



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ALINE DIAS VALÉRIO

**HOSPEDEIROS INVERTEBRADOS PARA O ESTUDO DE
INFECÇÕES FÚNGICAS**

Londrina
2017

ALINE DIAS VALÉRIO

**HOSPEDEIROS INVERTEBRADOS PARA O ESTUDO DE
INFECÇÕES FÚNGICAS**

Defesa de Mestrado em Microbiologia
apresentado ao Departamento de Microbiologia
da Universidade Estadual de Londrina.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Sérgio Couto de
Almeida.

Londrina
2017

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

Valério, Aline.

Hospedeiros invertebrados para o estudo de infecções fúngicas / Aline Valério. - Londrina, 2017.
111 f.

Orientador: Ricardo Almeida.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2017.

Inclui bibliografia.

1. Tenebrio molitor - Tese. 2. Galleria mellonella - Tese. 3. Candida - Tese. 4. Virulência - Tese. I. Almeida, Ricardo. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

ALINE DIAS VALÉRIO

HOSPEDEIROS INVERTEBRADOS PARA O ESTUDO DE INFECÇÕES FÚNGICAS

Defesa de Mestrado em Microbiologia
apresentado ao Departamento de Microbiologia
da Universidade Estadual de Londrina.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dra. Silvia Ponzoni
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Márcia Cristina Furlaneto
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Aprovada em: 24 de fevereiro de 2017.



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

*Dedico este trabalho a minha família, os
quais sempre foram os maiores
incentivadores dos meus estudos e que
me apoiaram em todos os momentos.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que foi sempre meu refúgio e me iluminou durante todos os momentos, principalmente naqueles difíceis (e foram muitos). Agradeço a minha família, tudo que fiz e faço é por vocês, só cheguei aqui por causa do apoio, dedicação e confiança de vocês, sei o quantas foram as vezes que vocês abriram mão de coisas para vocês mesmos para que eu pudesse ter o melhor aqui, nem se eu viver 100 anos vou ser capaz de retribuir tudo, mas espero poder fazê-lo ao máximo. Vocês são a melhor parte da minha vida, os meus amores! Outra parte essencial da minha vida e que devo profundo agradecimento são meus amigos, os quais posso dizer que são os melhores, mais especiais, leais, divertidos que eu poderia ter, faltam adjetivos para falar de vocês. Minha vida seria totalmente sem graça se eu não tivesse conhecido vocês, esses anos em Londrina não fariam sentido. Vocês foram o melhor presente que a UEL poderia me trazer e eu agradeço infinitamente pela amizade de todos desde os que eu conheci durante a graduação, aqueles que fiz durante o mestrado, no laboratório, os que vieram através de outros amigos, enfim, todos vocês tem todo o meu amor e um lugar muito especial no meu coração! Amo vocês, vou levá-los pra sempre comigo, independente dos caminhos que a vida me levar! Obrigada a minha turma de mestrado, ou como carinhosamente chamo as “Flores do meu jardim”, vocês fizeram meu mestrado mais divertido, foi ótimo fazer parte de uma turma tão unida e especial! Agradeço especialmente a Patrícia, que me ensinou tudo no laboratório. Agradeço a orientação do Professor Ricardo, e também ao professor Luciano pela ajuda durante o meu mestrado. Agradeço imensamente a todos os professores que passaram pela minha vida de estudante, cada um deixou a sua maneira uma marca em minha vida, e com certeza me ajudaram a compreender e me interessar por essa profissão linda! Agradeço aos funcionários da UEL, desde as pessoas da limpeza, secretários e técnicos, o trabalho de vocês nos ajuda muito. Todos que conviveram comigo sabem que esses dois anos não foram fáceis, mas se eu consegui passar por eles foi com a ajuda de pessoas maravilhosas que Deus colocou no meu caminho! Obrigada a todos! Agradeço a Universidade Estadual de Londrina onde realizei a graduação e mestrado, a CAPES pela bolsa concedida e ao CNPq pelo financiamento do projeto.

“Você deve lutar mais de uma batalha para
se tornar um vencedor”

Margaret Thatcher

VALÉRIO, Aline Dias. **Hospedeiros invertebrados para o estudo de infecções fúngicas**. 2017. 111 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

O número de infecções fúngicas no mundo tem aumentado consideravelmente. O gênero *Candida* se destaca como um dos principais agentes etiológicos dessas infecções, sendo isolado com maior frequência. Para o estudo da patogenicidade e virulência de tais fungos são usados modelos mamíferos. Porém a busca por metodologias alternativas tem crescido no meio científico. O uso de hospedeiros invertebrados tem sido uma das metodologias propostas pelos pesquisadores. Assim, larvas da mariposa *Galleria mellonella* têm apresentado boa resposta nas pesquisas de virulência e patogenicidade. Ainda pouco exploradas, larvas do besouro *Tenebrio molitor* além de apresentarem, características semelhantes à *G. mellonella*, possuem a vantagem de serem vendidas comercialmente no Brasil, fator que favorece a sua aquisição para a pesquisa. Tendo em vista o potencial de *T. molitor* como alternativa para os estudos de patogenicidade e virulência microbiana, nós utilizamos larvas desse coleóptero para avaliar a virulência de espécies pertencentes ao Gênero *Candida* e ainda comparar os resultados com *G. mellonella* submetida ao mesmo procedimento experimental. Para isso injetamos 5µL de diferentes concentrações fúngicas (1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 por larva) nas larvas dos dois organismos modelos. Ao final de dez dias experimentais construímos curvas de sobrevivência a partir dos dados obtidos. Assim como o observado em *G. mellonella*, *T. molitor* apresentou comportamento de dose-dependência em relação as concentrações fúngicas estudadas. Os resultados encontrados apontam o uso de larvas de que o *T. molitor* como uma alternativa para os estudos de virulência fúngica.

Palavras-chave: *Tenebrio molitor*. *Galleria mellonella*. *Candida*. Virulência.

VALÉRIO, Aline Dias. **Invertebrate hosts for study of fungal infections**. 2017. 111 f. Dissertation (Master's degree in Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

ABSTRACT

The number of fungal infections worldwide has increased considerably. The genus *Candida* stands out as one of the main ones, being isolated in great frequency. Mammalian models are used to study the pathogenicity and virulence of such fungi. However, the search for alternative methodologies has grown in the scientific world. The use of invertebrate models has been one of the methodologies proposed by the researchers. *Galleria mellonella* is one of the models that have shown good response in virulence and pathogenicity studies. *Tenebrio molitor* is a new model, still little explored, but that besides presenting characteristics similar to *G. mellonella* presents the advantage of being sold commercially in Brazil, a factor that favors its acquisition for the research. Considering the potential of *T. molitor* as an alternative for pathogenicity and microbial virulence studies, we used this model to evaluate the virulence of species belonging to the *Candida* genus and to compare the results with *G. mellonella* submitted to the same experimental procedure. In order to do that, we injected 5 μ L of different fungal concentrations (1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 per larva) in the larvae of both models. At the end of ten experimental days we constructed survival curves from the obtained data. Like the one observed in *G. mellonella*, the model of *T. molitor* presented behavior of dose-dependence in relation to the fungic concentrations studied. The results show that *T. molitor* is an alternative for the studies of fungal virulence.

Key words: *Tenebrio molitor*. *Galleria mellonella*. *Candida*. Virulence.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1. Métodos alternativos para o estudo da relação parasito-hospedeiros	11
2.2. Hospedeiros vertebrados para o estudo da virulência de <i>Candida</i> spp.....	13
2.3 Hospedeiros alternativos para o estudo da virulência de <i>Candida</i> spp.	15
2.4. <i>Galleria mellonella</i>	17
2.5. <i>Tenebrio molitor</i>	22
2.6. Gênero <i>Candida</i>	24
2.7. <i>Candida albicans</i>	26
2.8. <i>Candida tropicalis</i>	27
2.9. <i>Candida parapsilosis</i>	28
2.9.1 <i>Candida glabrata</i>	30
2.9.2 <i>Candida guilliermondii</i>	32
3. OBJETIVOS	34
3.1 Objetivo geral.....	34
3.2 Objetivos específicos.....	34
4. REFERÊNCIAS	35
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	51
5.1 Modelos invertebrados no estudo de fungos patogênicos	52
5.2 <i>Tenebrio molitor</i> como um hospedeiro modelo para estudo de infecções por <i>Candida</i> spp.....	90
5.3 Disruption of protein mannosylation affects <i>Candida guilliermondii</i> cell wall, immune sensing, and virulence.	110
6. CONCLUSÕES	111

1. INTRODUÇÃO

Os problemas éticos que envolvem animais sencientes nas pesquisas científicas geram debates entre os pesquisadores. Iniciativas que busquem uma alternativa para o problema vêm sendo propostas no meio científico. Desde a criação do princípio dos 3 R's por Russel & Burch em 1959, esforços maiores são registrados em todo mundo (RUSSEL; BURCH; HUME, 1959). Tais esforços tem ganhado apoio de organizações governamentais, que visam implantar nos países metodologias alternativas ao uso dos animais sencientes. Exemplos de tais atitudes são o The European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) na União Européia e o Brazilian Center for the Validation of Alternative Methods (BraCVAM) no Brasil (BARROSO et al, 2016; PRESGRAVE et al, 2016)

A literatura já nos apresenta estudos que trazem resultados favoráveis ao uso de metodologias alternativas em diversas pesquisas científicas (FUCHS; MYLONAKIS, 2006; FALLON et al, 2012; JUNQUEIRA, 2012; COOK; MCARTHUR, 2013; DE SOUZA et al, 2015). Um campo que vem sendo bastante explorado nos estudos de modelos alternativos é o uso dos mesmos nas pesquisas de virulência e patogenicidade microbiana.

Um dos motivos em que torna clara necessidade de novas metodologias para o estudo de patogenicidade e virulência fúngica é que no decorrer das últimas décadas tem sido registrado um aumento no número de infecções causadas por fungos, sendo que tal aumento pode ser explicado por diversos fatores, como aumento da expectativa de vida e amplo uso de antimicrobianos (HOLZHEIMER; DRALLE, 2002; KOJIC; DAROUICHE, 2004; LASS-FLÖRL et al, 2009; SILVA et al, 2012). Neste contexto o gênero *Candida* se destaca como microrganismos com ampla representatividade no quadro geral das infecções fúngicas no mundo todo. Dentre as espécies encontradas nesse gênero, *Candida albicans* se destaca, sendo a espécie com maior representatividade tanto em pessoas saudáveis, quanto nos quadros de infecções fúngicas (COLOMBO; GUIMARÃES 2003; RUPING et al., 2008; SOLL, 2002). Mesmo *C. albicans* ainda figurando como a espécie mais representativa nas infecções fúngicas, nas últimas décadas estudos epidemiológicos têm demonstrado um acréscimo nos casos em

que espécies não-*albicans* são os agentes patogênicos (COLOMBO et al, 2007; SILVA et al, 2012, YAPAR, 2014).

Os testes *in vivo* de virulência de cepas fúngicas são normalmente realizados utilizando mamíferos, principalmente ratos e camundongos, porém, como citado anteriormente, muitos artigos vêm sendo publicados mostrando a eficácia do uso de modelos invertebrados para esses testes. As vantagens do uso desses modelos vão desde resultados rápidos e reprodutíveis, até a redução de custos experimentais.

A larva da mariposa *Galleria mellonella* é um modelo já bem estabelecido na literatura para estudos de infecção fúngica, principalmente de infecções por *Candida* spp (COOK; MCARTHUR, 2013; FALLON et al, 2012; JUNQUEIRA, 2012). As vantagens desse modelo de infecção são que as larvas podem ser mantidas a temperaturas que variam de 25°C a 37°C, possuem diversas vias de inoculação e ainda apresentam componentes imunológicos de resposta inata celular e humoral (CHAMPION et al, 2011; COOK; MCARTHUR, 2013; LIONAKIS, 2011; TSAI et al, 2016).

A larva do besouro *Tenebrio molitor* também tem apresentado potencial para ser um hospedeiro de estudos de patogenia e virulência (De Souza et al., 2015). Os diversos mecanismos de defesa que esse invertebrado apresenta contra os patógenos tem despertado o interesse de pesquisadores, e estudos mais aprofundados sobre esse assunto vêm sendo publicados.

Devido ao fato de *T. molitor* ainda ser pouco explorado como hospedeiro, nós buscamos estudar o comportamento do mesmo frente a infecção por diferentes espécies pertencentes ao gênero *Candida*. Além disso, comparamos os resultados com os obtidos em *G. mellonella* para assim traçar as diferenças e semelhanças na resposta de ambos diante da infecção fúngica.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Métodos alternativos para o estudo da relação parasito-hospedeiros

A ética nas pesquisas científicas é um tema recorrente no meio científico. Datam do século XIX, os primeiros relatos de discussões à cerca da

utilização de animais sencientes (àqueles que reconhecem o estímulo da dor e expressam sentimentos) nas pesquisas. Junto a essas pesquisas está atrelada a criação de vários grupos de proteção aos animais (RAYMUNDO; GOLDIM, 2002).

A comunidade científica por muitos anos foi resistente a implantação de metodologias alternativas por considerar que a utilização de animais seria essencial para a obtenção de resultados satisfatórios em suas pesquisas (RENAMA). Porém, contrariamente ao pensamento desses pesquisadores, surgiram iniciativas que buscavam metodologias que apresentassem resultados similares às metodologias clássicas já estabelecidas, mas que não utilizassem ou reduzissem o uso de animais sencientes. Um importante fato que contribuiu para o avanço nas buscas por metodologias alternativas, e redução na utilização de animais sencientes nas pesquisas científicas foi a publicação em 1959 por Russel & Burch do livro intitulado “The principles of humane experimental technique”, no qual implementaram o princípio dos 3Rs, que serve de base para as pesquisas científicas até os dias atuais. O princípio dos 3Rs se resumem em três conceitos básicos: a substituição, redução e refinamento. Na substituição os autores propõem o uso, quando possível, de uma metodologia que não utilize animais vertebrados vivos. Na redução eles predizem que se estabeleça um equilíbrio no uso de animais nas pesquisas, para que as informações obtidas com a mesma estejam relacionadas com o uso racional desses animais. E no refinamento eles instituem que quando indispensável o uso de animais sencientes, os mesmos passem por cuidados que minimizem sua dor e sofrimento (RUSSEL; BURCH; HUME, 1959).

Tomando como base o princípio dos 3Rs novos esforços na comunidade científica surgiram nas décadas seguintes. Na Europa, por exemplo, em 1991, ocorreu a criação do The European Centre for the Validation of the Alternative Methods (ECVAM), o qual valida métodos alternativos, buscando com isso avaliar o potencial dessas técnicas e, além disso, eliminar possíveis erros de metodologia. No Brasil recentemente a promulgação da Lei Arouca (nº11.794 de 8 de outubro de 2008) marcou a regulamentação da experimentação animal, baseada em princípios éticos e bem-estar animal nas pesquisas científicas e no ensino. Esta lei também estabeleceu a criação do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O CONCEA tem, dentre outras atribuições, a competência de zelar pelo cumprimento das regulamentações ligadas a utilização de animais em experimentação, credenciar e monitorar as instituições para criação e

utilização dos animais em pesquisa e ensino, realizar o monitoramento e avaliação de metodologias alternativas ao uso de animais.

Muitas pesquisas voltadas a metodologias alternativas vêm sendo realizadas, e já é possível encontrar na literatura inúmeros artigos que trazem modelos invertebrados como alternativa nos testes, principalmente naqueles de toxicidade de substâncias e patogenicidade microbiana. *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Acanthamoeba castellanii*, *Dictyostelium discoideum*, *Tenebrio molitor* e *Galleria mellonella* tem se destacado nas pesquisas e demonstrado potencial como modelo alternativo (DE SOUZA et al, 2015; FUCHS; MYLONAKIS, 2006).

