemócitos significativamente superior da observada para larvas infectadas com a linhagem parental e variante Rugoso ($p < 0,05$), sugerindo menor resposta inata frente a linhagem revertente de rugosa em tempos iniciais de infecção.

Em 24 horas pós-infecção o número de hemócitos foi significativamente inferior em larvas infectadas com o morfotipo Anel comparativamente ao observado para larvas infectadas com a linhagem parental (morfologia lisa) ($p < 0,05$), sugerindo resposta mais acentuada frente a esta linhagem. Interessante destacar que a densidade de hemócitos em larvas infectadas com a linhagem Revertente de Anel (RA), que apresenta padrão liso de colônia não diferiu do observado para larvas infectadas com a linhagem Parental (lisa) em nenhum dos tempos de infecção avaliados ($p < 0,05$), indicando que a morfologia da colônia pode estar diretamente

associada com a redução de hemócitos presentes na hemolinfa de larvas de *G. mellonella* pós-infecção e que esta resposta é morfotipo-dependente, uma vez que o mesmo não foi observado para o variante rugoso e seu respectivo revertente (RR).

SOBREVIVÊNCIA DE MORFOTIPOS DE C. TROPICALIS DERIVADOS DE SWITCHING FENOTÍPICO CULTIVADOS NA PRESENÇA DE HEMÓCITOS DE G. MELLONELLA.

A carga fúngica de morfotipos do isolado 49.07 após co-cultivo com hemócitos *in vitro* foi avaliada para determinar a atividade candidacida de hemócitos sobre as células fúngicas. Para tal, 5×10^6 células/ml de leveduras foram co-cultivadas com 1×10^6 células/ml de hemócitos por 4 horas, seguido de plaqueamento para determinação de unidades formadoras de colônia. O variante Rugoso e o Revertente de Anel não apresentaram decréscimo no número de células fúngicas viáveis em relação ao inóculo original ($p < 0,05$). Já, a linhagem Parental (liso) e o variante Anel e Revertente de Rugoso apresentaram redução no número de células viáveis após incubação na presença de hemócitos ($p < 0,05$), sugerindo ação candidacida diferenciada entre os morfotipos testados.

Como mostrado na Figura 6, os variantes Anel e Rugoso, e o Revertente de Anel apresentaram carga fúngica superior à observada para a linhagem parental sugerindo maior sobrevivência destes após exposição aos hemócitos de *G. mellonella*. Por outro lado, o Revertente de Rugoso apresentou redução significativa no número de células viáveis em relação ao parental ($p < 0,05$), apesar de apresentar morfologia padrão liso semelhante ao parental. Quando comparados às suas morfologias de origem, Revertente de Anel apresentou maior contagem de UFC que Anel enquanto Revertente de Rugosa diminuiu drasticamente esse número ($p < 0,05$).

ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE VARIANTES MORFOLÓGICAS DE *C. TROPICALIS* PÓS-INFECÇÃO EM *G. MELLONELLA*.

A expressão diferencial dos genes de *C. tropicalis* durante a infecção em *G. mellonella* foi realizada em uma e quatro horas após infecção com 5×10^5 células/larva (Figura 7).

Efg1, fator transcricional envolvido em transições de morfologia de colônias por mediar *switching* fenotípico e formação de biofilme em espécies do gênero *Candida* (CONNOLLY et al., 2013; MANCERA et al., 2015), apresentou diferenças na expressão gênica após 4 horas de infecção ($p < 0,05$). Todos os morfotipos apresentaram expressão de *Efg1* superior à observada pelo parental. Para ambos os revertentes (RA e RR) a expressão foi superior comparativamente a de seus variantes de origem (Anel e Rugoso). Os dados demonstram que embora esses morfotipos tenham retornado à morfologia parental, os níveis de expressão gênica de *Efg1* não retornaram a níveis de expressão do parental ($p < 0,05$).

O gene *Hwp1* codifica uma adesina de superfície celular requerida para formação de biofilme *in vivo* em *C. albicans*; essa proteína promove a ligação das células fúngicas na superfície mucosa do hospedeiro. *Hwp1* também está associada à adesinas específicas da fase hifal de espécies do gênero *Candida* (STAAB et al., 1999; NOBILE et al., 2008). Após uma hora de infecção, os variantes fenotípicos apresentaram menor expressão de *Hwp1* em relação à β -actina, além disso, todos os morfotipos apresentaram redução na expressão desse gene quando comparados com a expressão do parental Liso. Após 4 horas, a expressão de *Hwp1* pelos variantes Anel e Rugoso não diferiu da expressão do seu parental, enquanto o revertente de Anel manteve baixa expressão. O Revertente de Rugoso seguiu o perfil transcricional do parental Liso, diferindo da expressão observada para o variante rugoso (seu morfotipo de origem) ($p < 0,05$).

O fator transcricional *Bcr1* está diretamente relacionado com o potencial de filamentação em *C. tropicalis*. O aumento na expressão de *Bcr1* está associado a aumento na diferenciação em hifas nessa espécie (ZHANG et al., 2016). Após uma hora de infecção, os variantes Anel e Rugoso apresentaram expressão inferior ao do parental Liso. A expressão de *Bcr1* pelos Revertentes não diferiu da expressão observada para o parental Liso. O Revertente de Anel apresentou maiores níveis de expressão de *Bcr1* comparativamente ao seu respectivo variante Anel ($p < 0,05$). Após quatro horas de infecção todos os morfotipos apresentaram aumento na

expressão de *Bcr1* em relação à β -actina. O Revertente de Rugoso apresentou superexpressão de *Bcr1*, sendo superior a observada para o parental liso e seu respectivo revertente (Rugoso) ($p < 0,05$).

COMPARAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS ABORDADAS NO PRESENTE ESTUDO

O presente trabalho aponta diversas características referentes à interação entre o hospedeiro *G. mellonella* e linhagens fenotípicas de *C. tropicalis*. Diferenças entre morfotipos do isolado 49.07 em relação à esses atributos podem ser observadas na Tabela 2, onde cores mais claras apontam diminuição da expressão da característica e tons mais escuros indicam aumento na expressão dos mesmos. Os variantes morfológicos foram comparados ao parental liso.

DISCUSSÃO

Embora *G. mellonella* não possua sistema imune adaptativo, o sistema imune desses animais mostra grande semelhança, tanto estrutural quanto funcional com o sistema imune inato de vertebrados. Por causa dessas similaridades, essas larvas são utilizadas no estudo da virulência de patógenos microbianos de mamíferos (LIONAKIS, 2011; MUKHERJEE et al., 2013).

A resposta imune de *G. mellonella* consiste em dois componentes, que estão interconectados. A resposta humoral e a resposta celular. A resposta celular é mediada por hemócitos, que estão diretamente envolvidos na fagocitose, encapsulação e coagulação (BROWNE et al., 2013; SATYACATHI et al., 2014). A resposta humoral envolve moléculas efetoras solúveis como peptídeos antimicrobianos, e uma variedade de moléculas segregadas com propriedades antimicrobianas, incluindo fenoloxidase, que defende contra patógenos por catalisar a formação de melanina e intermediários de melanina que são tóxicos aos microrganismos, esses componentes tem como objetivo imobilizar ou matar os patógenos microbianos (ELEFATHERIANOS; REVENIS, 2011). Os componentes humoral e celular também podem ter ação conjunta, a exemplo de quando a melanização ocorre dentro dos nódulos (EISENMAN et al., 2014).

Linhagens fenotípicas do isolado 49.07 de *C. tropicalis* apresentam virulência diferenciada em larvas de *G. mellonella* (MORALEZ et al., 2016). No entanto,

mecanismos de virulência, ou respostas associadas à interação parasito-hospedeiro desses variantes são pouco conhecidos.