2.2. Hospedeiros vertebrados para o estudo da virulência de *Candida* spp.

As infecções causadas pelos agentes etiológicos do gênero *Candida* podem atingir diversos locais do corpo humano. Devido a tais particularidades, pesquisadores utilizam vários modelos experimentais para o estudo das características desses fungos durante o processo infeccioso. Para obter sucesso nos experimentos os cientistas buscam modelos que ao mesmo tempo mimetizem da melhor forma possível o ser humano, e que se enquadrem dentro das limitações laboratoriais. Sendo assim, existem na literatura vários trabalhos que exploram diferentes hospedeiros para estudo da virulência e patogenicidade do gênero *Candida*.

Pela proximidade filogenética com humanos, o uso de outros mamíferos no estudo de virulência fúngica é bastante difundido. Existem trabalhos que fazem uso de macacos, roedores, coelhos e porcos no estudo de virulência fúngica (revisado por MACCALLUM, 2012). A maioria dos estudos à cerca da virulência de espécies do gênero *Candida* faz uso de roedores como hospedeiros. Isso ocorre devido a familiaridade com que os pesquisadores já tem com a manutenção e manipulação dos mesmos, além da existência uma gama desses animais geneticamente modificados, os quais podem mimetizar condições humanas e auxiliar no estudo da ação de fatores de virulência dos fungos (MACCALLUM, 2012).

Por exemplo, Nett e colaboradores (2012) utilizaram ratos para desenvolver um modelo de infecção *in vivo* de formação de biofilmes em dentadura.

Para isso, os pesquisadores desenvolveram um modelo de dentadura para os roedores em acrílico. Os animais foram previamente imunossuprimidos, a dentadura foi inserida na cavidade oral dos animais e a mesma foi infectada com 1×10^8 células/mL de *Candida albicans*. As análises realizadas após o período experimental foram a carga fúngica presente na dentadura, microscopia eletrônica de varredura, histopatologia, ensaio de resistência a antimicrobianos e expressão diferencial de genes. Os dados obtidos por esses pesquisadores comprovam a eficiência deste modelo para o estudo da formação de biofilme em próteses dentárias, um fator de virulência apresentado por *C. albicans*. A principal vantagem apresentada por esse modelo é que diferente do modelo *in vitro*, no modelo *in vivo* ocorre a interação do fungo com a microbiota presente na cavidade oral, mimetizando o que realmente ocorre em humanos.

Andes e colaboradores (2004) buscaram desenvolver em sua pesquisa um modelo *in vivo* para o estudo de biofilme de *C. albicans* em um cateter venoso central. Para isso eles desenvolveram um cateter com materiais semelhantes aos que são usados em humanos, se atentaram para que o mesmo permitisse um bom fluxo sanguíneo, e o mesmo foi implantado em ratos. Posteriormente a esse processo, o fungo foi injetado pelo cateter para que o mesmo pudesse iniciar o processo de formação de biofilme. Com os resultados obtidos pelo experimento, os autores foram capazes de caracterizar a formação de biofilme, provendo um modelo que no futuro poderá auxiliar os estudos dos mecanismos moleculares de formação de biofilme de *C. albicans*, sua biologia e resistência a drogas.

Szabo e MacCallum (2008) fizeram uma revisão para mostrar os dados presentes na literatura sobre modelos murinos no estudo de infecções sistêmicas provocadas pelo gênero *Candida*. Na revisão, os autores mostram que os estudos concentram-se em duas vias principais para a disseminação da infecção em murinos, a via intravenosa e a via gastrointestinal. Os estudos que fazem uso da infecção realizada pela via intravenosa, tem por objetivo avaliar a virulência e patogenicidade fúngica em um momento que seria posterior a uma infecção intestinal, quando o fungo já tivesse atingido a corrente sanguínea do hospedeiro (SZABO; MACCALLUM, 2008). O modelo de infecção gastrointestinal mimetiza o curso comum da infecção fúngica em grande parte de pacientes humanos, porém, há de se salientar que os resultados da utilização destas metodologias são variáveis

dentro das espécies do gênero *Candida*, e que tais variações devem ser consideradas durante o delineamento experimental (SZABO; MACCALLUM, 2008; KOH; KÖHLER; COGGSHALL, 2008). Mellado e colaboradores (2000), por exemplo, notaram em seu estudo que ratos infectados pela via gastrointestinal com *C. albicans* e *C. tropicalis* apresentaram, em diferentes proporções, uma disseminação sistêmica dos fungos. Já aqueles que foram infectados com *C. parapsilosis* não apresentaram essa disseminação.

Mesmo com similaridades filogenéticas entre humanos e roedores, existe uma grande variação quanto aos componentes imunológicos dos mesmos, além de fungos do gênero *Candida* não fazerem parte da microbiota desses animais e não serem seus patógenos naturais. Dessa forma os resultados obtidos nos trabalhos utilizando tais modelos devem ser analisados considerando tais diferenças (revisado por SZABO; MACCALLUM, 2008).

2.3 Hospedeiros alternativos para o estudo da virulência de *Candida* spp.

Uma alternativa aos testes que utilizam roedores para o estudo de virulência fúngica são os testes *in vitro*. Na literatura encontramos exemplos bem-sucedidos da utilização dos testes *in vitro* de virulência de fungos do gênero *Candida*, dessa maneira, tais metodologias podem ser aplicadas nos testes prévios, servindo como “screen” para cepas fúngicas.

Dieterich e colaboradores (2002) desenvolveram dois tipos de tecidos humanos reconstituídos. Com esse modelo, os pesquisadores analisaram o comportamento de diferentes cepas de *C. albicans* com o objetivo de estudar dois fatores transcricionais ligados a adesão e invasão deste fungo, importantes fatores de virulência. Um dos modelos de tecido reconstituído foi utilizado para mimetizar infecções superficiais da pele e o uso do segundo tipo de tecido tinha por objetivo simular o início da infecção sistêmica. As cepas mutantes para os dois fatores transcricionais estudados não foram capazes de aderir e penetrar os tecidos. Com tais dados foi possível demonstrar o potencial de tais modelos para auxiliarem nos estudos de fatores de virulência em *C. albicans*.

Gácsér e colaboradores (2007) utilizaram modelos de tecido humano reconstituído para avaliar a virulência do Complexo *parapsilosis*. Através de análises

que avaliaram alterações morfológicas e danos celulares nos tecidos, os autores mostraram que as espécies *C. parapsilosis* e *C. orthopsilosis* causaram danos similares, e que *C. metapsilosis* apresentou-se como espécie menos virulenta.

Sanchez e colaboradores (2007) utilizaram o modelo *in vitro* de células endoteliais para testar diferentes mutantes de *C. albicans*. Os autores estabeleceram a relação de que as cepas que provocavam menor dano celular apresentavam menor virulência em testes com ratos e vice-versa. Tal correlação demonstra o potencial da utilização de modelos *in vitro* de células endoteliais para “screen” de fatores de virulência dentro do gênero *Candida*.

Os testes *in vitro* são de extrema importância e relevância para os estudos de virulência fúngica, porém não são suficientes para avaliar o processo completo da infecção fúngica, limitando-se em gerar dados pontuais em relação a ação do fungo em determinado tecido ou célula. Os modelos roedores, como citado anteriormente, podem atender algumas das limitações geradas pelo uso de técnicas *in vitro*, porém, a maioria das pesquisas necessitam de grande quantidade de animais, e isso passa a não ser viável em muitos institutos de pesquisa. Para solucionar tais impasses existem pesquisas que utilizam outros modelos para a realização de testes de virulência *in vivo*.

Jacobsen e colaboradores (2011) optaram pelo uso da membrana corioalantóica de ovos embrionados de galinhas para testar a virulência de mutantes de *C. albicans*. A grande maioria dos mutantes testados manteve o mesmo padrão de virulência apresentado previamente em estudos com camundongos. Tal modelo mostrou-se promissor como “pre-screen” para diferentes cepas de *Candida*.

Já Chao e colaboradores (2010) demonstraram que o peixe *Danio rerio* (Zebrafish) é um hospedeiro para no estudo da virulência de *C. albicans*. Diferentes cepas de *C. albicans* foram utilizadas no estudo, inclusive mutantes com virulência atenuada, comprovadas em estudos prévios com camundongos. Os resultados obtidos com zebrafish para infecção com as cepas utilizadas no ensaio foram similares aos dados obtidos com o murino.

Em busca de hospedeiros invertebrados Quintin e colaboradores (2013) utilizaram *Drosophila melanogaster* como modelo para estudo em larga escala de mutantes de *Candida glabrata*. Os pesquisadores optaram por este modelo pela facilidade de manipulação, manutenção e obtenção de grande número de indivíduos.

Chamilos e colaboradores (2006) utilizaram *D. melanogaster* para analisar a virulência de alguns isolados de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*. Das três espécies estudadas, *C. albicans* apresentou-se mais virulenta para *D. melanogaster*. Além disso os pesquisadores utilizaram as moscas para avaliar a virulência de algumas cepas de *C. albicans* mutantes, nas quais genes relacionados a filamentação foram deletados. Estudos prévios em ratos mostraram que tais cepas foram menos virulentas, o mesmo padrão foi demonstrado em *D. melanogaster*. Os dados obtidos demonstraram que *D. melanogaster* é um modelo alternativo para o estudo em larga escala da virulência de espécies do gênero *Candida*.

O bicho da seda *Bombyx mori*, mostrou-se como um hospedeiro alternativo para avaliar a virulência de *C. albicans*. Hanaoka e colaboradores (2008) utilizaram *B. mori* para avaliar um banco de cepas mutantes com o objetivo de avaliar possíveis genes codificadores de proteínas fosfatases. Os mutantes previamente conhecidos como menos virulentos para ratos mantiveram o mesmo padrão em *B. mori*.

Pukkila-Worley e colaboradores (2009) utilizaram o modelo invertebrado *Caenorhabditis elegans* para analisar a virulência de diferentes cepas de *C. albicans*, analisando a importância da formação de hifas durante o processo de infecção como fator de virulência. As cepas que eram defectivas na formação de hifas foram menos virulentas para os vermes. Os resultados obtidos apoiam a ideia de que *C. elegans* é mais uma opção para o estudo dos mecanismos de virulência fúngica.

Outros invertebrados utilizados como hospedeiros para o estudo de virulência fúngica são *Galleria mellonella* e *Tenebrio molitor*. O uso desses insetos será abordado com mais profundidade nos tópicos abaixo.

2.4. *Galleria mellonella*

Galleria mellonella, inseto pertencente a ordem Lepidoptera, família: Pyralidae vive naturalmente como parasitas de colmeias, lá se alimentam da cera, do mel e pólen. Neste ambiente, *G. mellonella* tem contato com diversos microrganismo, porém através de suas defesas ela consegue superar as infecções microbianas. Esta habilidade de montar defesa contra os microrganismos que

habitam seu meio despertou o interesse no seu uso para o estudo de patogenicidade e virulência microbiana (FUCHS *et al.*, 2010).

As larvas de *G. mellonella* têm sido extensivamente utilizadas como modelo para o estudo da patogenicidade e virulência dos microrganismos (COOK; MCARTHUR, 2013; FALLON *et al.*, 2012; JUNQUEIRA, 2012). Para avaliar o efeito do patógenos nas larvas de *G. mellonella* vários parâmetros podem ser utilizados como mudança no número de hemócitos, carga fúngica, morte das larvas, além de ser possível a realização de cortes histológicos da mesma para acompanhar o comportamento dos microrganismos durante o processo de infecção (Fallon *et al.*, 2012; Fuchs *et al.*, 2010). As vantagens deste modelo invertebrado que tem levado ao aumento da sua utilização nas pesquisas científicas são inúmeras. O baixo custo de manutenção, a facilidade de manipulação, a não necessidade de submissão dos trabalhos à regulamentação em conselhos de ética, são algumas das vantagens do uso de *G. mellonella* como alternativa aos modelos mamíferos (CHAMPION *et al.*, 2016; COOK; MCARTHUR, 2013; LIONAKIS, 2011; TSAI *et al.*, 2016).

Diferentemente da maioria dos outros modelos invertebrados estudados, as larvas de *G. mellonella* podem ser mantidas a temperatura de até 37° (CHAMPION *et al.*, 2016; COOK; MCARTHUR, 2013). Tal fator contribui para o estudo dos microrganismos na temperatura na qual eles infectam os humanos, além disso a temperatura influencia a expressão gênica, característica que pode influenciar os mecanismos de virulência dos microrganismos durante a infecção (FUCHS *et al.*, 2010). Um outro benefício apresentado por esse modelo, é que existem várias vias de inoculação já descritas, sendo elas: a aplicação tópica, oral ou injeção direto na hemocele (FUCHS *et al.*, 2010; JUNQUEIRA, 2012; RAMARAO *et al.*, 2012). A injeção na hemocele é o método mais utilizado para a inoculação de microrganismos nas larvas de *G. mellonella*. Tal método apresenta a vantagem de ter a precisão da quantidade do inóculo a ser aplicado na larva (FUCHS *et al.*, 2010).

Quanto aos mecanismos de combate a infecções microbianas a *G. mellonella* apresenta como primeira linha de defesa sua cutícula, que tem como função a prevenção ou retardo da entrada de substâncias tóxicas ou patógenos (KAVANAGH; REEVS 2004). Cecropinas e antacinas são liberadas caso haja algum ferimento na cutícula do inseto, essas moléculas apresentam uma atividade antimicrobiana (KAVANAGH; REEVES 2004).

Os insetos não possuem sistema imune adaptativo, e seus mecanismos de defesa baseiam-se no seu sistema imune inato constituído de respostas humoral e celular (FALLON et al., 2011; TSAI et al., 2016). A resposta humoral baseia-se na liberação de moléculas como certas proteínas, peptídeos antimicrobianos e melanina. A porção celular do sistema imune inato de insetos é composta pelos hemócitos, os quais atuam em processos de fagocitose, encapsulação e coagulação (KAVANAGH; REEVES 2004; SEED; DANIS, 2008; TSAI et al 2016).

Mak e colaboradores (2010) mostraram que o sistema imune de *G. mellonella* é capaz de distinguir os patógenos invasores e com isso montar um mecanismo de defesa específico contra os mesmos, conseguindo diferenciar bactérias Gram-negativas de Gram-positivas e fungos filamentos de leveduriformes. Variações na cinética de indução, concentração e tempo de permanência de peptídeos antimicrobianos (AMPs) na hemolinfa de *G. mellonella* desafiada com diferentes classes de microrganismos são observadas.

Estudo realizado por Wu e colaboradores (2016) mostrou que os hemócitos presentes na hemolinfa das larvas de *G. mellonella* são de quatro tipos: plasmatócitos, células granulares, esferulócitos e oenocitóides, sendo que as duas primeiras são as que são encontradas em maior quantidade. No mesmo estudo também demonstrou-se que plasmatócitos, células granulares e oenocitóides apresentam atividade fagocitária.

Bergin e colaboradores (2005) mostraram que os hemócitos de *G. mellonella* apresentam similaridades com os neutrófilos humanos nos mecanismos de defesa contra fungos e bactérias. O processo de fagocitose dos hemócitos de *G. mellonella*, mata os fungos e bactérias através da produção de superóxido em um processo similar aos neutrófilos.

Quando um patógeno infecta as larvas de *G. mellonella* e atinge a hemocele, os hemócitos podem fagocitar tal patógeno, ou se o mesmo for de um tamanho que impossibilite a fagocitose os mecanismos de defesa são acionados para iniciar os processos de encapsulação e consequente imobilização do invasor. Para combater os microrganismos que conseguem escapar dos componentes celulares de defesa, inicia-se a resposta imune humoral, com o aumento na expressão de peptídeos antimicrobianos (AMP) (BERGIN et al, 2006).

Os AMPs apresentam importante papel no processo de defesa contra microrganismos e estão presentes em diversas classes animais e também em plantas, e diferem entre si pelas sequências de amino ácidos, valores do ponto isoelétrico e espectro de ação antimicrobiana (CYTRYNSKA *et al.*, 2007; ZASLOFF, 2002). Em *G. mellonella* não é diferente, os AMPs são importantes componentes da defesa humoral do inseto durante a infecção por fungo e bactérias. Brown e colaboradores (2009) mostraram em seus estudos que os genes de pelo menos 18 AMPs pertencentes a 10 famílias podem ser expressos no decorrer do processo de defesa contra patógenos.

A cascata de profenoloxidase apresenta um importante papel nos mecanismos de defesa de *G. mellonella*. Ela está ligada ao processo de formação de melanina, “cross-linking” de proteínas, coagulação da hemolinfa e morte de patógenos invasores (ZDYBICKA-BARABAS *et al.*, 2014).

Como já mencionado, imunidade adaptativa não é observada em invertebrados, porém Wu e colaboradores (2016) mostraram um mecanismo em *G. mellonella* com características que se assemelham a traços da imunidade adaptativa. No estudo foi realizado uma exposição prévia das larvas de *G. mellonella* a diferentes concentrações de *Photornhabdus luminescens* mortas por calor, e depois expuseram as mesmas larvas a bactérias viáveis, verificando-se um aumento no número de hemócitos e consequente atividade de fagocitose, além de aumento na expressão de genes que codificam peptídeos antimicrobianos. Tais dados mostram que o contato prévio com o microrganismo pode levar a uma resposta imune mais rápida e eficiente em caso de posterior infecção em larvas de *G. mellonella*.

Bergin e colaboradores (2006) também mostraram em seu estudo que, mesmo a *G. mellonella* não possuindo um sistema imune adaptativo, quando exposta previamente a uma dose não letal de leveduras como *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae* ocorre a proteção das larvas quando estas são expostas previamente a 10^6 de inóculo de *C. albicans*. No mesmo estudo os pesquisadores puderam verificar que tal resultado provavelmente está ligado ao aumento na expressão de genes que codificam peptídeos antimicrobianos. Resultados semelhantes foram observados quando constituintes da parede dos fungos foram inoculadas nas larvas antes de ser realizada a infecção com a dose letal de *C. albicans*.

A produção de enzimas pelo gênero *Candida* é um fator de virulência importante para o estabelecimento de infecções fúngicas. Rossoni e colaboradores (2013) analisaram diferentes amostras clínicas de espécies do gênero *Candida* quanto a produção de fosfolipases e proteases, e utilizaram o modelo invertebrado da *G. mellonella* para verificar a virulência destas amostras. Ao final dos experimentos os pesquisadores além de mostrarem uma correlação positiva entre a produção de enzimas e uma maior virulência nas larvas, puderam demonstrar que este modelo invertebrado pode ser utilizado nas análises de virulência de espécies do gênero *Candida*.

Moralez e colaboradores (2016) utilizaram o modelo de *G. mellonella* para avaliar as diferenças na virulência de cepas de *C. tropicalis* que sofriam “switching” fenotípico. Primeiramente, os pesquisadores mostraram que, utilizando a cepa parental de *C. tropicalis*, a morte das larvas de *G. mellonella* apresentavam um padrão de virulência dose dependente. Após tal constatação os pesquisadores testaram os diferentes morfotipos de *C. tropicalis* (crepe, lisa e rugosa), para avaliar seu padrão de virulência em *G. mellonella*. Ao final do período experimental a cepa crepe, apresentou maior virulência que a lisa, sendo a rugosa a menos virulenta das três cepas testadas. Tal resultado mostra que este hospedeiro tem potencial para ser utilizado nos estudos da diferença de virulência em cepas que sofrem “switching” fenotípico

Diversos pesquisadores já vem utilizando as larvas de *G. mellonella* em suas pesquisas, principalmente para investigar virulência e patogenicidade de cepas bacterianas e fúngicas. Brennam e colaboradores (2002), em seus estudos buscaram estabelecer uma correlação da virulência de *Candida albicans* em testes realizados em larvas de *G. mellonella* e em ratos, e com os resultados obtidos sugeriram que esses insetos são modelos que podem ser utilizados como “screening” para as cepas desse fungo. Outros trabalhos como o de Li *et al.* (2013) e Fuchs *et al.* (2010) também avaliaram a virulência de *C. albicans* utilizando as larvas de *G. mellonella*, e conseguiram com isso resultados promissores e reprodutíveis. *Aspergillus fumigatus* e *Cryptococcus neoformans* são outros exemplos de fungos cuja virulência foi avaliada em larvas de *G. mellonella* (FUCHS *et al.*, 2010; REEVES *et al.*, 2004).

Assim como todo modelo animal utilizado nas pesquisas científicas, a *G. mellonella* possui suas limitações. O genótipo da *G. mellonella* ainda não foi

totalmente sequenciado, este fato impede a criação de linhagens mutantes, bibliotecas de RNAi e microarranjos. Além disso não existe uma padronização nas metodologias de criação de *G. mellonella*, a fonte alimentar e temperatura, por exemplo, não são as mesmas nos laboratórios que utilizam esse modelo. Tais variações na manutenção podem influenciar na resposta imunológica da larvas quando desafiadas com os patógenos (BANVILLE et al, 2012; COOK; MCARTHUR, 2013; TSAI et al 2016).

2.5. *Tenebrio molitor*

Um modelo invertebrado em ascensão para testes de patogenicidade e virulência é o besouro *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebridae), inseto conhecido pelos prejuízos causados aos produtores de grãos (SCHROECKENSTEIN et al, 1990). A utilização de modelos invertebrados tem sido amplamente disseminada nas pesquisas científicas, tanto pelo ponto de vista ético, quanto pelas vantagens econômicas e logísticas de se trabalhar com os mesmos (DE SOUZA et al, 2015). A facilidade de aquisição, manutenção e manipulação dessas larvas tornam o *T. molitor* um modelo promissor.

Assim como outros insetos o *T. molitor* está exposto em seu ambiente a diversos patógenos, e durante a evolução desenvolveu mecanismos para combatê-los. A imunidade inata tem um papel muito importante na infecção nos insetos, pois ela reconhece, modula e sinaliza mecanismos efetores contra os patógenos (TINDWA et al, 2013; JOHNSTON et al, 2014). Quando os patógenos rompem a barreira cuticular, rapidamente são acionados os mecanismos de defesa incluindo a fenoloxidase, algumas lisozimas e células fagocíticas (JOHNSTON et al, 2014). Um outro fato chave na defesa do *T. molitor*, e de outros insetos, é o corpo gorduroso, pois ele é responsável pela produção de peptídeos antimicrobianos que levam a respostas constitutivas durante a infecção (JOHNSTON et al, 2014).

O uso de *T. molitor* para pesquisas de patogenicidade e virulência fúngica e bacteriana ainda está no início, mas já existem trabalhos publicados que mostram a eficiência desse modelo para estes estudos. Oppert e colaboradores (2012) verificaram o perfil do transcriptoma da resposta pós intoxicação de *T. molitor* por toxina produzida por *Bacillus thuringiensis*. Haine e colaboradores (2008) mostraram que a atividade antimicrobiana da hemolinfa de *T. molitor* aumenta

durante as primeiras horas de infecção e é mantida em altos níveis durante 14 dias, quando submetidos a *Escherichia coli* ou *Bacillus subtilis*. Chae e colaboradores (2012) descobriram em seus estudos um novo peptídeo antimicrobiano de *T. molitor* que apresenta atividade contra bactérias Gram-negativas. Dorling e colaboradores (2015) mostraram em seus estudos que o *T. molitor* é um modelo útil no estudos de *Staphylococcus aureus*, pois nesse invertebrado ocorre o reconhecimento, sobrevivência e permanência desse patógeno, e que os ácidos teicóicos da parede desse patógeno, que por muitas vezes passam pelo processo de D-alanização tem um papel muito importante no estabelecimento e manutenção dessa infecção.

Pouco fungos já foram estudados utilizando as larvas de *T. molitor*, mas a tendência é que o uso deste modelo cresça visto que os resultados obtidos até o momento são extremamente promissores. Guo e colaboradores (2014) utilizaram *T. molitor* para estudar grãos infectados por diferentes espécies do gênero *Fusarium*. Eles verificaram que os insetos evitavam se alimentar dos grãos que estavam infectados com *Fusarium avenaceum*, porém não com *Fusarium proliferatum*, *Fusarium poae* ou *Fusarium culmorum*. Observaram também que as larvas que se alimentavam de grãos colonizados com *F. culmorum*, *F. avenaceum* obtiveram altas taxas de mortalidade. Os autores também conseguiram isolar micotoxinas das larvas que se alimentaram dos grãos contaminados, mostrando o potencial deste modelo para o estudo das toxinas produzidas por microrganismos. De Souza e colaboradores (2015), apresentaram em seu trabalho resultados que indicam que o *T. molitor* é um modelo eficaz para estudo da patogenicidade e virulência fúngica. Esses autores verificaram que o aumento da concentração do inóculo tanto de *C. albicans*, quanto de *Cryptococcus neoformans* amentava a mortalidade das larvas desse inseto. Neste trabalho os autores utilizaram além do controle PBS, um controle inoculado com *C. albicans* e *C. neoformans* inativados pelo calor. As larvas inoculadas com esses controles não morreram durante o período experimental. Também foram realizadas análises histológicas com as larvas de *T. molitor* inoculados com os dois fungos. Foi observado a filamentação de *C. albicans* no tecido da larva, e a formação de capsula de *C. neoformans*, importantes fatores de virulência desses fungos. Tais resultados mostram o potencial do *T. molitor* como modelo para estudo de patogenicidade e virulência fúngica.

2.6. Gênero *Candida*

Nas últimas décadas o aumento da incidência de infecções fúngicas em humanos tem ocorrido no mundo (LASS-FLÖRL et al, 2009; NUCCI et al, 2013). Inúmeros fatores contribuem para esse aumento, dentre eles uso de medicamentos imunossupressores, uso de antibióticos de amplo espectro, procedimentos cirúrgicos invasivos (HOLZHEIMER; DRALLE, 2002; KOJIC; DAROUICHE, 2004; LASS-FLÖRL et al, 2009; SILVA et al, 2012). As infecções fúngicas podem se manifestar das mais variadas formas e afetar distintos locais do corpo. Os fungos podem causar problemas na pele, mucosas, chegar a corrente sanguínea e atingir órgãos internos (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; RUPING et al, 2008; SILVA et al, 2012). As infecções hematológicas causadas pelo gênero *Candida*, candidemia, apresentam uma importante relevância clínica. Esse tipo de infecção é comum em pacientes que passam muito tempo internados em hospitais e passaram por procedimentos invasivos e/ou fizeram uso de medicamentos imunossupressores (COLOMBO et al, 2006; COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; NUCCI et al, 2010).

Juntamente com espécies do gênero *Aspergillus*, o gênero *Candida* se destaca como um dos mais importantes nas infecções fúngicas invasivas (RUPING et al, 2008). Colombo e Guimarães (2003) afirmam que o gênero *Candida* é responsável por aproximadamente 80% dos casos de infecções fúngicas em ambiente hospitalar. Normalmente o gênero *Candida* é encontrado vivendo como organismo comensal, participando da microbiota humana. *Candida* spp podem ser encontrados colonizando a cavidade oral, trato gastrointestinal, ânus, vagina e vulva de indivíduos saudáveis (SOLL, 2002). Porém, caso haja alguma alteração no sistema imunológico, esses microrganismos podem vir a causar doenças, desde manifestações cutâneas e nas mucosas, até problemas mais graves quando estes se manifestam no sangue e atingem órgãos vitais (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003).

Pessoas que apresentam as barreiras mucosas e cutâneas comprometidas, como queimados ou aqueles que passaram por procedimentos médicos invasivos, imunocomprometidos (câncer, Aids, transplantados) e prematuros, integram o grupo mais propenso a desenvolver doenças causadas pelo gênero *Candida* (COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; NUCCI et al, 2010; PFALLER; DIEKEMA, 2007).

Determinadas espécies do gênero *Candida* apresentam um grande número de fatores de virulência como formação de hifas, tigmotropismo, adesão, proteínas “heat shock”, formação de biofilme, produção de enzimas hidrolíticas, os quais se fazem importantes para a sua patogenicidade, e faz com que esse gênero esteja entre os fungos de maior importância médica (O’DONNELL et al, 2015).

O gênero *Candida* conta com aproximadamente 150 espécies, porém de todas elas, 15 já foram isoladas de pacientes e provocam infecção: *Candida albicans*, Complexo *glabrata*, *Candida tropicalis*, Complexo *parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, *Candida lusitanae*, *Candida dubliniensis*, *Candida pelliculosa*, *Candida kefyr*, *Candida lipolytica*, *Candida famata*, *Candida inconspicua*, *Candida rugosa*, e *Candida norvegensis* (YAPAR, 2014).

De todas as espécies listadas acima, *C. albicans* é a mais representativa tanto em pacientes saudáveis quanto naqueles doentes (SILVA et al, 2012; YAPAR, 2014). Nos últimos anos estudos demonstraram que as infecções por espécies não-*albicans* tem aumentado significativamente (COLOMBO et al 2007; SILVA et al, 2012). Juntamente com *C. albicans*; *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei* são as espécies mais comumente isoladas de pacientes (SILVA et al, 2012; YAPAR, 2014).

Colombo e colaboradores (2006) publicaram um estudo no qual apresentam o resultado de uma pesquisa realizada no Brasil de março de 2003 a dezembro de 2004. A partir dos dados encontrados nesse estudo, foi possível verificar a incidência das espécies de *Candida* em 719 casos de candidemia registrados no país. *C. albicans* foi a espécie prevalente, seguida de *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. pelliculosa*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. ohmeri*, *C. krusei*, *C. lusitanae*, *C. lipolytica*, *C. zeylanoides*. A frequência com que cada espécie não-*albicans* é isolada varia muito em decorrência do ambiente, região geográfica e idade e estado físico do paciente (COLOMBO et al, 2007).

Nucci e colaboradores (2013) realizaram um estudo epidemiológico na América Latina para avaliar a incidência de candidemia. Para isso os pesquisadores avaliaram amostras que foram obtidas em 7 diferentes países da América Latina. Ao final, os pesquisadores concluíram que a espécie com maior incidência foi *C. albicans*, seguida de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*.

2.7. *Candida albicans*

Candida albicans é um dos constituintes da microbiota humana, encontrado principalmente nas mucosas oral, vaginal e gastrointestinal, e na pele (BERMAN, 2006; MAYER; WILSON; HUBE, 2013; MCMANUS; COLEMAN, 2014, POULAIN, 2013, SORGO et al, 2013).

C. albicans é um fungo dimórfico apresentando-se em diferentes arranjos morfológicos de acordo com as condições ambientais, podendo ser encontradas como levedura, pseudohifa e hifa verdadeira (MCMANUS; COLEMAN, 2014; SUDBERY; GOW; BERMAN, 2004). Além disso as colônias podem aparecer com características diferentes em um evento epigenético conhecido como “switching” fenotípico (SUDBERY; GOW; BERMAN, 2004). As diferenças morfológicas muitas vezes são ocasionadas pelas diferenças nas condições ambientais a que este fungo é submetido: em condições de pH e temperatura baixos geralmente cresce na forma de levedura, pH neutro e temperatura de 37°C promove o crescimento na forma de hifas, e quando encontra-se em temperatura e pH intermediário pode ocorrer o crescimento na forma de pseudohifas (BERMAN, 2006). As alterações morfológicas tem papel fundamental durante a infecção, sendo que nesta espécie as formas filamentosas são essenciais para a invasão e colonização de diferentes tecidos e órgãos (SUDBERY; GOW; BERMAN, 2014).