O presente estudo mostra que linhagens fenotípicas de um mesmo isolado de *C. tropicalis* podem apresentar perfis de virulência distintos, assim como induzir respostas diferenciadas no hospedeiro *G. mellonella*. Essas características podem estar diretamente relacionadas com a capacidade do inseto de sobreviver à infecção com esses morfotipos, ou no sucesso da levedura no escape do sistema imune do hospedeiro.

A avaliação de algumas características humorais da resposta imune de larvas de *G. mellonella* apontam que após 24 horas de infecção todos os variantes morfológicos induziram maior melanização em relação a linhagem parental (Figura 1). Após reconhecimento e fagocitose do patógeno, a melanina é depositada ao redor do microrganismo na hemolinfa, o que facilita a eliminação do mesmo (KAVANAGH; REEVES, 2004). Esse composto atua na prevenção ou retardamento do crescimento microbiano (WAND et al., 2013). Uma explicação potencial para a diminuição da virulência das células melanizadas reside na resposta imunitária das larvas. Como outros invertebrados, *G. mellonella* tem um sistema de fenoxidase que defende contra microrganismos usando melanina e intermediários de melanina. Fenoxidase é encontrada em uma forma de proenzima em insetos. Ela é ativada quando componentes microbianos (como β -1,3-glucano ou peptidoglicano) são reconhecidos e ligados por proteínas que iniciam uma cascata de protease serina que resulta na clivagem da profenoxidase (CERENIUS e SÖDERHÄLL, 2008). A fenoxidase então catalisa a formação de melanina. A utilização das vias de fenoxidase e produção de melanina são semelhantes ao sistema complemento de mamíferos, mostrando que o modelo de estudo para virulência de *G. mellonella* é eficiente para se observar essas características (CERENIUS e SÖDERHÄLL, 2004; GONZALEZ-SANTOYO; CORDOBA-AGUILAR, 2012).

No presente estudo, embora Revertente de Rugoso (RR) tenha induzido menor melanização nas larvas quando comparada à do variante Rugoso, o Revertente de Anel manteve esse parâmetro igual ao do variante Anel, mostrando que embora a morfologia de colônia tenha retornado à parental, algumas características mantêm padrões de resposta semelhante às daquelas das morfologias mais estruturadas. Essas diferenças podem se dar por possíveis diferenças na parede celular, Uma vez que esta é antigênica e o primeiro contato com células de

defesa, mudanças nessa estrutura podem alterar padrões de reconhecimento e consequente resposta por parte do hospedeiro. Dados da literatura apontam que *C. albicans* é capaz de induzir melanização em larvas de *G. mellonella* após uma hora de infecção (TREVIJANO-CONTADOR et al., 2015) e após infecção com *Cryptococcus neoformans* há um acúmulo de peptídeos antimicrobianos na hemolinfa, mas essa característica não está relacionada à melanização de *G. mellonella* (TREVIJANO-CONTADOR et al., 2015).

Além de melanização, insetos produzem vários peptídeos antimicrobianos em resposta a infecções microbianas (BULET et al., 1999). Após infecção, larvas de *G. mellonella* aumentam a transcrição de peptídeos de defesa como Cecropina, Galiomicina e Gallerimicina (WU, XU e YI, 2016). A maioria desses peptídeos são sintetizados pelo corpo gorduroso, que é um dos principais responsáveis pela resposta imune. Eles são secretados na hemolinfa e agem na remoção de microrganismos numa fase precoce da resposta imunitária. Observa-se também a secreção de alguns peptídeos pela porção mediana do intestino e pela região epitelial de *G. mellonella* (TZOU et al., 2000).

A análise da expressão gênica de dois desses peptídeos, Galiomicina e Gallerimicina, mostra que após uma hora de infecção todas as linhagens observadas, com exceção de Anel, induziram a expressão de Galiomicina (Figura 2). Somente após 4 horas de infecção, larvas que receberam inóculo com o morfotipo Anel apresentaram alta expressão do gene que codifica esse peptídeo, mostrando resposta mais tardia do hospedeiro para esse variante. Essa característica pode estar associada à alta virulência de Anel em larvas de *G. mellonella*. Além disso, morfologias menos estruturadas (Lisa, Revertente de Anel e Revertente de Rugosa), embora capazes de induzir expressão, não diferiram entre si, mostrando que o reconhecimento pelo sistema imune dessas linhagens pode estar relacionado às características celulares compartilhadas por elas. Em relação à expressão de gallerimicina, peptídeo antimicrobiano capaz de afetar fungos filamentosos e leveduras (SCHUHMANN et al., 2003), após uma hora de infecção com os morfotipos parental, Anel e Rugoso foi observada baixa expressão em relação à β -actina, enquanto que para larvas infectadas pelo Revertente de Anel e Revertente de Rugosa foi observado aumento na expressão. Gallerimicina causa despolarização na membrana plasmática dos microrganismos e mesmo não apresentando letalidade, pode obter um efeito sinérgico com outros peptídeos e

componentes do sistema imune (MOGHADDAM et al., 2016). A falta do estímulo desse peptídeo, que está ligado com a aptidão da resposta imune em larvas de *G. mellonella* (MOGHADDAM et al., 2016), pode estar relacionada com o sucesso de todas as linhagens de *C. tropicalis* na infecção.

Além do componente humoral, o presente trabalho também analisou alguns parâmetros de resposta celular à linhagens fenotípicas de *C. tropicalis*. A densidade de hemócitos, carga microbiana, e indução de mudanças morfológicas são parâmetros que podem ser utilizados para se observar a virulência de patógenos fúngicos em *G. mellonella* (BERGIN, BRENNAN e KAVANAGH, 2003; FUCHS, O'BRIEN e KHOURY, 2010). Após contaminação com 5×10^5 células dos diferentes morfotipos derivados de *swtiching* fenotípico do isolado 49.07 de *C. tropicalis* observou-se redução no número de hemócitos presentes na hemolinfa de *G. mellonella* (Figura 5). A pós-infecção por 24 horas com o variante Anel resultou em redução significativa na densidade de hemócitos. Tal fato pode ter sido um dos fatores associados à capacidade de virulência aumentada deste morfotipo, comparativamente ao seu respectivo parental em larvas de *G. mellonella* (MORALEZ et al., 2016).

Segundo dados da literatura, a concentração de hemócitos pode estar diretamente relacionada com a sobrevivência, uma vez que larvas que apresentam maior concentração de hemócitos na hemolinfa apresentam maior taxa de sobrevivência durante a infecção com patógenos microbianos (MOWLDS e KAVANAGH, 2008).

Apesar de ocorrer uma diminuição no número de hemócitos após infecção, hemócitos de *G. mellonella* apresentaram capacidade de fagocitar todas as linhagens de *C. tropicalis* (Figura 3). Morfologias Anel e Revertente de Anel (RA), embora mais virulentas em larvas de *G. mellonella* em relação ao parental liso (MORALEZ et al., 2016) foram as que apresentaram maiores taxas de fagocitose. Segundo a literatura, existe semelhança entre as taxas de fagocitose *in vitro* de células opsonizadas de *C. albicans* por neutrófilos e hemócitos. Da mesma forma que ocorre para os neutrófilos, a fagocitose por hemócitos também estimula a via respiratória, envolvendo atividade de NADPH oxidase e produção de superóxido para eliminar eficientemente microrganismos (BERGIN et al., 2005). Outras semelhanças entre fagocitose mediada por neutrófilos e hemócitos foram demonstradas, como a redução no número de hemócitos leva a um aumento a

susceptibilidade das larvas a infecções microbianas, assim como acontece em mamíferos com baixa densidade de neutrófilos (SCORZONI et al., 2015).