Uma importante característica de *C. albicans* é a sua versatilidade em se adaptar nos mais diversos sítios anatômicos, o que lhe dá a vantagem de se adequar a diferentes pressões ambientais (CALDERONE; FONZI, 2001). Tal característica coloca a *C. albicans* à frente de outros microrganismos comensais, muitos dos quais tem especificidade por colonizar determinado local, na capacidade de provocar doença (CALDERONE; FONZI, 2001).

C. albicans é o fungo de maior prevalência no ser humano, como já citado, esta espécie vive como comensal em diferentes locais do organismo de pessoas saudáveis, porém ele atua como organismo oportunista, caso ocorram alterações no sistema imunológico pode vir a causar doença. Em imunocomprometidos, os pacientes de riscos para infecções por *C. albicans*, este fungo pode atingir a corrente sanguínea, causar infecções e até mesmo levar o paciente a morte (POULAIN, 2013; SORGO et al, 2013). Os mecanismos que *C. albicans* utiliza para colonizar e causar doença no seu hospedeiro são variados. Este

fungo faz uso de moléculas que auxiliarão nos reconhecimento do hospedeiro, como por exemplo as adesinas, moléculas que atuam na morfogênese, para assim se adaptar melhor a determinado sítio de infecção, “switching” fenotípico e secreção de proteases e fosfolipases (CALDERONE; FONZI, 2001; MAYER, WILSON, HUBE, 2013).

Estudos epidemiológicos destacam o predomínio de isolados de *C. albicans*. Parmeland e colabores (2013) realizaram um estudo verificando amostras retiradas de pacientes com candidemia em um hospital de Lyon. Ao todo os pesquisadores trabalharam com amostras colhidas em um período de 24 meses, e puderam verificar a prevalência de *C. albicans* nos isolados. Além disso compararam os dados obtidos com um estudo realizado no mesmo hospital em um período de 10 anos, encontrando o mesmo perfil de incidência das espécies do gênero *Candida*, com *C. albicans* sendo isolada em maior frequência dos pacientes com candidemia. Estudo realizado por Wille e colaboradores (2013) por um período de 11 anos em um hospital no Brasil também mostrou a prevalência de isolados de *C. albicans* frente as outras espécies do gênero *Candida* nos casos de candidemia.

2.8. *Candida tropicalis*

Candida tropicalis foi primeiramente isolada em 1910, e foi denominada *Oidium tropicale*, e a partir disso, várias outras denominações foram atribuídas a esta espécie (NEGRI et al, 2012). Apenas em 1923, Berkhout aplicou o nome *C. tropicalis* a este fungo (LARONE, 2002).

C. tropicalis pode se apresentar nas formas de blastoconídeo, pseudohifa e dependendo das condições pode formar hifas verdadeiras (NEGRI et al, 2012; YOSHIO; KOUJI, 2006).

C. tropicalis é um patógeno humano oportunista que geralmente isolado da pele, trato gastrointestinal e urinário e pode também ser encontrado no trato respiratório (BASU et al, 2003; BIASOLI et al, 2002; OKSUZ et al, 2007). Juntamente com *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* correspondem a cerca de 95% dos casos de infecções pelo gênero *Candida* (SILVA et al, 2012). *C. tropicalis* é mais comumente isolado de infecções em pacientes com neutropenia e câncer (COLOMBO et al, 2007).

Estudos epidemiológicos colocam *C. tropicalis* como a segunda ou terceira espécie isolada de casos de candidemia nas regiões tropicais (COLOMBO et al., 2007; KAUFFMAN et al, 2000; MIRANDA et al, 2009; NEGRI et al, 2012).

Alguns estudos epidemiológicos colocam a *C. tropicalis* à frente de outras espécies não-*albicans* e da própria *C. albicans* em casos de mortalidade (COLOMBO et al., 2007; EGGIMANN et al., 2003; KONTOYIANNIS et al., 2001; KRUMHOLTZ, 1999a). Tal fator pode ser explicado devido a essa espécie apresentar diversos fatores de virulência como formação de biofilme, secreção de proteínas, dimorfismo, além de apresentar certa resistência aos antibióticos comumente utilizados, como o fluconazol (KRUMHOLTZ, 1999b; NEGRI et al, 2012, MYOKEN et al, 2004; TORTORANO et al, 2003; YANG et al, 2004).

2.9. *Candida parapsilosis*

C. parapsilosis está presente como organismo comensal humano, sendo, isolado principalmente das mãos, mais comumente do espaço subungueal (BONASSOLI; BERTOLI; SVIDZINSKI, 2005; TROFA; MCGINLEY; LARSON; LEYDEN, 1988). A *C. parapsilosis* não é encontrada apenas em humanos, sendo também isolada do solo, ambiente marinho, insetos e animais domésticos (FIGUEIREDO et al, 2007; WEEMS, 1992).

Durante muito tempo *Candida parapsilosis* foi classificada em três grupos (I, II e III), devido a diversos estudos mostrarem diferenças genéticas como por exemplo nas sequências de DNA codificadoras de ribossomos (LIN et al, 1995) e sequência do gene da DNA topoisomerase II (KATO et al, 2011).

Porém, Tavanti e colaboradores (2005) realizaram análises utilizando a técnica de MLST com cepas de *C. parapsilosis* dos até então reconhecidos grupos I, II e III. Os resultados obtidos, mostraram diferenças genotípicas muito grandes entre os membros dos três grupos, diferenças tais que já vinham sendo ressaltadas por estudos anteriores. Tamanha diversidade genotípica fez com que esse autor designasse duas novas espécies além de *C. parapsilosis*, sendo elas *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*, em substituição aos grupos II e III.

Desde que os membros do Complexo *parapsilosis* foram divididos em 3 espécies distintas, alguns estudos vem sendo realizados com o objetivo de buscar diferenças nos mecanismos de virulência e patogenicidade das mesmas.

Estudo realizado por Bertini e colaboradores (2013), buscou estudar as propriedades adesivas e a patogenicidade em *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*. Nos testes realizados nos trabalhos utilizando células do epitélio bucal humano, foi possível observar uma menor capacidade de adesão da espécie *C. metapsilosis* quando comparadas com *C. parapsilosis* e *C. orthopsilosis*, as quais mostraram a habilidade de adesão similar. Nos testes simulando uma colonização do epitélio vaginal, verificou-se uma menor carga fúngica no local de *C. metapsilosis*. Bertini e colaboradores (2013) puderam mostrar com seus resultados que *C. metapsilosis* apresenta um potencial de virulência menor do que *C. parapsilosis* e *C. orthopsilosis*, as quais apresentaram comportamento semelhante nos testes realizados.

Estudo realizado por Constante e colaboradores (2014) analisaram 93 isolados clínicos, os quais foram colhidos em hospitais de diferentes locais do Brasil, em coletas realizadas de 2004-2010. Os pesquisadores verificaram que desses isolados a grande maioria era representada por indivíduos da espécie *C. parapsilosis* (~80%), seguido por *C. orthopsilosis* e depois por *C. metapsilosis*. Também verificou-se através do histórico médico dos pacientes que apresentavam infecção por *C. orthopsilosis* que os mesmos, em sua maioria, eram imunocomprometidos, o que faz com que os pesquisadores do estudo sugerissem que essa espécie é menos virulenta que a *C. parapsilosis*.

Toro e colaboradores (2011) estudaram 122 isolados clínicos de hospitais do sul da Espanha pertencentes ao Complexo *parapsilosis*. Verificaram a prevalência de *C. parapsilosis*. No mesmo estudo eles analisaram a capacidade de formação de biofilme dos isolados. Mais da metade dos isolados identificados como *C. parapsilosis* apresentaram resultados positivos nos testes de formação de biofilme, enquanto os isolados pertencentes as espécies *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* não apresentaram nenhuma amostra positiva para a formação de biofilme.

Estudos indicam que cerca de 1-10% dos casos de infecção anteriormente atribuídos a espécie *C. parapsilosis* foram na verdade causados por

indivíduos pertencentes as espécies *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*. (LOCKHART et al, 2008; SILVA et al, 2009; TAVANTI et al, 2005).

O aumento no número de casos de infecções causadas por *C. parapsilosis* está ligado a diversos fatores de risco como uso de cateter, materiais prostéticos, alimentação parenteral, quimioterapia (SILVA et al, 2012). *C. parapsilosis* é isolada comumente de pacientes neonatos, imunocomprometidos como aqueles que receberam transplantes de órgão e aqueles que recebem alimentação parenteral (TROFA et al, 2008). Diferentemente das doenças invasivas causadas por *C. albicans* e *C. tropicalis* que necessitam de uma colonização prévia, aquelas que são causadas por *C. parapsilosis* não necessitam desta colonização prévia, e são transmitidas geralmente por fontes externas como dispositivos médicos, dispositivos prostéticos, mãos de trabalhadores das unidades de saúde, e cateteres (TROFA et al, 2008).

2.9.1 *Candida glabrata*

Candida glabrata é um fungo pertencente ao gênero *Candida*, porém, previamente quando foi descoberto foi classificada como pertencente ao gênero *Torulopsis*, tal classificação foi feita de acordo com a ausência de pseudohifas. Porém no ano de 1978, foi considerado que a produção de hifas não era um fator de distinção para organismos pertencentes ao gênero *Candida*, e sugerindo-se portanto que *Torulopsis glabrata* fosse classificado dentro do gênero *Candida* (FIDEL; VAZQUEZ; SOBEL, 1999; RODRIGUES; SILVA; HENRIQUES, 2014).

C. glabrata não apresenta dimorfismo, apresentando-se apenas na forma de blastoconídeo, sendo a única espécie do gênero *Candida* que não forma pseudohifa a 37°C (FIDEL; VAZQUEZ; SOBEL, 1999; KAUR, et al, 2005). Porém estudo realizado por Csank e Haynes (2000), mostrou que a *C. glabrata* pode apresentar crescimento como pseudohifa quando mantida em meio com privação de nitrogênio tanto a 30° como a 37°C.

Como já mencionado *C. glabrata* não apresenta a capacidade de formação de hifas, além disso também perderam a capacidade de secretar proteases (KAUR et al, 2005).

Durante muitos anos *C. glabrata* foi considerado um microrganismo não patogênico, porém, com o avanço do uso de antibióticoterapia de amplo espectro e do uso de terapias imunossupressoras, foi observado aumento no número de casos de infecções causadas por este fungo (HAJJEH et al, 2004).

C. glabrata tem a capacidade de colonizar de forma comensal a boca, o esôfago, intestino e a mucosa vaginal, porém, pouco dessa interação com o hospedeiro é conhecida (ROETZER; GABALDÓN; CHÜLLER, 2011).

C. glabrata é isolada com maior frequência em adultos do que em crianças, e sua frequência é baixa em neonatos (KRCMERY; BARNES, 2002; KRCMERY, 1999a).

Khatib e colaboradores (2016), investigaram casos de infecções causadas por organismos do gênero *Candida* e encontraram uma prevalência da espécie *C. glabrata* isolados de pacientes com diabetes e de pacientes com fontes abdominais de infecções, principalmente gástricas e duodenais.

Colombo e colaboradores (2007) realizaram um estudo epidemiológico sobre candidemia em hospitais no Brasil. Neste estudo eles analisaram mais de 4300 casos de infecção sanguínea, sendo que do total, cerca de 7% eram causados por organismos pertencentes ao gênero *Candida*. Além disso, também verificaram neste estudo que existe diferença na prevalência da espécie do gênero *Candida* entre hospitais públicos e privados. Os autores apresentaram dados que revelam que depois de *C. albicans*, que é o agente principal de candidemia e o mais isolado tanto em hospitais públicos quanto privados, existe prevalência de *Candida parapsilosis* nos isolados sanguíneos de pacientes internados em hospitais públicos, ao passo que hospitais privados *C. glabrata* é encontrada com maior frequência. Em hospitais privados além da maior frequência de isolados de *C. glabrata* em hospitais privados, os autores verificaram que a maioria dos isolados apresentavam resistência ao fluconazol, que é o medicamento de escolha para o tratamento inicial.

Pouco se sabe sobre a aquisição e subsequente desenvolvimento de infecções nasocomiais causadas por *C. glabrata*. Este fungo está presente na microbiota humana, além disso estudos demonstram que ambiente contaminado e o transporte através das mãos de trabalhadores hospitalares podem ser fontes de transmissão de *C. glabrata* (ISEMBERG et al, 1989; VAZQUEZ et al, 2003).

2.9.2 *Candida guilliermondii*

C. guilliermondii foi primeiramente descrita por Castellani em 1912, a cepa era oriunda de um paciente com broncomicose no Sri Lanka (CASTELLANI, 1912).

C. guilliermondii é uma levedura aeróbica que não consegue crescer em condições de anaerobiose estrita (PAPON et al, 2013). Diferente de *C. albicans*, *C. guilliermondii* é incapaz de produzir hifas verdadeiras, porém sobre certas condições como falta de nitrogênio ou carbono no meio, este fungo pode produzir pseudohifas (KOEHLER et al, 1999).

Assim como observado em outras espécies do gênero *Candida*, *C. guilliermondii* também é capaz de sofrer “switching” fenotípico. Lastauskienè e colaboradores (2015) pesquisaram a ocorrência “switching” fenotípico em *C. guilliermondii* e se tal característica confere maior resistência a antifúngicos, como ocorre em outras espécies do gênero *Candida*. Os pesquisadores descobriram que *C. guilliermondii* é capaz de sofrer “switching” fenotípico, com suas colônias se diferenciando em brancas e marrom escura. Quanto a resistência antifúngica eles verificaram que as cepas que sofriam “switching” apresentavam maior resistência a anfotericina B e ácido acético.

Esta espécie está inserida em um complexo espécies geneticamente heterogêneo, mas fenotipicamente indistinguível composto por *C. guilliermondii*, *C. fermentati*, *C. carpophila* e *C. xestobii*, e conhecido como *C. guilliermondii* Complexo (CHEN et al, 2013; CHENG et al, 2016).

C. guilliermondii é um fungo ubíquo que pode ser isolado no solo, na água do mar, em plantas, insetos e como comensal na pele e mucosas humana (CHEN et al, 2013).

A taxa de ocorrência de infecções causadas por *C. guilliermondii* flutua entre 1-3% dependendo da região geográfica (PFALLER et al, 2006; PFALLER et al, 2012). Apesar da baixa incidência de infecções causadas por *C. guilliermondii*, a taxa de cepas resistentes a antifúngicos nessa espécie é alta quando comparadas com outras do gênero *Candida* (ARENDRUP, 2010; BEYDA; LEWIS; GAREY, 2012; PFALLER et al, 2006). Estudos já apontam cepas resistentes a diferentes classes de antifúngicos, como azóis e equinocardinas (PAPON et al, 2013; PFALLER et al, 2006; SAVINI et al, 2010).

É um fungo oportunista que afeta pacientes imunocomprometidos, que é isolado em com maior frequência em pacientes com câncer do que no restante da população hospitalar (CHEN et al, 2013; GIRMENIA et al., 2006; PFALLER et al, 2006; SAVINI et al, 2010).

As manifestações clínicas que podem estar associadas com *C. guilliermondii* são várias como: lesões de pele, onicomicose crônica, candidíase vaginal recorrente, candidúria silenciosa, periodontite, osteomielite aguda, artrite séptica, endocardite, candidemia, candidíase disseminada com falha de múltiplos órgãos (PAPON et al, 2013).

Além das características já citadas, *C. guilliermondii* também é explorada no campo biotecnológico, na produção de riboflavina e outros compostos, além de isolados também terem sido identificados com potencial para controle biológico contra outros fungos que deterioram alimentos durante sua estocagem (PAPON et al, 2013).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a eficiência de *Tenebrio molitor* como alternativa nos testes para análise da virulência de diferentes espécies pertencentes ao gênero *Candida*.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o padrão de virulência das diferentes espécies pertencentes ao gênero *Candida* no modelo alternativo *T. molitor*.
- Analisar o comportamento do modelo *T. molitor* diante de diferentes concentrações fúngicas, e verificar se o mesmo apresenta um padrão de dose-dependência.
- Comparar os resultados de *T. molitor* com *G. mellonella* submetidas aos mesmos procedimentos experimentais.

4. REFERÊNCIAS

ALMIRANTE, B.; RODRÍGUEZ, D.; CUENCA-ESTRELLA, M. et al. Epidemiology, risk factors and prognosis of *Candida parapsilosis* bloodstream infections: case-control population-based surveillance study of patients in Barcelona, Spain from 2002 to 2003. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 1681-1685, 2006.

ANDES, D.; NETT, J.; OSCHEL, P. et al. Development and Characterization of an In Vivo Central Venous Catheter *Candida albicans* Biofilm Model. **Infection and Immunity**, v. 72, n.10, p. 6023-31, 2004.

ARENDRUP, M.C. Epidemiology of invasive candidiasis. **Current Opinion in Critical Care**, v. 16, p. 445–452, 2010.

BANVILLE, N.; BROWNE, N.; KAVANAGH K. Effect of nutrient deprivation on the susceptibility of *Galleria mellonella* larvae to infection. **Virulence**, v. 3, n. 6, p. 497-503, 2012.

BARROSO, J.; AHN, I. Y.; CALDEIRA, C. et al. International harmonization and cooperation in the validation of alternative methods. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 856, p. 343-383, 2016.

BASU, S.; GUGNANI, H. C.; JOSHI, S. et al. Distribution of *Candida* species in different clinical sources in Delhi, India, and proteinase and phospholipase activity of *Candida albicans* isolates. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 20, n.4, p. 137–140, 2003.

BERGIN, D.; REEVS, E. P.; RENWICK, J. et al. Superoxide production in *Galleria mellonella* hemocytes: identification of proteins homologous to the NADPH oxidase complex of human neutrophils. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 7, p.4161-4170, 2005.

BERGIN, D. MURPHY, L.; KEENAN, J. et al. Pre-exposure to yeast protects larvae of *Galleria mellonella* from a subsequent lethal infection by *Candida albicans* and is

mediated by increased expression of antimicrobial peptides. **Microbes and Infection**, v. 8, p. 2105-2112, 2006.

BERMAN, J. Morphogenesis and cell cycle progression in *Candida albicans*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, p. 595-601, 2006.

BERTINI, A.; DE BERNARDIS, F.; HENSGENS, L. A. et al. Comparison of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* adhesives properties and pathogenicity. International **Journal of Medical Microbiology**, v. 303, p. 98-103, 2013.

BEYDA, N. D, LEWIS, R. E, GAREY, K. W. Echinocandin resistance in *Candida* species: mechanisms of reduced susceptibility and therapeutic approaches. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 46 p. 1086–96, 2012.

BIASOLI M. S.; TOSELLO, M. E.; MAGARÓ, H. M. Adherence of *Candida* strains isolated from the human gastrointestinal tract. **Mycoses**, v. 45, n.11–12, p.465–469, 2002.

BONASSOLI, L. A; BERTOLI, M; SVIDZINSKI,T.I.E. High frequency of *Candida parapsilosis* on the hands of healthy hosts. **Journal of Hospital Infection**, v. 59, p. 159-162, 2005.

BORGHI, E.; ROMAGNOLI, S.; FUCHS, B.B. et al. Correlation between *Candida albicans* biofilm formation and invasion of the invertebrate host *Galleria mellonella*. **Future Microbiology**, v. 9, n. 2, 163-173, 2014.

BRASIL. Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008 (Lei Arouca). Regulamenta o inciso 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais, revoga a Lei, nº 6. 638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências.

BRENNAN, M.; THOMAS, D. Y.; WHITEWAY, M. et al. Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 34, p. 153-157, 2002.

CALDERONE, R. A; FONZI, W. A. Virulence factors of *Candida albicans*. **Trend in Microbiology**, v. 9, n.7, p. 327-335, 2001.

CASTELLANI A. Observations on the fungi found in tropical bronchomycosis. **Lancet**, v. 1, p. 13–15, 1912.

CHAE, J.; KUROKAWA, K.; SO, Y. I. et al. Purification and characterization of tenecin 4, a new anti Gram-negative bacterial peptide, from the beetle *Tenebrio molitor*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 36, p. 540-546, 2012.

CHAMILOS, G.; LIONAKIS, M. S.; LEWIS, R. E. et al. *Drosophila melanogaster* as a facile model for large-scale studies of virulence mechanisms and antifungal drug efficacy in *Candida* species. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 193, p. 1014-22, 2006.

CHAMPION, O. L; WAGLEY, S; TITBALL, R. W. *Galleria mellonella* as a model for microbiological and toxin research. **Virulence**, v.7, n.7, p. 840-845, 2016.

CHAO, C-C.; HSU, P-C.; JEN, C-F. et al. Zebrafish as a model host for *Candida albicans* infection. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 6, p. 2512-21, 2010.

CHEN, CY.; HUANG, S. Y.; TANG, J. L. et al. Clinical features of patients with infections caused by *Candida guilliermondii* and *Candida fermentati* and antifungal susceptibility of the isolates at a medical centre in Taiwan, 2001-10. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, p. 2632-2635, 2013.

CHENG, J. W.; YU, S. Y.; XIAO, M. et al. Identification and antifungal susceptibility profile of *Candida guilliermondii* and *Candida fermentati* from a multi-center study of in China. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, p. 2187-2189, 2016.

COLOMBO, A. L.; NUCCI, M.; PARK, B. J. et al. Epidemiology of Candidemia in Brazil: a Nationwide Sentinel Surveillance of Candidemia in Eleven Medical Centers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 2816-2823, 2006.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T.; SILVA, L. R. et al. Prospective Observational Study of Candidemia in São Paulo, Brazil: Incidence rate, Epidemiology, and Predictors of Mortality. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 28, n. 5, p. 570-576, 2007.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 5, p. 599-607, 2003.

CONSTANTE, C. C.; MONTERO, A. A.; ALVES, S. H. et al. Different risk factors for candidemia occur for *Candida* species belonging to the *C. parapsilosis* complex. **Medical Mycology**, v. 00, p. 1-4, 2014.

COOK, S. M.; MCARTHUR, J. D. Developing *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens. **Virulence**, n. 4, n. 5, p. 350-353, 2013.

CSANK, C.; HAYNES, K. *Candida glabrata* displays pseudohyphal growth. **FEMS Microbiology Letters**, v. 189, p. 115-120, 2000.

DE SOUZA, P. C.; MOREY, A. T.; CASTANHEIRA, G. M. et al. *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) as an alternative host to study fungal infections. **Journal of Microbiological Methods**, v. 118, p. 182-186.

DIETERICH, C.; SCHANDAR, M.; NOLL, M. In vitro reconstructed human epithelia reveal contributions of *Candida albicans* EFG1 and CPH1 to adhesion and invasion. **Microbiology**, v. 148, p. 497-506, 2002.

DORLING, J.; MORAES, C.; ROLFF, J. Recognition, survival and persistence of *Staphylococcus aureus* in the model host *Tenebrio molitor*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 48, p. 284-290, 2015.

EGGIMANN P.; GARBINO J.; PITTET D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill nonimmunosuppressed patients. The **Lancet Infectious Diseases**, v. 3, p. 685–702, 2003.

FALLON, J; KELLY, J; KAVANAGH, K. *Galleria mellonella* as a model for fungal pathogenicity testing. **Methods in Molecular Biology**, v. 845, p. 469-485, 2012.

FIDEL, P. L; VAZQUEZ, J. A; SOBEL, J. D. *Candida glabrata*: Review of epidemiology, pathogenesis and clinical disease with comparison to *C. albicans*. **Clinical Microbiological Reviews**, v. 12, n. 1, p. 80-96, 1999.

FIGUEIREDO, V. T.; DE ASSIS, D. S.; RESENDE, M. A. et al. Identification and in vitro antifungal susceptibility testing of 200 clinical isolates of *Candida* spp responsible for fingernail infections. **Mycopathologia**, v. 164, p. 27-33, 2007.

FUCHS, B.; O'BRIEN, E.; KHOURY, J. B. et al. Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. **Virulence**, v. 1, n. 6, 475-482. 2010.

FUCHS, B.B., MYLONAKIS, E. Using non-mammalian hosts to study fungal virulence and host defense. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, p.346-351. 2006.

GÁCSEK, A.; SHÄFER, W. NOSANCHUK, J. S. et al. Virulence of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* in reconstituted human tissue models. **Fungal Genetics and biology**, v. 44, p. 1336-41, 2007.

GIRMENIA, C.; PIZZARELLI, G.; CRISTINI, F. et al. *Candida guilliermondii* funguemia in patients with hematologic malignancies. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 7, p. 2458-2464, 2006.

GUO, Z.; KÖLL, K.; DASTJERD, R. et al. Effect of fungal colonization of wheat grains with *Fusarium* spp. on food choice, weight gain and mortality of meal beetle larvae (*Tenebrio molitor*). **PLOS One**, v. 9, n. 6, p. 1-9, 2014.

HAINED, E. R.; POLLITT, L. C.; MORET, Y. et al. Temporal patterns in immune responses to a range of microbial insults (*Tenebrio molitor*). **Journal of Insect Physiology**, v. 54, p. 1090-1097, 2008.

HAIJEH, R. A.; SOFAIR, A. N.; HARRISON, L. H. et al. Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species and in vitro susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population-based active surveillance program. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 4, p. 1519-1527, 2004.

HANAOKA, N.; TAKANO, Y.; SHIBUYA, K. et al. Identification of the putative protein phosphatase gene PTC1 as a virulence-related gene using a silkworm model of *Candida albicans* infection. **Eukaryotic cell**, v. 7, n. 10, p. 1640-48, 2008.

HOLZHEIMER, R. G.; DRALLE, H. Management of mycoses in surgical patients review of the literature. **European Journal of Medical Research**, v. 7, p. 200-226, 2002.

ISENBERG, H. D.; TUCCI, V.; CINTRON, F. et al. Single-source outbreak of *Candida tropicalis* complicating coronary by-pass surgery. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, p. 1426-2428, 1989.

JACOBSEN, I. D.; GROBE, K.; BERNDT, A. et al. Pathogenesis of *Candida albicans* infections in the alternative chorio-allantoic membrane chicken embryo model resembles systemic murine infections. **PLOS One**, v. 6, n. 5, p. 1-15, 2011.

JOHNSTON, P. R.; MAKAROVA, O.; ROLFF, J. Inducible Defences Stay Up Late: Temporal Patterns of Immune Gene Expression in *Tenebrio molitor*. **Genetics of Immunity**, v. 4, p. 947-955, 2014.

JUNQUEIRA, J. C. *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens. **Virulence**, v. 3, n. 6, p. 474-476, 2012.

KATO, M.; OZEKI, M.; KIKUCHI, A. et al. Phylogenetic relationship and mode of evolution of yeast DNA topoisomerase II gene in the pathogenic *Candida* species. **Gene**, v. 272, p. 275-281, 2001.

KAUFFMAN C. A.; VAZQUEZ, J. A.; SOBEL, J. D. et al. Prospective multicenter surveillance study of funguria in hospitalized patients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 30, p. 14–18, 2000.

KAUR, R.; DOMERGUE, R.; ZUPANCIC, M. L. et al. A yeast by any other name: *Candida glabrata* and its interaction with the host. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, p. 378-384, 2005.

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.

KHATIB, R.; JOHNSON, L. B.; FAKIH, M. G. et al. Current trends in candidemia and species distribution among adults: *Candida glabrata* surpasses *C. albicans* in diabetic patients and abdominal sources. **Mycosis**, 2016.

KOEHLER A. P.; CHU, K-C.; HOUANG, E. T. S. et al. Simple, reliable, and cost-effective yeast identification scheme for the clinical laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 422–426, 1999.

KOH, A. Y.; KÖHLER, J. R.; COGGSHALL, K. T. Mucosal damage and neutropenia are required for *Candida albicans* dissemination. **PLOS Pathogens**, v. 4, n. 2, p. 1-10, 2008.

KOJIC, E.; DAROUICHE, R. O. *Candida* infections of medical devices. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 2, p. 255-267, 2004.

KONTOYIANNIS D. P.; VAZIRI, I.; HANNA, H. A. et al. Risk Factors for *Candida tropicalis* fungemia in patients with cancer. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, p. 1676–1681, 2001.

KRCMERY, V. Candidemia in cancer patients: risk factors and outcome in 140 episodes from a single cancer institution. **Acta Chemotherapy**, v. 5, p. 133–145, 1999b.

KRCMERY, V. *Torulopsis glabrata* an emerging yeast pathogen in cancer patients. **Int J Antimicrob Ag**, v. 11, p. 1–6, 1999^a.

KRCMERY, V; BARNES, A. J. Non-*albicans* *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. **The journal of hospital infection**, v. 50, p. 243-260, 2002.

LARONE, D. Medically important fungi; a guide to identification. **ASM Press**, Washington, 4^a ed, 2002.

LASS-FLORL, C. The changing face of epidemiology of invasives fungal disease in Europe. **Mycoses**, v. 52, p. 197-205, 2009.

LASTAUSKIENE, E.; CEPUTYTÈ, J.; GIRKONTAITÈ, I. et al. Phenotypic switching of *C. guilliermondii* is associated with pseudohyphae formation and antifungal resistance. **Mycopathologia**, v. 179, p. 205-211, 2015.

LI, D. D. Using *Galleria mellonella-Candida albicans* infection model to evaluate antifungal agents. **Biological Pharmaceutical Bull**, v. 36, n. 9, p. 1482-1487, 2013.

LIN, D.; WU, L. C.; RINALDI, M. G. et al. Three distinct Genotypes within *Candida parapsilosis* from clinical sources. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 7, p. 1815-1821, 1995.

LIONAKIS, L. S. *Drosophila* and *Galleria* insect model hosts. **Virulence**, v. 2, n. 6, p. 521-527, 2011.

LOCKHART, S. R.; MESSER, S. A.; PFALLER, M. A. et al. Geographic distribution and antifungal susceptibility of the newly described species *Candida orthopsilosis*

and *Candida metapsilosis* in comparison to the closely related species *Candida parapsilosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 8, p. 2659-2664, 2008.

MACCALLUM, D. M. Hosting infection: experimental models to assay *Candida* virulence. **International Journal of Microbiology**, DOI 10.1155/2012/363764, 2012.

MAK, P; ZDYBICKA-BARABAS, A; CYTRYNSKA, M. A diferente, repertoire of *Galleria mellonella* antimicrobial peptides in larvae challenged with bacteria and fungi. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 34, p. 1129-1136.

MAYER, F. L; WILSON, D; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 119-128, 2013.

McGINLEY, K. J. LARSON, E. L, LEYDEN, J. J. Composition and density of microflora in the subungual space of the hand. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, n. 5, p.950-953, 1988.

McMANUS, B; COLEMAN, D. C. Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of *Candida albicans*. **Infection, Genetic and Evolution**, v. 21, p. 166-178, 2014.

MELLADO, E.; CUENCA-ESTRELLA, M.; REGADERA, J. et al. Sustained gastrointestinal colonization and systemic dissemination by *Candida albicans*, *Candida tropicalis* and *Candida parapsilosis* in adult mice. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 38, p. 21-28, 2000.

Métodos alternativos: Histórico e Contexto. **Rede Nacional de Métodos Alternativos (RENAMA)**. Disponível em: http://renama.org.br/?page_id=109. Acesso em: 20 de outubro de 2015.

MIRANDA L. N.; VAN DER HEIJEN, I. M.; COSTA, S. F. et al. *Candida* colonisation as a source for candidaemia. **Journal of Hospital Infections**, v. 72, p. 9–16 2009.

MORALEZ, A. T. P.; PERINI, H. F.; MAIA, L. F. et al. Phenotypic switching of *Candida tropicalis* is associated with cell damage in epithelial cells and virulence in *Galleria mellonella* model. **Virulence**, v. 7, n. 4, p. 379-386, 2016.