A fagocitose depende do reconhecimento do alvo pela célula de defesa, o que por sua vez ativa respostas que culminam com a internalização do mesmo. Alguns patógenos são reconhecidos pelo padrão humoral, ou seja, moléculas de reconhecimento que se ligam ao alvo e aumentam seu reconhecimento por outros receptores na superfície dos hemócitos. Alternativamente, os agentes patogênicos podem ser reconhecidos diretamente pelo hemócito por receptores de superfície, como calreticulina ou apolipoproteína. O processo fagocítico em si é geralmente não destrutivo para hemócitos, ao contrário da melanização, coagulação e encapsulamento, que são eventos terminais na vida útil dessa célula (OLIVER et al., 2011).

A capacidade do hemócito de internalizar patógenos, não garante o sucesso da eliminação desse agente pela célula de defesa. Escape do sistema imune é imprescindível para expressão de virulência de fungos patogênicos como *C. tropicalis*. A capacidade de diferenciação de blastoconídios em pseudohifas e hifas é um dos fatores importantes para a evasão do sistema imune, uma vez que formas filamentosas podem causar a lise de fagócitos, causando uma diminuição da eficiência da resposta inata pela diminuição no número de células fagocíticas (LORENZ, BENDER e FINK, 2004; SUDBERY, GOW e BERMAN, 2004; McKENZIE et al., 2010; MESA-ARANGO et al., 2013). Na micrografia eletrônica de varredura, pode-se observar a interação entre formas filamentosas e hemócitos de *G. mellonella*. Ao perfurar a célula de defesa, hifas podem inutilizar o hemócito e dificultar a fagocitose, auxiliando em processos de virulência.

No presente estudo, a expressão de fatores de transcrição relacionados à filamentação como EFG1 e BCR1 foi aumentada após infecção de 4 horas com as linhagens de *C. tropicalis* (Figura 7), o que pode estar associado ao sucesso dos variantes fenotípicos na infecção do hospedeiro. Além disso, morfologias revertentes apresentaram expressão semelhante às aquelas mais estruturadas, apontando que uma vez que essas leveduras são capazes de promover mudanças morfológicas em sua colônia, nem todas as características retornam ao estado parental, interferindo potencialmente na virulência dessas linhagens.

O variante Anel apresenta capacidade pronunciada de formação de formas filamentosas (MORALEZ et al., 2014), e embora não tenha causado declínio do

número de hemócitos em relação ao parental Liso nas primeiras horas de infecção, se mostrou muito eficiente nessa característica num tempo mais prolongado (24h) (Figura 5). Além disso, para linhagens que apresentam colônias de morfologia lisa (parental Liso, Revertente de Anel e Revertente de Rugoso) e que são constituídas majoritariamente por células blastoconidiais e pouca diferenciação em formas filamentosas (MOLAREZ et al., 2014) não foi observada indução diferenciada na redução do número de hemócitos presentes na hemolinfa, sugerindo que estas linhagens apresentam capacidade semelhante de escape da reposta celular de *G. mellonella*. Embora Anel tenha induzido um maior declínio no número total de hemócitos presentes na hemolinfa, o Variante Rugoso, que também apresenta morfologia estruturada, não seguiu esse padrão. Respostas diferenciadas de variantes estruturadas sugerem que a indução do declínio no número de hemócitos pode ser morfotipo dependente, e essas características podem estar relacionadas com a virulência diferenciada dessas linhagens fenotípicas.

Revertente de anel (RR), embora expresse colônias de padrão liso apresentou baixa redução no número de células viáveis pós co-cultivo com hemócitos, não apresentando queda significativa na quantidade de UFC (Figura 6). O variante Anel, mesmo apresentando queda na quantidade de células viáveis após co-cultivo, ainda se mostrou mais resistente que o respectivo parental Liso. Revertente de Anel apresentou maiores números de UFC quando comparado ao parental, enquanto Revertente de Rugosa apresentou declínio nesse número. Esses dados apontam que a capacidade candidada dos hemócitos de *G. mellonella* variam de acordo com o morfotipo alvo dessas células. Esses morfotipos apresentam potenciais de virulência diferentes nas larvas, mostrando que a morfologia de colônia não esta diretamente relacionada com essa característica (MORALEZ et al., 2016).

Além da formação de formas filamentosas, diversos são os fatores de virulência descritos para *C. tropicalis* (FRANÇA et al., 2011; SILVA et al., 2012; MORALEZ et al., 2014). Análise da expressão de *HWP1*, relacionado a adesão em células epiteliais e componentes de parede celular, aponta que assim como os fatores transcricionais houve expressão aumentada após 4 horas pós-infecção (Figura 7). Mesmo com a expressão tardia, esse fator pode estar relacionado com a virulência das linhagens fenotípicas abordadas no presente estudo. Embora a expressão de fatores de virulência envolva uma gama de genes e fatores

transcricionais, a investigação de alguns desses fatores pode levar ao melhor conhecimento de vias moleculares, que por sua vez podem elucidar mecanismos de virulência relacionados à mudanças morfológicas macroscópicas.

ILUSTRAÇÕES

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados para a análise de expressão gênica empregando qPCR.

Gene/proteína	Primer		Referência
	Direção	Sequência (5' → 3')	
<i>Candida tropicalis</i>			
ACT1	Forward	GACCCATCCCCCTTTTTATG	Este estudo
	Reverse	TCGATCTTAATCGGGAGGTG	Este estudo
EFG1	Forward	TTCAACTGCTGGACAACCAC	Este estudo
	Reverse	TACCAGGAGGTTGGAATTGG	Este estudo
HWP1	Forward	TTCCAACCACTGCATCTGAG	Este estudo
	Reverse	TGAGCTGTTGGAGCATGAAG	Este estudo
BCR1	Forward	GCCATATGAAACCCCAGTTG	Este estudo
	Reverse	AGGTTTGCCAACTGTTCTG	Este estudo
<i>Galleria mellonella</i>			
β-actina	Forward	GGGACGATATGGAGAAGATCTG	Rajendran et al. 2015
	Reverse	CACGCTCTGTGAGGATCTTC	Rajendran et al. 2015
Galiomicina	Forward	CCTCTGATTGCAATGCTGAGTG	Rajendran et al. 2015
	Reverse	GCTGCCAAGTTAGTCAACAGG	Rajendran et al. 2015
Gallerimicina	Forward	GAAGATCGCTTTCATAGTCGC	Rajendran et al. 2015
	Reverse	TACTCCTGCAGTTAGCAATGC	Rajendran et al. 2015

Tabela 2: Comparação das características das interações entre *Galleria mellonella* e as linhagens fenotípicas de *Candida tropicalis*. Cores mais escuras indicam maior expressão dessas características, cores mais claras indicam menor demonstração das mesmas em relação ao Parental Liso.

	Lisa	Anel	Revertente de Anel (RA)	Rugosa	Revertente de Rugosa (RR)
Melanização (%)	Medium Gray	Dark Gray	Dark Gray	Dark Gray	Dark Gray
Densidade de hemócitos	Medium Gray	Light Gray	Medium Gray	Medium Gray	Dark Gray
Carga fúngica	Medium Gray	Dark Gray	Dark Gray	Dark Gray	Light Gray
Fagocitose (%)	Medium Gray	Dark Gray	Dark Gray	Light Gray	Medium Gray