MYOKEN, Y.; KYO, T.; FUJIHARA, M. et al. Clinical significance of breakthrough fungemia caused by azoles-resistant *Candida tropicalis* in patients with hematologic malignancies. **Haematologica**, v. 89, p. 378–380, 2004.

NEGRI, M., SILVA, S.; HENRIQUES, M. et al. Insights into *Candida tropicalis* nasocomial infections and virulence factors. *Eur. J. Clin. Microbiol.* **Infections Diseases**, v. 31, p. 1399-1412, 2012.

NETT, J. E.; MARCHILLO, K.; SPIEGEL, C. A. et al. Development and validation of an in vivo *Candida albicans* biofilm denture model. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 9, p. 3650-59, 2010.

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

NUCCI, M.; QUEIROZ-TELLES, F.; ALVARADO-MATUTE, T. et al. Epidemiology of candidemia in Latin America: A laboratory-based survey. **PLOS One**, v. 8, n. 3, p. 1-7, 2013.

O'DONNELL, L.E.; ROBERTSON, D.; RAMAGE, G. *Candida* virulence factors. Oral candidosis: Physiopathology, Decision Making, and Therapeutics. DOI 10.1007/978-3-662-47194-4_2, 2015.

OKSUZ S.; SAHIN, I.; YILDIRIM, M. et al. Phospholipase and proteinase activities in different *Candida* species isolated from anatomically distinct sites of healthy adults. **Japanese Journal Infectious Diseases**, v. 60, n. 5, p.280–283, 2007.

OPPERT, B.; DOWD, S. E.; BOUFFARD, P. et al. Transcriptome Profiling of the Intoxication Response of *Tenebrio molitor* Larvae to *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa Protoxin. **Plos One**, v. 7, n. 4, p. 1-12, 2012.

PAPON, N.; SAVINI, V.; LANOUE, A. et al. *Candida guilliermondii*: biotechnological applications, perspectives for biological control, emerging clinical importance and recent advances in genetics. **Current Genetics**, 2013.

PARMELAND, L.; GAZON, M.; GUERIN, C. et al. *Candida albicans* and non-*albicans* fungemia in an institutional hospital during a decade. **Medical Mycology**, v. 51, p. 33-37, 2013.

PFALLER M. A.; NEOFYTOS, D.; DIEKEMA, D. et al. Epidemiology and outcomes of candidemia in 3648 patients: data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH Alliance) registry, 2004–2008. **Diagnostics Microbiology and Infectious Disease**, v. 74, p. 323–331, 2012.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; MENDEZ, M. et al. *Candida guilliermondii*, an opportunistic fungal pathogen with decreased susceptibility to fluconazole: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK antifungal surveillance program. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 3551–6, 2006.

PFALLER, M. A.; JONES, R. N.; DOERN, G. V. et al. Bloodstream infections due to *Candida* species: SENTRY Antimicrobial Surveillance Program in North America and Latin America 1997-1998. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 3, p. 747-751, 2000.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; GIBBS, D. L. et al. Global Anti-fungal Surveillance Group. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, p. 1366-1377, 2010.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 1, p. 133-163, 2007.

POULAIN, D. *Candida albicans* plasticity and pathogenesis. **Critical Review in Microbiology**, DOI: 10.3109/1040841X.2013.813904, 2013.

PRESGRAVE, O.; MOURA, W.; CALDEIRA, C. et al. Brazilian Center for the Validation of Alternative Methods (BraCVAM) and the process of validation in Brazil. **Alternative to Laboratory Animals**, v. 44, n. 1, p. 85-90, 2016.

PUKKILA-WORLEY, R.; PELEG, A. Y.; TAMPAKAKIS, E. et al. *Candida albicans* hyphal formation and virulence assessed using a *Caenorhabditis elegans* infection model. **Eukaryotic Cell**, v. 8, n. 11, p. 1750-58, 2009.

QUINTIN, J.; ASMAR, J.; MATSKEVICH, A. A. et al. The *Drosophila* toll pathway controls but does not clear *Candida glabrata* infections. **The Journal of Immunology**, v. 190, p. 2818-27, 2013.

RAMARAO, N.; LEROUX, C.N.; LERECLUS, D. The insect *Galleria mellonella* as a powerful insect model to investigate bacterial pathogenesis. **Journal of visualized experiments**, doi:10.3791/4392, 2012.

RAYMUNDO, M. M.; GOLDIM, J. R. Ética da pesquisa em modelos animais. Porto Alegre, RS: **Bioética**, v. 10, n. 1, 2002.

REEVES, E. P.; MESSINA, C. G.; DOYLE, S. et al. Correlation between gliotoxin production and virulence of *Aspergillus fumigatus* in *Galleria mellonella*. **Mycopathologia**, v. 158, n. 1, p. 73-79, 2004.

RODRIGUES, C. F; SILVA, S; HENRIQUES, M. *Candida glabrata*: a review of its features and resistance. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 33, p. 673-688, 2014.

ROETZER, A; GABALDÓN, T; CHÜLLER, C. From *Saccharomyces cerevisiae* to *Candida glabrata* in a few easy steps: importante adaptations for na opportunistic pathogen. **FEMS Microbiology Letters**, v. 314, p. 1-9, 2011.

ROSSONI, R. D.; BARBOSA, J. O.; VILELA, S. F. G. et al. Correlation of phospholipase and proteinase production of *Candida* with in vivo pathogenicity in *Galleria mellonella*. **Brazil Journal of Oral Sciences**, v, 12, n. 3, p. 199-204, 2013.

RUPING, M. J. G. T.; VEHRESCHILD, J. J.; CORNELLY, O. A. Patients at High Risk of invasive Fungal Infections. **Drugs**, v. 14, p. 194-196, 2008.

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

SANCHEZ, A. A.; JOHNSTON, D. A.; MYERS, C. et al. Relationship between *Candida albicans* virulence during experimental hematogenously disseminated infection and endothelial cell damage in vitro. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 1, p. 598-601, 2004.

SANDVEN, P. Epidemiology of candidemia. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 17, p. 73-81, 2000.

SAVINI, V.; CATAVITELLO, C.; ONOFRILLO, D. et al. What do we know about *C. guilliermondii*? A voyage throughout past and current literature about this emerging yeast. **Mycoses**, v. 54, p. 434-441, 2010.

SCHROECKENSTEIN, D. C.; MEIER-DAVIS, S.; BUSH, R. K. Occupational sensitivity to *Tenebrio molitor* Linnaeus (yellow mealworm). **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 86, n. 2, p. 182-188, 1990.

SEED, K. D.; DENNIS, J. J. Development of *Galleria mellonella* as an Alternative Infection Model for the *Burkholderia cepacia* Complex. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 3, p. 1267-1275, 2008.

SILVA, A. P., MIRANDA, I. M.; LISBOA, C. et al. Prevalence, distribution, and antifungal susceptibility profiles of *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis* in a tertiary care hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 8, p. 2392-2397, 2009.

SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M. et al. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbial Reviews**, p. 288-305, 2012.

SOLL, D. R. *Candida* commensalism and virulence: the evolution of phenotypic plasticity. **Acta Tropica**, v. 81, p. 101-110, 2002.

SORGO, A. G.; HEILMANN, C. J.; BRUL, S. et al. Beyond the wall: *Candida albicans* secret(e)s to survive. **FEMS Microbiology Letters**, v. 338, p. 10-17, 2013.

SUDBERY, P; GOW, N; BERMAN, J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. **TRENDS in Microbiology**, v. 12, n. 7, p. 317-324, 2004.

SZABO, E. K.; MACCALLUM, D. M. The contributions of mouse models to our understanding of systemic candidiasis. **FEMS Microbiological Letters**, v. 320, p. 1-8, 2008.

TAVANTI, A.; DAVIDSON, A. D.; GOW, N. A. R. et al. *Candida orthopsilosis* e *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 284-292, 2005.

TINDWA, H.; PATNAIK, B. B.; KIM, D. H. et al. Cloning, Characterization and Effect of TmPGRP-LE Gene Silencing on Survival of *Tenebrio molitor* against *Listeria monocytogenes* Infection. **International Journal of Molecular Science**, v. 14, p. 22463-22482, 2014.

TORO, M; TORRES, M. J; MAITE, R. AZNAR, J. Characterization of *Candida parapsilosis* complex isolates. **Mycology**, v. 17, p. 418-424, 2011.

TORTORANO, A. M. RIGONI, A. L.; BIRAGHI, E. et al. The European Confederation of Medical Mycology (ECMM) survey of candidemia in Italy: antifungal susceptibility patterns of 261 non-*albicans* *Candida* isolates from blood. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, p. 679-682, 2003.

TROFA, D; GÁCSEK, A; NOSANCHUK, J. D. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 4, p. 606-625, 2008.

TSAI, C. J; LOH, J. M. S; PROFT, T. *Galleria mellonella* infections models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. **Virulence**, v. 7, n. 3, p. 214-229, 2016.

VAZQUEZ, J. A.; SANCHEZ, V.; DMUCHOWISK, C. et al. Nosocomial acquisition of *Candida albicans*: an epidemiologic study. **Journal of Infectious Disease**, v. 168, p. 195–201, 1993.

WEEMS, J. J. Jr. *Candida parapsilosis*: epidemiology, pathogenicity, clinical manifestations, and antimicrobial manifestation. **Clinical Infectious Diseases**, v. 14, p. 756-766, 1992.

WILLE, M. P. Historical trends in the epidemiology of candidemia: analysis of an 11-year period in a tertiary care hospital in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 3, p. 288-292, 2013.

WU, G; XU, L; YI, Y. *Galleria mellonella* larvae are capable of sensing the extern of priming agente and mounting proportionatal cellular and humoral immune responses. **Immunology Letters**, v. 174, p. 45-52, 2016.

YANG, Y. L.; HO, Y. A.; CHENG, H. H. et al. Susceptibilities of *Candida* species to amphotericin B and fluconazole: the emergence of fluconazole resistance in *Candida tropicalis*. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 25, p. 60–64, 2004.

YAPAR, N. Epidemiology and risk fator for invasive candidiasis. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 10, p. 95-105, 2014.

YOSHIO O, KOUJI G. Antigenicity of *Candida tropicalis* strain cells cultured at 27 and 37°C. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 46, n. 3, p. 438–443, 2006.

ZDYBICKA-BARABAS, A.; MAK, P.; JAKUBOWICZ, T. et al. Lysozyme and defence peptides as suppressors of phenoloxidase activity in *Galleria mellonella*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 87, n. 1, p. 1-12, 2014.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados e discussões deste trabalho serão apresentados, assim como a metodologia, na forma de artigo.

5.1. Artigo 1

Modelos invertebrados no estudo de fungos patogênicos

Aline Dias Valério¹ Ricardo Sérgio de Couto Almeida¹

¹Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR, Brasil.

Corresponding author:

Prof. Dr. Ricardo Sergio Almeida

Present/permanent address:

Departamento de Microbiologia/ Centro de Ciências Biológicas

Universidade Estadual de Londrina

Rodovia Celso Garcia Cid, Pr 445, Km 380

86.057-970, Londrina – PR, Brazil

Fone: +55 43 3371-4976

RESUMO

O uso de modelos invertebrados tem sido bastante explorado nas pesquisas científicas de um modo geral. As implicações éticas que são impostas sobre os modelos clássicos estão entre os principais motivos que propulsionaram os estudos utilizando modelos invertebrados. A presença de um sistema imune inato, que apresenta vias evolutivamente conservadas com outras classes animais, baixo custo, fácil manipulação e armazenamento são apenas algumas das vantagens de se utilizar tais modelos na pesquisa científica. O ramo da ciência que estuda virulência e patogenicidade dos microrganismos tem tomado proveito das vantagens dos modelos invertebrados e com isso ampliado o uso dos mesmos, com estudos já publicados utilizando diferentes microrganismos, muitos deles de grande relevância clínica. Além disso, estudos atuais vêm demonstrando a aplicabilidade desses modelos na triagem de compostos antimicrobianos. Nesta revisão vamos fazer um levantamento das pesquisas relacionadas ao uso dos modelos invertebrados *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Galleria mellonella*, *Acanthaboeba castellanii*, *Tenebrio molitor* e *Bombyx mori* no estudo de infecções fúngicas, abordando algumas características dos modelos, como estrutura geral e aspectos imunológicos, além de levantamento de estudos já publicados que mostram a resposta dos mesmos frente a diversas infecções fúngicas.

Palavras-chave: Infecções fúngicas, modelos alternativos, imunologia.

1. INTRODUÇÃO

Os fungos são organismos que apresentam uma ampla variedade de mecanismos de virulência contra seus hospedeiros. Tal versatilidade reflete na importância de se buscar ferramentas para o estudo dessa relação parasito-hospedeiro (CHAMILOS et al, 2007).

Modelos invertebrados vêm sendo usados há alguns anos para o estudo da relação parasito-hospedeiro. As vantagens em se utilizar destes modelos são muitas. Diferentemente dos modelos tradicionais que são submetidos a comitês de ética para a aprovação de seu uso, os modelos invertebrados podem ser utilizados sem estarem sujeitos a tais regulamentações. Além disso, os estudos em larga escala em modelos invertebrados são mais viáveis, visto que tais modelos se reproduzem em maior quantidade, são mais fáceis de armazenar e de manipular, além de serem mais baratos do que os modelos tradicionais. Outra vantagem desses modelos é seu potencial para o estudo dos mecanismos da imunidade inata dos mesmos frente a desafios com patógenos, visto que tais mecanismos são conservados evolutivamente entre invertebrados e mamíferos (LEMAITRE et al 1996; CHAMILOS et al, 2007; STEENBERGEN et al 2003; BEUTLER, 2004; LECLERC et al, 2004; CHAMILOS et al 2008).

Aliando as vantagens apresentadas pelos modelos invertebrados e a fim de ampliar a disponibilidade de modelos para o estudo da interação patógeno-hospedeiro, nas últimas décadas pesquisadores vêm desenvolvendo estudos que mostram o potencial de tais organismos para pesquisas relacionadas a interação parasito hospedeiro. Tais trabalhos mostram que várias espécies fúngicas são capazes de infectar e causar a morte de uma variedade de modelos invertebrados, como é o caso da *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* e *Galleria mellonella* (LEMAITRE et al 1996, LEMAITRE et al 1997, MYLONAKIS et al 2002, MYLONAKIS et al 2003, STEENBERGEN et al 2003, APIDIANAKIS et al 2004, ALARCO et al, 2004, CHAMILOS et al 2007).

O estudo da resposta imune humoral em insetos, ganhou força na década de 1980 com o isolamento de dois grupos de peptídeos antimicrobianos induzíveis (AMPs) da pupa de *Hyalophora cecropia* desafiada com bactéria

(STEINER, et al, 1981) Estudos posteriores, apresentaram mais grupos de peptídeos antimicrobianos (FERRANDON et al 2007).

A primeira linha de defesa dos modelos invertebrados é a barreira epitelial, que muitas vezes é reforçada por camadas de quitina e baixo pH. Quando esta barreira é rompida, e ocorre a invasão dos microrganismos, respostas imunes celulares e humorais são rapidamente acionadas, mecanismo semelhante ao encontrado em mamíferos (GILLESPIE; KANOST, 1997; LECLERC et al 2004; TZOU et al 2002; HOFFMANN, et al 2002; BRENNAN et al 2004; CHAMILOS et al 2007,).

Os insetos possuem somente imunidade inata e a trajetória da defesa imunológica é moldada por um processo constituído de duas fases. Imediatamente após o contato com os patógenos ocorre a ativação da cascata proteolítica na hemolinfa (que leva a melanização dos microrganismos invasores) e as respostas celulares (FERRANDON et al 2007; JOHNSTON; MAKAROVA; ROLFF, 2014). A fase subsequente é caracterizada pela defesa induzível que envolve a produção de AMPs que eliminam ou suprimem os microrganismos remanescentes (JOHNSTON; MAKAROVA; ROLFF, 2014).