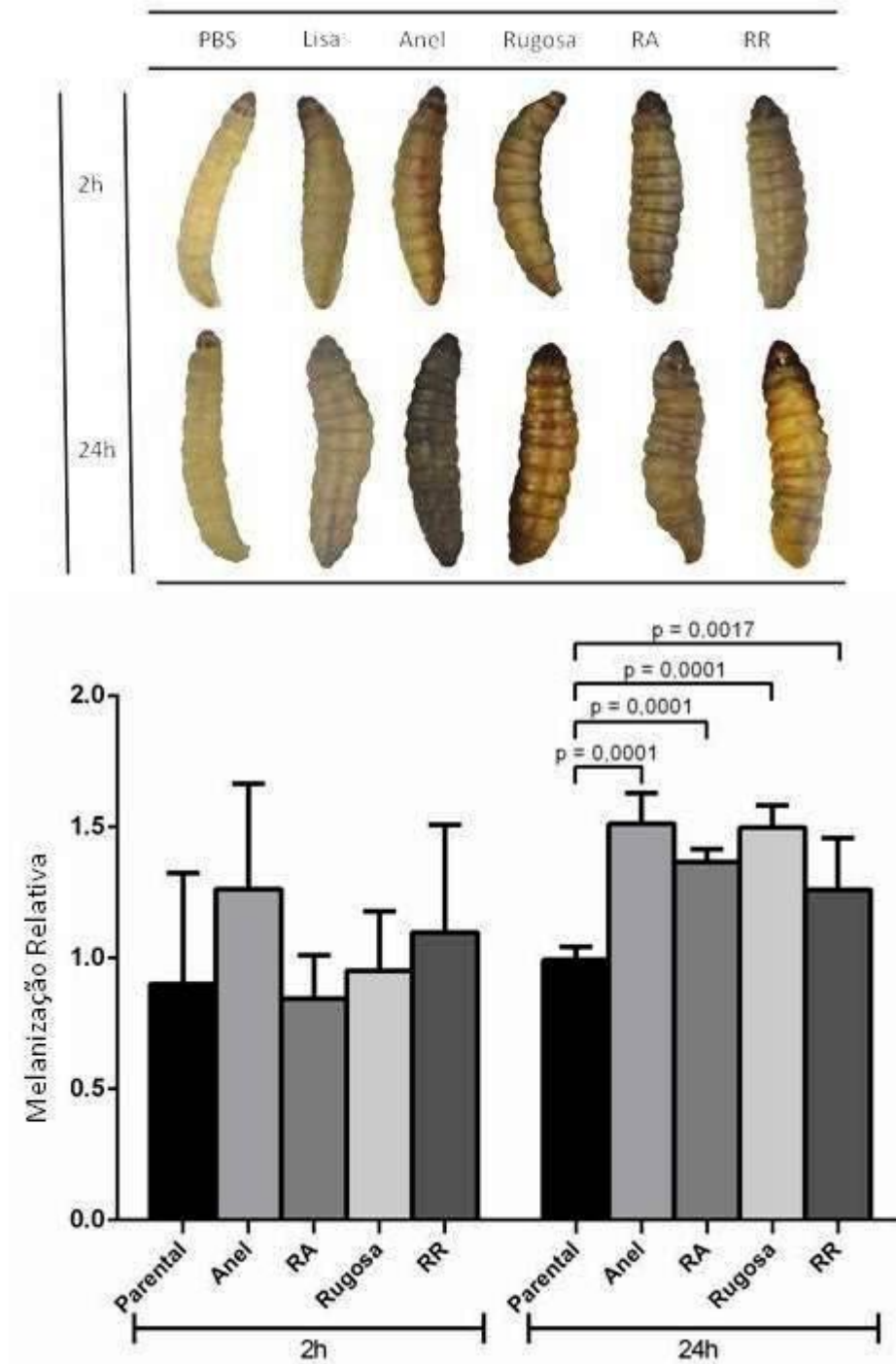


Figura 1: Melanização apresentada por larvas de *Galleria mellonella* após infecção por 2 e 24 horas com 5×10^5 células/larva de linhagens derivadas de *switching* fenotípico do sistema 49.07 de *Candida tropicalis*. Coloração apresentada por larvas infectadas (A). Melanização determinada por OD 405 nm e relativizada com controle (PBS). Lisa (morfotipo parental), Anel e Rugoso (variantes de *switching*) e Revertentes de Anel (RA) e Rugoso (RR).

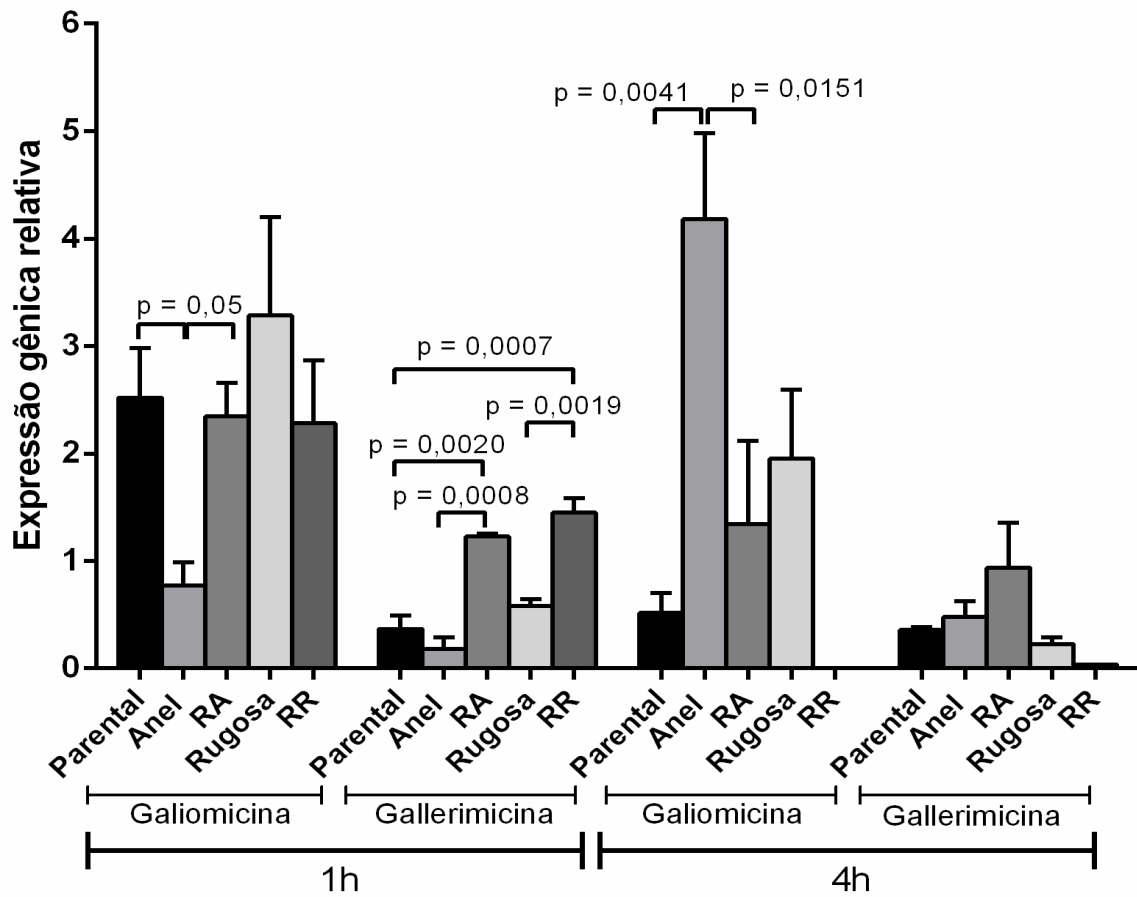


Figura 2: Expressão gênica dos peptídeos antimicrobianos galiomicina e gallerimicina após uma e quatro horas de infecção com linhagens morfológicas do isolado 49.07 derivadas de *switching* fenotípico. Valores relativizados com gene da β -actina.

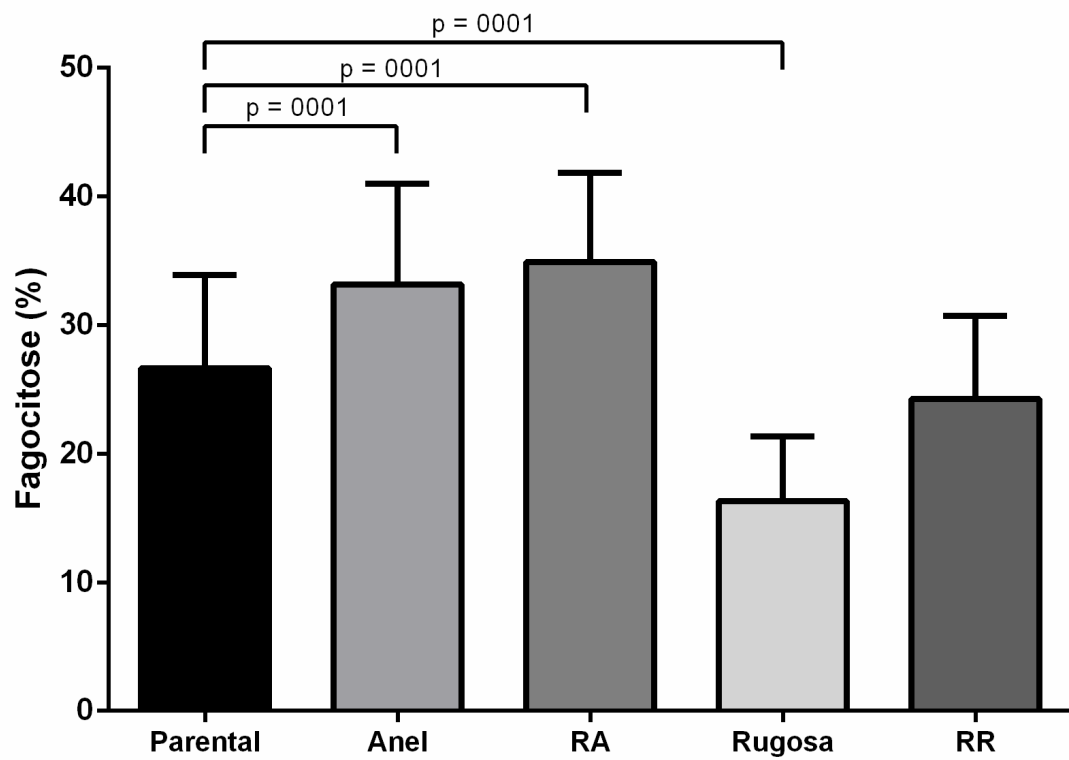


Figura 3: Porcentagem de hemócitos contendo células internalizadas das linhagens morfológicas derivadas de *switching* fenotípico do isolado 49.07 de *Candida tropicalis*.

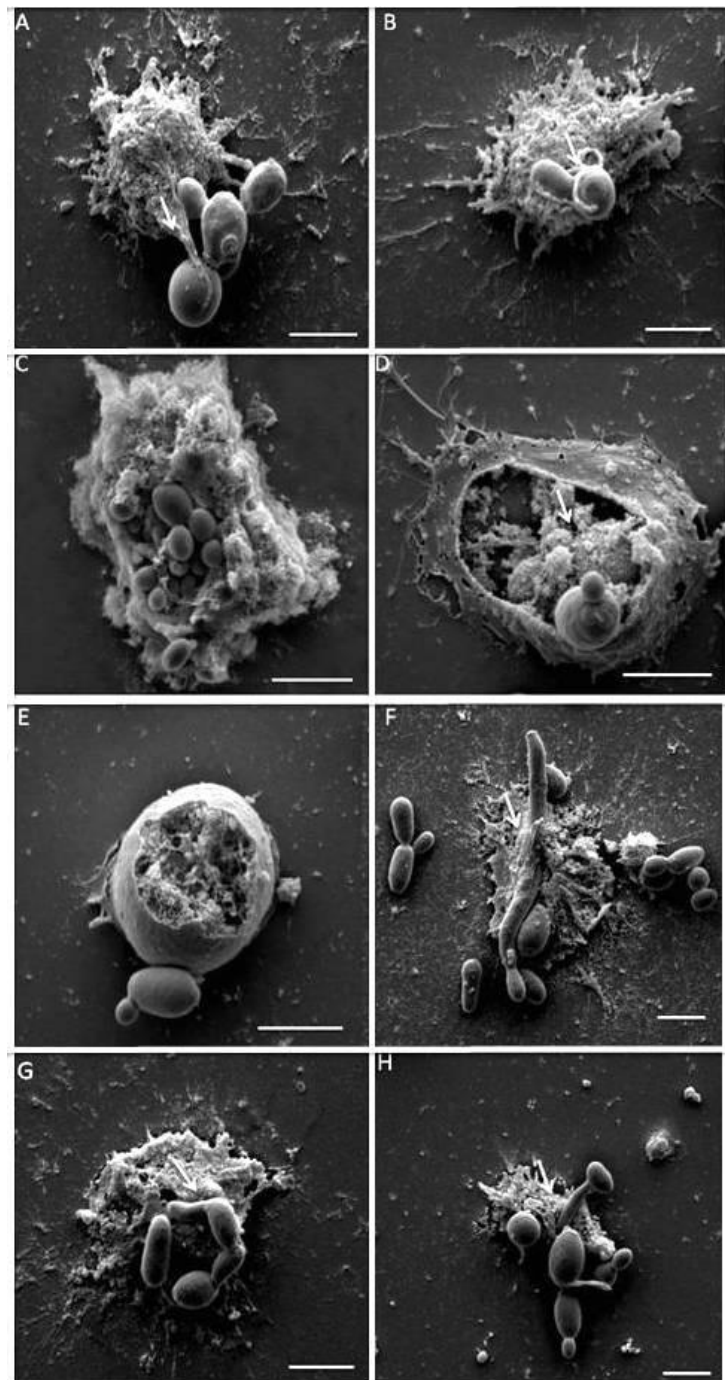


Figura 4: Micrografia eletrônica de varredura demonstrando processo de fagocitose entre hemócitos de *Galleria mellonella* e células fúngicas derivadas de *switching* fenotípico de *Candida tropicalis* (setas). Hemócito emitindo pseudópodes e entrando em contato com célula de *Candida tropicalis* (A); Célula fúngica sendo recoberta por prolongamentos de membrana de hemócito (B); Células fúngicas internalizadas em hemócito (C); Célula de *Candida tropicalis* danificada no interior do hemócito (seta) (D); Tipo de hemócito não fagocítico sem a parte superior da membrana (E); Interação entre formas filamentosas de *C. tropicalis* e hemócitos de *G. mellonella* indicando possível dano ao hemócito (setas) (F, G e H). Barra de escala = 5µm.