Dadas as vantagens citadas acima do uso de modelos invertebrados para o estudo de diversos fenômenos biológicos, principalmente no estudo da patogênica microbiana, a presente revisão tem como objetivo reunir informações gerais dos modelos invertebrados mais utilizados na atualidade e apresentar os principais estudos que fazem uso de tais modelos para a investigação de infecções fúngicas. Os modelos escolhidos para o trabalho foram: *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Galleria mellonella*, *Acanthaboeba castellanii*, *Tenebrio molitor* e *Bombyx mori*. Será dado enfoque nas pesquisas envolvendo os fungos dos gêneros *Cryptococcus*, *Candida* e *Aspergillus* para os três primeiros hospedeiro invertebrados, uma vez que esses modelos são os mais extensivamente estudados.

Drosophila melanogaster

Um modelo invertebrado utilizado para os estudos de relação parasito-hospedeiro é *Drosophila melanogaster*. As variedades de ferramentas de genômica, incluindo microarranjos completos do genoma e bibliotecas de interferência de RNA fazem que esse modelo seja aplicável nos estudos parasito-

hospedeiro, principalmente no que se diz respeito ao uso de tais informações genéticas disponíveis para a identificação de genes relacionados ao sistema imunológico. (DE GREGORIO et al 2001; TAUSZIG et al, 2000; MYLONAKIS et al 2007)

D. melanogaster não possui sistema imune adaptativo, porém apresenta resposta imune inata similar à de mamíferos (HOFFMAN et al, 1999; ALARCO et al, 2004). Quando esse gênero é desafiado por um patógeno, é ativada a via de sinalização Toll evolutivamente conservada, que leva uma resposta rápida com a liberação de peptídeos antimicrobianos na hemolinfa do inseto (LEMAITRE et al, 1997; ZANETTE et al 2013)

A síntese de peptídeos antimicrobianos (AMPs) pelo corpo gorduroso, induzida pelo desafio contra patógenos em *D. melanogaster*, é a característica marcante da defesa contra microrganismos neste inseto. (FERRANDON et al 2007). Estudos genéticos dos AMPs de *D. melanogaster*, mostraram que a expressão dos genes de AMP dependem de dois membros do fator nuclear k-B (NF-kB) família de transativadores induzíveis: DIF (Dorsal-Related Immunityfactor) e Relish, sendo que o primeiro é preferencialmente ativado frente a infecções fúngicas e de bactérias Gram-positivas e o segundo em infecções causadas por bactérias Gram-negativas. (TZOU et al., 2002; FERRANDON et al., 2007).

A ativação do DIF e Relish ocorre através de duas cascatas de sinalização distintas, a do Toll e a imuno deficiente (IMD), respectivamente (Lemaitre et al., 2007; Ferrandon et al., 2007). Essas vias apresentam muita similaridade com Toll Like Receptors (TLR) e Fator de Necrose Tumoral (TNF) de vertebrados, sugerindo uma raiz evolucionária comum (ZAIDMAN-RÉMY et al, 2006).

D. melanogaster é capaz de montar uma resposta eficiente contra invasões fúngicas ativando a via Toll conservada evolutivamente. Quando o inseto é desafiado por fungos, a ativação da via de Toll leva a rápida e seletiva introdução de peptídeos antimicrobianos, geralmente drosomicina (Drs) e Metchnikowin (Mtk), dentro da hemolinfa e leva *D. melanogaster* a combater com sucesso a maioria das infecções fúngicas. (LEMAITRE et al., 1996; ALARCO et al., 2004; LEMAITRE et al., 2007; CHAMILOS et al., 2008,)

As moscas selvagens são resistentes a infecções por várias espécies fúngicas. Estudo realizado por Chamilos e colaboradores (2006) mostrou

que exemplares selvagens de *D. melanogaster* são resistentes a infecções por *C. albicans*, mesmo aumentando a concentração do inóculo. Como mencionado anteriormente, a via de sinalização Toll está diretamente ligada à resposta contra fungos em *D. melanogaster*. Estudos mostraram que moscas mutantes para essa via de sinalização eram sensíveis a infecções fúngicas, e que o nível de sensibilidade é inóculo dependente (ALARCO et al., 2004; LIONAKIS et al 2005; CHAMILOS et al, 2006; CHAMILOS et al, 2008), dessa forma, tais mutantes são utilizados para o estudo de infecções fúngicas em *D. melanogaster*.

Zanette e colaboradores (2013) usaram *D. melanogaster* como modelo para estudar a pitiose, doença previamente restrita a plantas, mas que tem sido relatada em animais e nos seres humanos, cujo agente causador é o zigomiceto *Pythium insidiosum*. Neste estudo eles utilizaram moscas Toll mutantes, e como resultado verificaram que as mesmas eram mais susceptíveis ao patógeno do que as selvagens, com isso mostraram a importância da via de sinalização de Toll. Além disso, eles investigaram dados prévios da literatura que indicavam que o ferro tem papel importante na pitose. Para isso eles acrescentaram ferro na alimentação dessas moscas, e obtiveram resultados mostrando que as moscas selvagens permaneceram resistentes a infecção e que as Toll-deficientes não apresentaram aumento na mortalidade.

Alarco e colaboradores (2004) mostraram em seus estudos que a levedura *Candida albicans* pode infectar *D. melanogaster*. Usando uma cepa de *C. albicans* marcada com fluorescência, eles observaram que uma hora após a inoculação, era possível observar o fungo ao redor do local da injeção. Em algumas moscas, foi possível observar que *C. albicans* infectou tecidos vizinhos ao local da injeção, levando em alguns casos na multiplicação do fungo em toda a cavidade corpórea de *D. melanogaster*. Os dados do estudo ainda mostraram que *C. albicans* se alastra em *D. melanogaster* principalmente na forma de pseudohifa. O estudo também mostrou que exemplares selvagens de *D. melanogaster* são resistentes a infecção com *C. albicans* SC5314, com um percentual de sobrevivência de 85%, 48h pós-infecções. Quando a *C. albicans* é reconhecida como patógeno pela *D. melanogaster*, há a ativação da via de sinalização Toll, induzindo aumento nos níveis de drosomicina.

Brunke e colaboradores (2015) realizaram um trabalho com o objetivo de comparar os modelos utilizando *D. melanogaster* e o rato no estudo da

virulência de cepas mutantes de *Candida glabrata*. Os autores avaliaram e compararam o padrão de morte das moscas infectadas com as diversas cepas e avaliaram a carga fúngica em diferentes órgãos do rato, encontrando uma boa relação entre os dois modelos. Com os resultados obtidos os autores demonstraram que *D. melanogaster* apresenta potencial para funcionar como modelo para realização de screening de microrganismos mutantes, e estimado quais delas apresentou maior ou menor virulência no modelo vertebrado.

No trabalho realizado por Lionakis e colaboradores (2005), foi verificada a eficiência do uso de *D. melanogaster* como modelo para o estudo de aspergilose invasiva, e também foi testado a sua eficiência para testes de antifúngicos. Nos experimentos os autores testaram três diferentes métodos de inoculação do fungo (injeção, ingestão, e rolamento), sendo que em todos foi possível observar a infecção da *Drosophila* Toll mutante. Quanto aos testes sobre a eficiência de antifúngicos (voriconazol e terbinafina), mostrou-se que as moscas que se alimentaram de ração acrescida desses dois antifúngicos foram menos susceptíveis a infecção do que o grupo controle, confirmando os resultados desses antifúngicos contra *Aspergillus* em testes in vitro e em outros modelos animais já realizados, comprovando o potencial do uso de *D. melanogaster* tanto para o estudo de aspergilose invasiva, quanto para o estudo da eficácia das drogas antifúngicas.

Chamilos e colaboradores (2006) verificaram em seu estudo que em exemplares de moscas Toll mutantes, a injeção de *C. albicans* resulta em infecção aguda e baixa taxa de sobrevivência. Além disso, essa taxa de sobrevivência era dose dependente, de acordo com a quantidade de inóculo usada. Pelo trato intestinal ser considerado uma importante rota de entrada para *Candida* spp, testou-se uma rota alternativa para a infecção, mantendo *D. melanogaster* em frasco contendo uma camada de *Candida* como alimento, porém as moscas tanto selvagens quanto Toll mutantes foram resistentes a infecção. No estudo também foi realizada a comparação da virulência de diferentes espécies de *Candida* em *D. melanogaster* Toll mutantes. Isolados de *C. albicans*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* foram testados, sendo que o último apresentou maiores taxas de sobrevivência quando comparados as outras duas espécies. Foram também utilizados mutantes de *C. albicans* defectivos na filamentação e comprovadamente menos virulentos em ratos. Os Toll mutantes infectados por essas cepas também apresentaram maior taxa de sobrevivência do que os infectados com a cepa isogênica.

Mesmo sendo de conhecimento que *D. melanogaster* selvagem apresenta resistência a infecção por vários fungos, o estudo de Chamilos e colaboradores (2008) com a utilização de isolados clínicos de Zigomicetos, demonstrou que mesmo as moscas selvagens, são suscetíveis as infecções por esporos desse fungo. Análises histológicas sugerem que esse fungo se espalha rapidamente através da hemolinfa da *D. melanogaster*, filamenta-se e invade outras estruturas do corpo da mosca, causando infecção aguda e altas taxas de mortalidade. Mesmo as moscas selvagens sendo suscetíveis a infecção por Zigomicetos, e tendo uma taxa de morte elevada em 48h (~65%), ainda assim os mesmos experimentos realizados utilizando as moscas deficientes na via Toll, apresentam-se mais sensíveis a infecção fungica, atingindo taxa de mortalidade em 48h de aproximadamente 95%. Esses resultados reafirmam a importância da via Toll na proteção contra fungos. Para confirmar a importância dos peptídeos antimicrobianos na defesa, os pesquisadores utilizaram moscas transgênicas, que expressavam constitutivamente o peptídeo drosomicina, e verificaram que quando esses insetos eram infectados com Zigomicetos eles eram menos sensíveis a infecção do que os do grupo controle (CHAMILOS et al 2008).

D. melanogaster já é estudada há certo tempo, principalmente nos campos da genética. Tais estudos deram mecanismos, e mostraram o potencial desse modelo no estudo da interação patógeno-hospedeiro. Fácil cultivo, baixo custo, ferramentas genômicas a disposição, são apenas algumas das vantagens que colocam *D. melanogaster* como modelo invertebrado a ser explorado. Algumas desvantagens apresentadas por este modelo são o pequeno tamanho e a faixa de temperatura de trabalho que varia de 18-30° (DESALERMOS; FUCHS; MYLONAKIS, 2012), limitando assim o estudo de alguns mecanismos de virulência que podem ser influenciados pela temperatura.

Caenorhabditis elegans

Caenorhabditis elegans é um nematódeo de vida livre, e devido a esse comportamento encontra-se sempre em contato com muitos microrganismos presentes no ambiente (SIFRI et al., 2005). Para sobreviver em um ambiente no qual constantemente se depara com microrganismos *C. elegans* desenvolveu diversos mecanismos de defesa (SIFRI et al, 2005). Tal característica despertou o interesse

no uso desses nematódeos para o estudo de patogenicidade bacteriana e fúngica. Estes estudos são facilitados pelo modo de infecção neste organismo. A infecção de *C. elegans* pode ser realizada trocando-se a sua fonte alimentar tradicional (*Escherichia coli* OP50) pelo microrganismo a que se quer estudar (MYLONAKIS et al., 2002; SIFRI et al., 2005). Já foi comprovado que mesmo *C. elegans* se alimentando comumente de bactérias, quando lhe é oferecido leveduras, o mesmo consegue nutrir-se (Mylonakis et al., 2002). Espécies não patogênicas de *Cryptococcus* foram utilizadas com sucesso como alimento para o verme (MYLONAKIS et al 2002).

Dentre os mecanismos de defesa contra patógenos de *C. elegans*, a epiderme, rica em colágeno, apresenta-se como uma barreira para o ambiente com papel crucial na defesa desse organismo contra patógenos (PUJOL et al 2008). Rompida essa barreira o patógeno adentra a hemocele do animal, atinge os tecidos e instala-se a infecção.

C. elegans reage contra infecção ativando genes que codificam mecanismos de defesa. Neste nematódeo o gene *nlp-29*, tem sua expressão aumentada frente a uma infecção fúngica. Tal gene é responsável por codificar a produção de peptídeos antimicrobianos (PUJOL et al 2008; FEKETE, 2008; ZEIGLER 2009). Quando *C. elegans* é submetido a uma infecção fúngica observa-se a regulação positiva de alguns genes peptídicos, os quais, em parte, tem sua expressão controlada por uma proteína do nematódeo, ortóloga ao SARM humano, o TIR1 (COUILLAULT et al, 2004). Aparentemente *C. elegans* não apresenta alguns mecanismos de defesa presentes em outros invertebrados, como as vias Toll e Imd e algumas ferramentas de defesa celular como a fagocitose (KURZ et al 2003; COUILLAULT et al, 2004; FERRANDON et al 2007; CHAMILOS et al, 2008).

Vários estudos vêm demonstrando resultados satisfatórios no uso de *C. elegans* para interação de parasito hospedeiro. Estudo realizado por Mylonakis e colaboradores (2002) mostrou que *C. elegans* pode ser morto por *Cryptococcus neoformans* e que os mesmos fatores que contribuem com sua virulência em mamíferos, como por exemplo, sua cápsula polissacarídica, também está envolvida na virulência neste nematódeo.

Peleg e colaboradores (2008) estudaram a interação de microrganismos procariotos e eucariotos utilizando como modelo, *C. elegans*. Neste estudo eles observaram que após a co-infecção com *Acinetobacter baumannii* e

Candida albicans, a bactéria atua inibindo a filimentação do fungo, levando a atenuação da virulência do mesmo. Cruz e colaboradores (2012) também utilizaram o nematódeo *C. elegans* como modelo para estudos de co-infecção. Esses autores verificaram que ao co-infectar o *C. elegans* com a bactéria *Enterococcus faecalis* com a levedura *C. albicans*, tais microrganismos colonizam o intestino do nematódeo, porém a bactéria impede a filimentação da levedura (importante fator de virulência) impedindo a morte do nematódeo.

C. elegans pode ser utilizado como modelo para o estudo da patogênese de *C. albicans*. Estudos mostram que ao ser ingerido, *C. albicans* coloniza o trato intestinal do nematódeo, posteriormente, inicia-se o processo de filimentação que leva a invasão de tecidos com perfuração da cutícula de *C. elegans*. Ainda utilizando *C. elegans*, é possível comprovar a importância da filimentação na patogênese desse fungo, visto que ao se infectar o verme com cepas mutantes de *C. albicans* cujo processo de filimentação é afetado, verifica-se uma redução da virulência do fungo. Tais resultados salientam a importância da filimentação na virulência de *Candida* e ainda demonstra que tal processo, já descrito como sendo importante na infecção de modelos murinos se repete em *C. elegans*. Quando comparado com outros modelos invertebrados já utilizados para o estudo da patogênese de microrganismos do gênero *Candida*, *C. elegans* apresenta algumas vantagens. A transparência do corpo desse verme auxilia na observação das células fúngicas em cada estágio de infecção, além disso, a formação de hifas pode ser identificada facilmente com auxílio de microscópio. Assim como na infecção humana por *C. albicans*, a porta de entrada para o microrganismo em *C. elegans* também é o trato gastrointestinal (PUKKILA-WORLEY et al 2009). Huang e colaboradores (2014) utilizaram *C. elegans* como ferramenta para estudar os mecanismos de virulência do fungo dimórfico *Penicillium marneffeii*, um fungo oportunista que infecta pacientes imunocomprometidos. Os pesquisadores verificaram que quando *C. elegans* ingere este fungo, tanto no meio líquido quanto no sólido, o verme morre. Ainda observaram que a cepa que produzia filimentação e o pigmento vermelho era mais virulenta, mostrando assim que tais fatores podem ser críticos para a virulência de *P. marneffeii*.