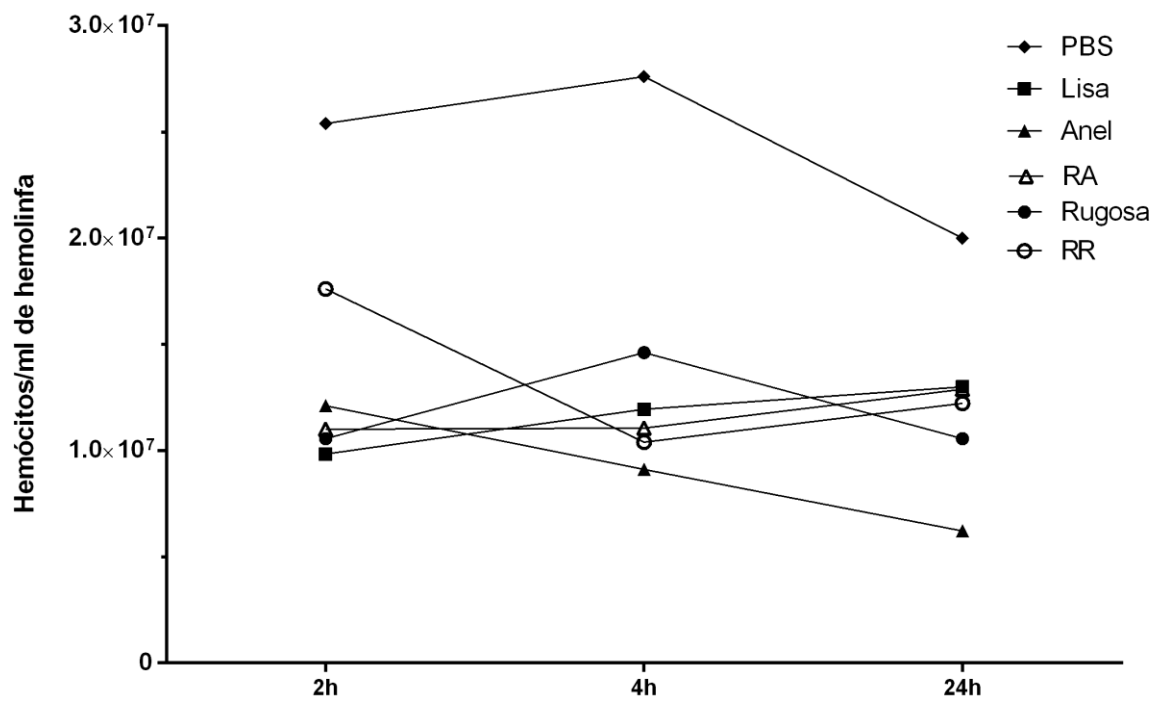


Figura 5: Densidade de hemócitos por ml de hemolinfa de larvas infetadas com 5×10^5 células/larva de linhagens derivadas de *switching* fenotípico do sistema 49.07 de *Candida tropicalis* durante 2, 4 e 24 horas de infecção.

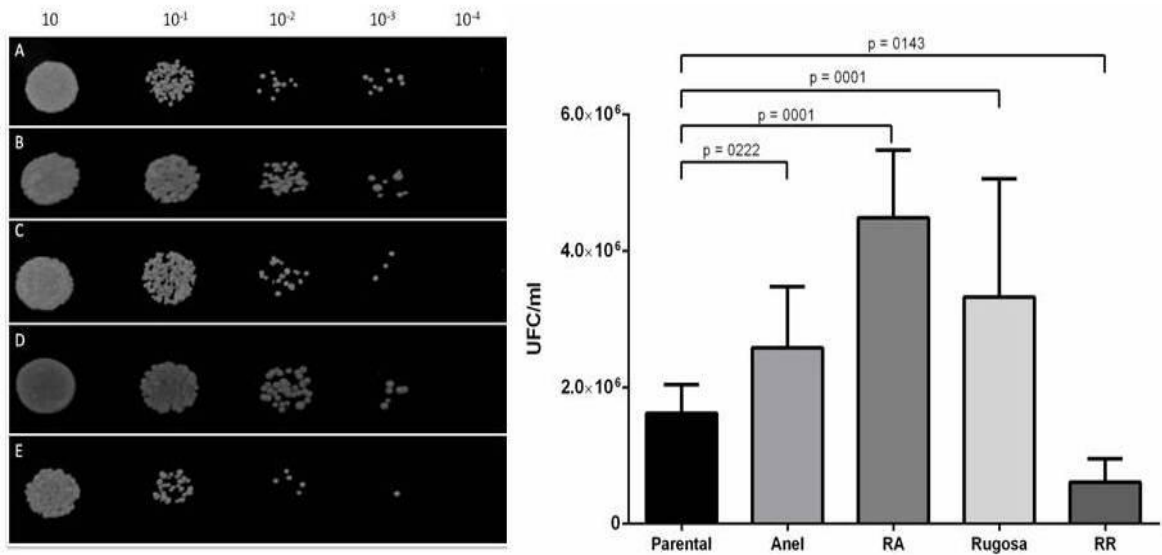


Figura 6: Unidades formadoras de colônia (UFC) após co-cultivo por 4 horas de linhagens morfológicas derivadas de *switching* fenotípico com hemócitos de *Galleria mellonella* (5 células fúngicas:1 hemócito). (A) Densidade de UFC em diferentes diluições (10^{-1} à 10^{-4}) dos variantes morfológicos Liso (A); Anel (B); Revertente de Anel (C); Rugoso (D) e Revertente de Rugoso (E). (B) Quantidade de UFC/ml.

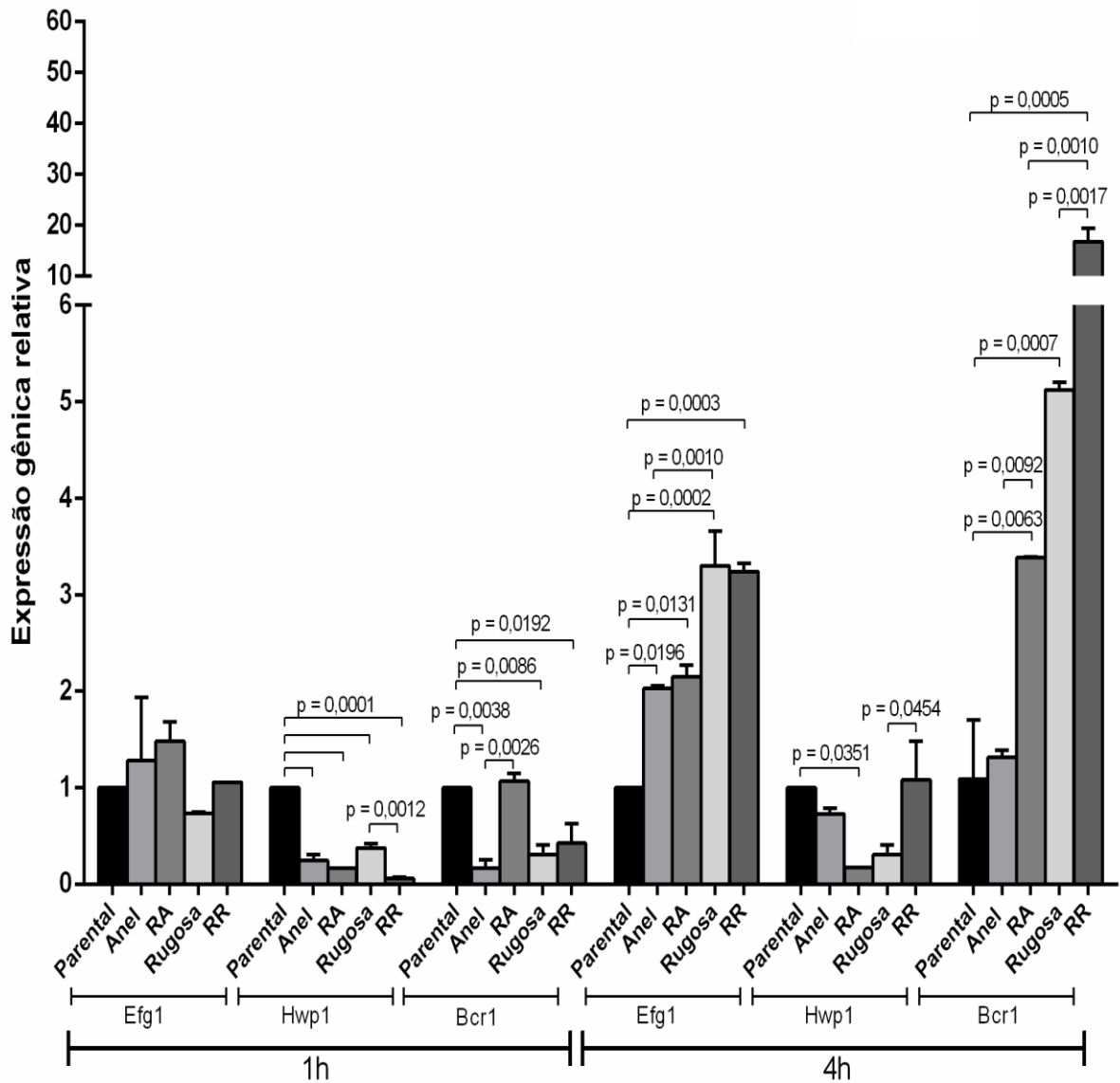


Figura 7: Expressão dos genes *Hwp1* e *Als1* e dos fatores de transcrição *Efg1* e *Bcr1*, após uma e quatro horas de infecção com linhagens morfológicas do isolado 49.07 derivadas de *switching* fenotípico. Valores normalizados com gene *Act1* e relativizados com Parental (Liso).

CONCLUSÃO

Com base nos dados do presente estudo, pode-se concluir que diversas são as interações entre o hospedeiro *G. mellonella* e as linhagens fenotípicas de *C. tropicalis*. As diferenças na virulência desses morfotipos estão ligadas a eventos multifatoriais ligados não só à capacidade de resposta imune do hospedeiro, mas também à características expressas pelas leveduras que culminam tanto na expressão tardia de padrões de resposta humoral, quanto na capacidade de escape da resposta celular. Além disso, mostrou-se que em diversas dessas interações, morfologias revertentes, que apresentam características de colônia semelhantes à parental, são capazes de expressar propriedades antes observadas em morfologias mais estruturadas, mostrando que nas condições testadas, o evento de *switching* fenotípico pode alterar a virulência dessas linhagens, gerando morfotipos mais virulentos, por induzir respostas diferenciadas a nível humoral e celular que culminam no sucesso do fungo dentro do ambiente hostil do hospedeiro.

REFERÊNCIAS

- BERGIN, D.; BRENNAN, M.; KAVANAGH, K. Fluctuations in haemocyte density and microbial load may be used as indicators of fungal pathogenicity in larvae of *Galleria mellonella*. **Microbes and infection**, v. 5(15), p. 1389-95, 2003.
- BERGIN, D.; REEVES, E. P.; RENWICK, J.; WIENTJES, F. B.; KAVANAGH, K. Superoxide Production in *Galleria mellonella* Hemocytes: Identification of Proteins Homologous to the NADPH Oxidase Complex of Human Neutrophils. **Infection and Immunity**, v. 73(7), p. 4161-70, 2005.
- BROWNE, N.; HEELAN, M.; KAVANAGH, K. An analysis of the structural and functional similarities of insect hemocytes and mammalian phagocytes. **Virulence**. v.4, 2013.
- BULET, P.; HETRU, C.; DIMARCQ, J.; HOFFMAN, D. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. **Developmental e Comparative immunology**, v. 4(7), p. 597-603, 1999.
- CERENIUS, L.; LEE, B. L.; SODERHALL, K. The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. **Trends in Immunology**, v. 29(6), p. 263-71, 2008.
- CERENIUS, L.; SODERHALL, K. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. **Immunological Reviews**, v.198, 2004.
- COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T.; SILVA, L. R. B.; MONFARDINI, P. A.; CUNHA, A. K. B.; RADY, P.; ALVES, T.; ROSAS, R. C. Prospective observational study of candidemia in São Paulo, Brazil: incidence rate, epidemiology, and predictors of mortality. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 28, p. 570-576, 2007.
- CONNOLLY, L. A.; RICCOMBENI, A.; GROZER, Z.; HOLLAND, L. M.; LYNCH, D. B.; ANDES, D. R.; GACSER, A.; BUTLER, G. The APSES transcription factor Efg1 is a global regulator that controls morphogenesis and biofilm formation in *Candida parapsilosis*. **Molecular Microbiology**, v. 90(1), p. 36-53, 2013.
- EGGER, G; LIANG, G.; APARICIO, A.; JONES, P. A. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. **Nature**, v. 429, p. 456-463, 2004
- EISENMAN, H. C.; DUONG, R.; CHAN, H.; TSUE, R.; McCLELLAND, E. E. Reduced virulence of melanized *Cryptococcus neoformans* in *Galleria mellonella*. **Virulence**. v. 5, 2014.
- ELEATHERIANOS, I.; REVENIS, C. Role and importance of phenoloxidase in insect hemostasis. **Journal of Innate Immunity**, v. 3(1), p. 28-33, 2011.
- FRANÇA, E. J. G.; ANDRADE, C. G. T. J.; FURLANETO-MAIA, L.; SERPA, R.; OLIVEIRA, M. T.; QUESADA, R. M. B.; FURLANETO, M. C. Ultrastructural architecture of colonies of different morphologies and biofilm produced by phenotypic switching of *Candida tropicalis*. **Micron**, v. 42(7), p. 726-732, 2011.

FUCHS, B. B.; O'BRIEN, E.; KHOURY, J. B.; MYLONAKIS, E. Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. **Virulence**. v. 1. 2010.

GONZALEZ-SANTOYO, I.; CORDOBA-AGUILAR, A. Phenoloxidase: A key component of the insect immune system. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 142, 2012.

GUDLAUGSSON, O.; GILLESPIE, S.; LEE, K.; BERG, J. V.; HU, J.; MESSER, S.; HERWALDT, L.; PFALLER, M.; DIEKEMA, D. Attributable mortality of nosocomial Candidemia, revisited. **Clinical Infectious Diseases**, v. 37(9), p. 1172-7, 2003.

KAVANAGH, K.; REEVES, E. P. Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 28(1), p. 101-12, 2004.

KEMP, M. W.; MASSEY, R. C. The use of insect models to study human pathogens. **Drug discovery today: Disease Models**. V.4, 2007.

KONTOYIANNIS, D. P.; VAZIRI, I.; HANNA, H. A.; BOKTOUR, M.; THORNBY, J.; HACHEM, R.; BODEY, G. P.; RAAD, I. I. Risk factors for *Candida tropicalis* fungemia in patients with cancer. **Clinical Infectious Disease**. v. 33, p. 1676–1681, 2001.

KUMAMOTO, C.A.; VINCES, M. D. Contributions of hyphae and hypha-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence. **Cellular Microbiology**, v. 7(11), p. 1546-54, 2005.

LIONAKIS, M. S. Drosophila and Galleria insect model hosts: new tools for the study of fungal virulence, pharmacology and immunology. **Virulence**, v. 2(6), p. 521-7, 2011.

LORENZ, M. C.; BENDER, J. A.; FINK, G. R. Transcriptional response of *Candida albicans* upon internalization by macrophages. **Eukaryotic Cell**. 2004

MANCERA, E.; PORMAN, A. M.; CUOMO, C. A.; BENNETT, R. J.; JOHNSON, A. D. Finding a Missing Gene: EFG1 Regulates Morphogenesis in *Candida tropicalis*. **G3 – Genes – Genomes – Genetics**, v. 5(5), p. 849-56, 2015.

MAURER, E.; BROWNE, N.; SURLIS, C.; JUKIC, E.; MOSER, P.; KAVANAGH, K.; LASS-FLORL, C.; BINDER, U. *Galleria mellonella* as a host model to study *Aspergillus terreus* virulence and anophoterin B resistance. **Virulence**. v.6, 2015.

McKENZIE, C. G. J.; KOSER, U.; LEWIS, L. E.; BAIN, J. M.; MORA-MONTES, H. M.; BARKER, R. N.; GOW, N. A. R.; ERWIG, L. P. Contribution of *Candida albicans* cell wall components to recognition by and escape from murine macrophages. **Infection and Immunology**, v. 78(4), p. 1650-8, 2010.

MESA-ARANGO, A. C.; FORASTIERO, A.; BERNAL-MARTÍ NEZ, L.; CUENCA ESTRELLA, M.; MELLADO, E.; ZARAGOZA, O. The non-mammalian host *Galleria mellonella* can be used to study the virulence of the fungal pathogen *Candida*

tropicalis and the efficacy of antifungal drugs during infection by this pathogenic yeast. **Medical Mycology**, v.51, p.461-472, 2013.

MOGHADDAM, M. R. B.; TONK, M.; SCHREIBER, C.; SALZIG, D.; CZERMAK, P.; VILCINSKAS, A.; RAHNAMAEIAN, M. The potential of the *Galleria mellonella* innate immune system is maximized by the co-presentation of diverse antimicrobial peptides. **Biological Chemistry**. V. 397. 2016.

MORALEZ, A. T. P.; FRANÇA, E. J. G.; FURLANETO-MAIA, L.; QUESADA, R. M. B.; FURLANETO, M. C. Phenotypic switching in : association with modification of putative virulence attributes and antifungal drug sensitivity. **Medical Mycology**, v. 51, p. 106-114, 2014.

MORALEZ, A. T. P.; PERINI, H. F.; FURLANETO-MAIA, L.; ALMEIDA, R. S.; PANAGIO, L. A.; FURLANETO, M. C. Phenotypic switching of *Candida tropicalis* is associated with cell damage in epithelial cells and virulence in *Galleria mellonella* model. **Virulence**, v. 7(4), p. 379-86, 2016.

MOWLDS, P.; KAVANAGH, K. Effect of pre-incubation temperature on susceptibility of *Galleria mellonella* larvae to infection by *Candida albicans* .**Mycopathologia**, v. 165(1), p. 5-12, 2008.

MOWLDS, P.; COATES, C.; RENWICK, J.; KAVANAGH, K. Dose-dependent cellular and humoral responses in *Galleria mellonella* larvae following beta-glucan inoculation. **Microbes and Infection**, v. 12(2), p. 146-53, 2010.

MUKHERJEE, K.; HAIN, T.; FISHER, R.; CHAKRABORTY, T.; VILCINSKAS, A. Brain infection and activation of neuronal repair mechanisms by the human pathogen *Listeria monocytogenes* in the lepidopteran model host *Galleria mellonella*. **Journal of Medical Microbiology**. v. 62. 2013.

MULLER, H. R.; PRADO, K. B. Epigenética: Um Novo Campo Da Genética. **Revista Unicenp de Biologia e Saúde**, v. 1, p. 61-69, 2008.

NOBILIE, C. J.; SCHNEIDER, H. A.; NETT, J. E.; SHEPPARD, D. C.; FILLER, S. G.; ANDES, D. R.; MITCHELL, A. P. Complementary adhesin function in *C. albicans* biofilm formation. **Current Biology**, v. 18(14), 2008.

OLIVER, J. D.; LOY, J. D.; PARIKH, G.; BARTHOLOMAY, L. Comparative analysis of hemocyte phagocytosis between six species of arthropods as measured by flow cytometry. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 108(2), p. 126-30, 2011.

RAJENDRAN, R.; BORGHI, E.; FALLENI, M.; PERDONI, F.; TOSI, D.; LAPPIN, D. F.; O'DONNELL, L.; GREETHAM, D.; RAMAGE, G.; NILE, C. Acetylcholine protects against *Candida albicans* infection by inhibiting biofilm formation and promoting hemocyte function in a *Galleria mellonella* infection model. **Eukaryotic cell**. 2015.

SATYAVATHI, V. V.; MINZ, A.; NAGARAJU, J. Nodulation: an unexplored cellular defense mechanism in insects. **Cellular Signalling**, v. 26(8), p. 1753-63, 2014.

- SCHUHMANN, B.; SEITZ, V.; VILCINSKAS, A.; PODSIADLOWSKI, L. Cloning and expression of gallerimycin, an antifungal peptide expressed in immune response of greater wax moth larvae, *Galleria mellonella*. **Archives of Insect Biochemistry Physiology**. v.53, 2003.
- SCORZONI, L.; SILVA, A. C. A.; SINGULANI, J. L.; LEITE, F. S.; OLIVEIRA, H. C.; SILVA, A. M.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. Comparison of virulence between *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii* using *Galleria mellonella* as a host model. **Virulence**. v.6, 2015.
- SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D. W.; AZEREDO, J. Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. **Trends in Microbiology**. v. 19, 2011.
- SLUTSKY, B.; STAEBELL, M.; ANDERSON, J.; RISEN, L.; PFALLER, M.; SOLL, D.R. White-Opaque transition: a second high-frequency switching system in *Candida albicans*. **Journal of Bacteriology**. 1987.
- SOLL, D. R. High-frequency switching in *Candida albicans*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 5, n. 2, p. 183-203, 1992.
- SOWA-JASILEK, A.; ZDYBICKA-BARABAS, A.; STACZEK, S.; WYDRYCH, J.; MAK, P.; JAKUBOWICZ, T.; CYTRYNSKA, M. Studies on the role of insect hemolymph polypeptides: *Galleria mellonella* anionic peptide 2 and lysozyme. **Peptides**. V.53, 2014.
- STAAB, J. F.; BRADWAY, S. D.; FIDEL, P. L.; SUNDSTROM, P. Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of *Candida albicans* Hwp1. **Science**. v. 283, n. 5407, 1999.
- SUDBERRY, P.; GOW, N.; BERMAN, J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. **Trends in Microbiology**. V.12, 2004.
- TOJO, S.; NAGANUMA, F.; ARAKAWA, K.; YOKOO, S. Involvement of both granular cells and plasmatocytes in phagocytic reactions in the greater wax moth, *Galleria mellonella*. **Journal of Insect Physiology**. v.46, 2000.
- TOMIOTTO-PELLISSIER, F.; CATANEO, A. H. D.; ORSINI, T. M.; dos THOMAZELLI, A. P. F. S.; DALEVEDO, G. A.; OLIVEIRA, A. G.; PANAGIO, L. A.; COSTA, I. N.; CONCHON-COSTA, I.; PAVANELLI, W.; ALMEIDA, R. S. *Galleria mellonella* hemocytes: A novel phagocytic assay for *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Journal of Microbiological Methods**. V. 131. 2016.
- TREVIJANO-CONTADOR, N.; HERRERO-FERNANDEZ, I.; GARCIA-BARBAZAN, I.; SCORZONI, L.; RUEDA, C.; ROSSI, S. A.; GARCIA-RODAS, R.; ZARAGOZA, O. *Cryptococcus neoformans* induces antimicrobial responses and behaves as a facultative intracellular pathogen in the non mammalian model *Galleria mellonella*. **Virulence**. v. 6, 2015.

TZOU, P.; OHRESSER, S.; FERRANDON, D.; CAPOVILLA, M.; REICHHART, J. M.; LEMAITRE, B.; HOFFMANN, J. A.; IMLER, J. L. Tissue-specific inducible expression of antimicrobial peptide genes in *Drosophila* surface epithelia. **Immunity**. v.13, 2000.

VAN VALEN, L. A new evolutionary law. **Evolutionary Theory**. 1973.

WAND, M. E.; McCOWEN, J. W. I.; NUGENT, P. G.; SUTTON, J. M. Complex interactions of *Klebsiella pneumoniae* with the host immune system in a *Galleria mellonella* infection model. **Journal of Medical Microbiology**. 2013.

WAND, M. E.; McCOWEN, J. W. I.; NUGENT, P. G.; SUTTON, J. M. Complex interactions of *Klebsiella pneumoniae* with the host immune system in a *Galleria mellonella* infection model. **Insect Science**. 2016

WU, G.; XU, L.; YI, Y. *Galleria mellonella* larvae are capable of sensing the extent of priming agent and mounting proportional cellular and humoral immune responses. **Immunology Letters**. V. 174, 2016.

ZHANG, Q.; TAO, L.; GUAN, G.; YUE, H.; LIANG, W.; CAO, C.; DAI, Y.; HUANG, G. Regulation of filamentation in the human fungal pathogen *Candida tropicalis*. **Molecular Microbiology**. V. 99, 2016.