C. elegans também foi testado como modelo para o estudo das reações da imunidade inata frente a um desafio com o patógeno *Histoplasma capsulatum*. Neste estudo os pesquisadores constataram que ao alimentar o verme

com leveduras vivas a mortalidade do mesmo ultrapassa os 90 % em um período de 48-72 horas. O mesmo não foi observado quando *C. elegans* foi alimentado com leveduras mortas por temperatura, sendo que nessas condições os vermes morreram em tal proporção depois de 10-14 dias. Quando comparada a taxa de letalidade dos nematódeos alimentados com uma cepa não virulenta de *H. capsulatum* e uma cepa morta por temperatura a primeira leva os vermes a morte com maior eficiência do que a última. Tais estudos realizados por Johnson e colaboradores (2009) mostram o potencial do uso de *C. elegans* como modelo para o estudo das reações do sistema imune inato frente ao desafio por um patógeno.

Bombyx mori

O inseto *Bombyx mori*, popularmente conhecido como bicho da seda, tem um potencial econômico bastante explorado devido ao seu papel na produção de seda. Além disso, na pesquisa científica, a utilização deste invertebrado tem sido bastante explorada nos campos genéticos e imunológicos (HOU et al, 2013).

Muitos estudos de patogenicidade microbiana têm sido realizado utilizando *B. mori* como modelo alternativo. Concomitante a tais pesquisas, avanços nos estudos de imunidade deste invertebrado também se fazem necessários para o entendimento dos seus mecanismos de defesa contra a invasão microbiana.

Durante o processo de invasão por microrganismos, a imunidade inata tem papel fundamental como primeira linha de defesa. No início da infecção são liberados pelo corpo gorduroso do inseto grandes quantidades de peptídeos antimicrobianos. Assim como em outros insetos, em *B. mori*, a expressão da maioria dos genes antimicrobianos é silenciada, sendo induzida quando o inseto é exposto a uma infecção microbiana (MORISHIMA et al, 1997; CHENG et al 2007). Durante esse processo os receptores Toll-like (TLRs) tem papel de indução da imunidade inata e nas respostas inflamatórias. Em *B. mori*, Cheng e colaboradores (2007) identificaram 11 supostos receptores relacionados com a via Toll e dois análogos. Os mesmos pesquisadores verificaram por análises de microarranjo que, assim como em *Drosophila*, os TLRs em *B. mori* podem tem atividade durante a embriogênese, já que verificaram uma alta expressão nos ovários desse inseto. Além da expressão nos ovários, no mesmo estudo verificou-se que os TLRs também

são expressos em grande quantidade no trato intestinal de *B. mori*, sugerindo assim que esses receptores também atuam nos processos imunológicos.

Como já mencionado, os peptídeos antimicrobianos tem um papel importante na defesa contra microrganismos em vários organismos, e não é diferente em *B. mori*. O peptídeo antimicrobiano CM4, da família das cecropinas e encontrado em *B. mori*, já teve sua atividade comprovada contra bactérias e algumas células cancerígenas. Sua ação está na capacidade desse composto em formar poros ou canais de íons nas membranas celulares e com isso prejudicar a homeostase celular (Zhang et al 2008). Zhang e colaboradores verificaram a ação do CM4 contra *Aspergillus niger*. Esses autores verificaram que o fungo sofreu a ruptura de suas membranas, notando-se a presença de vacúolos, os conídios passaram a apresentar morfologia irregular, o citoesqueleto foi destruído, ocorreu a ligação do composto no DNA fúngico e ocorreu um decréscimo da atividade mitocondrial, quando utilizado a concentração mínima inibitória de CM4 (8µM).

Outro mecanismo de defesa contra microrganismos encontrado em *B. mori* são os inibidores de proteínas, os quais são encontrados em grande quantidade em sua hemolinfa. Eguchi e colaboradores (1994) verificaram que um inibidor de proteínas com atividade contra fungos (FPI-F) se mostrou ativo contra *Beauveria bassiana* e *Aspergillus melleus*. O estudo deste composto além de auxiliar a elucidação dos mecanismos envolvidos no processo de defesa contra patógenos de *B. mori*, também possibilita o surgimento de ferramentas para que estudos futuros quanto a atividade desse composto, e sua ação direta contra fungos.

A cecropina A é uma proteína expressada em vários tecidos de *B. mori*, sendo que sua expressão sofre variação de acordo com o tecido e de acordo com o estágio larval do inseto. Lu e colaboradores (2016) realizaram testes que mostraram a alta atividade antifúngica da cecropina A contra *B. bassiana*, impedindo o crescimento e o desenvolvimento do fungo.

B. mori apresenta em sua hemolinfa duas lipoproteínas de 30-kDa (6G1 e 19G1), cuja síntese ocorre no corpo gorduroso do inseto. A lipoproteína 6G1 mostrou-se capaz de se ligar com glucanas de fungos invasores e assim disparar a cascata da profenoloxidase durante o processo de defesa contra esse patógeno (UJITA et al 2014). Em estudo realizado por Ujita e colaboradores (2014), verificou-se que além dos papéis descritos anteriormente da lipoproteína 6G1 no

reconhecimento fúngico e gatilho para cascata da profenoloxidade, ela também afeta o processo de filamentação do fungo entomopatogênico *Paecilomyces tenuipes*.

Em estudo realizado por Hou e colaboradores mostrou que logo após a injeção de conídeos de *B. bassiana* em *B. mori*, observa-se um aumento na expressão de genes que codificam proteínas de armazenamento, as quais apresentam importante papel durante o crescimento, desenvolvimento e metamorfose por serem utilizadas como fonte de nutrientes. O aumento na expressão desses genes pode estar ligado à tentativa de controlar a proliferação do fungo no primeiro estágio de infecção. O gene codificador da Transferrina também tem sua expressão aumentada durante os primeiros estágios de infecção, a atuação de tal composto também pode estar ligado a tentativa de inibir a proliferação do microrganismo, afetando a expressão gênica de *B. bassiana* nas células hospedeiras de *B. mori*.

Hanaoka e colaboradores (2008) confirmaram em seus estudos que *B. mori* apresenta-se como modelo válido para “screen” de cepas mutantes de *C. albicans*. No estudo realizado por este grupo, foram utilizadas cepas mutantes de *C. albicans* nulas para genes que codificam fosfatase, os quais já tinham apresentado como avirulentos ou com virulência reduzida no modelo utilizando camundongos. Quando as cepas foram utilizadas na infecção de *B. mori*, verificou-se o mesmo comportamento que no modelo vertebrado, as cepas apresentaram-se com baixa ou virulência nula, tal resultado reforça a idéia da utilização de modelos invertebrados, neste caso de *B. mori*, como metodologia de screen para testes de virulência de microrganismos.

Matsumoto e colaboradores (2011) analisaram o potencial do uso de *B. mori* para o estudo da eficácia de antifúngicos contra *Cryptococcus neoformans*. No estudo eles utilizaram diferentes classes de antifúngicos encontrando resultados condizentes com os previamente obtidos em modelos mamíferos. Tais resultados mostram que o modelo invertebrado *B. mori* pode ser utilizado no estudo da terapêutica das drogas antifúngicas.

Assim como outros modelos invertebrados o *B. mori* apresentam vantagens como: redução nos custos de manutenção dos animais, fácil armazenamento e manipulação dos mesmos, uso de menor quantidade de drogas no estudo devido ao tamanho reduzido. Outra característica importante é que diferente de outros modelos invertebrados já padronizados, como *D. melanogaster*,

por exemplo, o *B. mori* pode ser mantido a uma temperatura de até 37°C, fator importante nos estudos de patogenicidade microbiana e na farmacocinética de drogas (MATSUMOTO et al, 2011).

Galleria mellonella

G. mellonella é uma mariposa (Lepidoptera: Pyralidae) de tamanho médio, cujas larvas vivem em colméias, alimentando-se das ceras dos favos. O inseto pode ser mantido a uma temperatura entre 25°C a 37°C, que o torna adequado para estudar agentes patogênicos na temperatura do corpo humano (LI et al., 2013). É uma vantagem em relação à *D. melanogaster* e *C. elegans*, que não toleram temperaturas tão altas, sobrevivendo apenas à temperatura ambiente (DESALERMOS; FUCHS; MYLONAKIS, 2012). Nesses modelos, os fungos não são estudados nas condições em que são patogênicos para os humanos e essas variações de temperatura podem afetar a expressão dos genes (FUCHS et al., 2010).

O genoma de *G. mellonella* ainda não foi completamente sequenciado (LIONAKIS, 2011). Entretanto, já foram caracterizadas algumas das sequências dos genes que transcrevem o aparato imunológico da mariposa (DUNPHY; THURSTON, 1990). Isso levou ao conhecimento de microarranjos de genes e facilitou os estudos a respeito da sua resposta imunológica inata e de seus mecanismos antifúngicos, além de possibilitar sua utilização como modelo alternativo.

A resposta imunológica dos insetos aos microrganismos envolve uma mudança na população de células circulantes e a síntese de novas proteínas (MORTON; DUNPHY; CHADWICK, 1987). A publicação mais atualizada a respeito dos hemócitos de *G. mellonella* utilizou como parâmetro aspectos da morfologia, tamanho e propriedades e revelou que a mariposa possui quatro classes de hemócitos que são os esferulócitos, oenocitóides, plasmatócitos e granulócitos (WU, et al. 2016). Um estudo anterior apontou a existência de mais uma classe de hemócitos, os prohemócitos (STRAND; PECH, 1995). Essas células foram classificadas como células embrionárias que, aparentemente podem ser encontradas na hemolinfa e não foram identificadas na publicação mais recente por

estarem em constante diferenciação (WU, et al. 2016; YAMASHITA; IWABUCHI, 2001)

Os hemócitos dos insetos, em geral, estão envolvidos na fagocitose e formação de nódulos. No processo de fagocitose ocorre a endocitose dos microrganismos que são internalizados em uma vesícula (DUNN, 1986). A fagocitose atua como mecanismo de defesa primário contra um número pequeno de microrganismos (RATCLIFFE; WALTERS, 1983). Quando há uma grande concentração dos agentes patogênicos a fagocitose é aumentada e ocorre a formação de nódulos onde as células do sistema imunológico e os patógenos circulantes são englobados em uma matriz extracelular (HOROHOV; DUNN, 1983; RATCLIFFE; WALTERS, 1983). Esses agregados de células se aderem aos tecidos e tornam-se melanizados (DUNN, 1986).

Os microrganismos fagocitados morrem através da ação das espécies reativas de oxigênio secretadas dentro dos fagócitos. *G. mellonella* produz proteínas homólogas às proteínas produzidas pelos neutrófilos, a gp91phox, p67phox, p47phox e a proteína rac 2 GTP-ligante, integrante dos mecanismos de morte oxidativa (SLEPNEVA et al., 2003; BERGIN, 2006). Essa descoberta torna *G. mellonella* um modelo ideal para o estudo dos mecanismos da imunidade inata. Esse modelo, diferentemente dos modelos invertebrados com tamanho muito reduzido, permite a utilização da hemolinfa nos ensaios, uma vez que é possível calcular a densidade dos hemócitos na hemolinfa e realizar o ensaio de fagocitose *in vivo* (GOMEZ-LOPEZ, 2014; MESA-ARANGO et al., 2013; SCORZONI et al., 2013).

Um fator envolvido na imunidade dos insetos é a cascata profenoloxidase. Ela induz a melanização do animal e isso acontece pela transformação da profenoloxidase em sua forma ativa, a fenoloxidase, uma enzima-chave que leva a formação de melanina em locais de feridas e ao redor de microrganismos que penetraram na hemolinfa (DUNPHY; THURSTON, 1990). A atividade de fenoloxidase em *G. mellonella* foi encontrada nos oenocitóides, plasmatócitos e granulócitos (WU, et al. 2016). A melanização nesse modelo é de fácil observação e pode ser utilizada como um parâmetro nos estudos. Por exemplo, Scorzoni et al. (2013) mostrou que houve uma diminuição gradativa da melanização em larvas desafiadas com *Candida krusei* e tratadas com antifúngicos, conforme se aumentava a dose do antifúngico administrada.

Estudos comprovam a existência de uma possível ligação entre a fenoloxidase e o sistema de coagulação, embora os mecanismos moleculares exatos que controlam esta interação são complexos e ainda não estão bem esclarecidos (ELEFThERIANOS; REVENIS, 2011). A coagulação é importante, pois, evita a perda de hemolinfa, ajuda na cicatrização das feridas e atua formando uma barreira limitando a disseminação dos microrganismos, facilitando assim a sua eliminação (BIDLA et al., 2005).

Em relação à resposta imunológica humoral de *G. mellonella*, a mariposa possui uma proteína, a Apolipoforina III que possui atividade antimicrobiana. Inicialmente ela havia sido descrita com função de transportar lipídio para os músculos do vôo (JEFFERY, 1999), porém, anos mais tarde descobriu-se que a proteína também é expressa em resposta a uma infecção. Ao se tratar de fungos, ela atua ligando-se a um componente da membrana desses organismos, o β -1,3-glucano, facilitando o reconhecimento das células fagocíticas (WHITTEN et al., 2004).

G. mellonella também produz um peptídeo termoestável, o Inibidor de Metaloproteinase de Inseto (IMPI) que inibe as metaloproteinases produzidas por microrganismos durante uma infecção. Essas proteinases secretadas no corpo do inseto são responsáveis pela degradação de um amplo número de proteínas da hemolinfa, criando fragmentos de peptídios que estimulam a resposta imunológica do inseto (ALTINCICEK et al., 2008). Dessa forma com a produção do IMPI a mariposa se protege contra a digestão protéica.

A mariposa assim como os mamíferos também produz lisozima como parte da sua imunidade inata. A lisozima tem propriedade anfipática e catiônica, a sua carga positiva promove a ligação aos fosfolipídios aniônicos da membrana dos fungos enquanto que a sua característica anfipática promove a interação com os mesmos, comprometendo a integridade da membrana e levando à morte celular (LI et al., 2012). A ação dessa proteína já foi demonstrada quando o inseto foi desafiado com *C. albicans* (SOWA-JASIŁEK et al., 2014).

Os AMPs produzidos pelos organismos eucariotos são classificados em três tipos baseando-se nas suas estruturas: (i) peptídeos helicoidais lineares ausentes de cisteína, como as cecropinas; (ii) peptídeos abundantes em cisteínas cuja estrutura é estabilizada por pontes dissulfureto, como as defensinas; (iii) peptídeos ricos em prolina e/ou glicina (BULET et al., 1999). Dentre os AMPs

produzidos por *G. mellonella*, vale ressaltar a cecropina D-tipo que foi capaz de inibir o crescimento de *Aspergillus niger*, e uma defensina que apresentou atividade antifúngica contra *Fusarium oxysporum* (CYTRYNSKA et al., 2007).

Outros peptídeos encontrados na mariposa são a galiomicina, uma defensina, e um peptídeo antifúngico rico em cisteína, a gallerimicina. Seus efeitos protetores foram demonstrados no trabalho de Bergin et al. (2006). Nessa pesquisa, as larvas de *G. mellonella* foram pré-expostas a concentrações sub-letais de *C. albicans* ou de *Saccharomyces cerevisiae* e depois foi feita uma segunda inoculação com uma dose letal de *C. albicans*. O resultado obtido foi a proteção das larvas após o primeiro contato com os fungos. Uma análise genética foi realizada e mostrou aumento da expressão dos genes responsáveis pela produção de gallerimicina, galiomicina e do IMPI.

A utilização de *G. mellonella* em estudos da interação parasito-hospedeiro é até certo ponto bem consolidada. Esse modelo tem sido escolhido como um recurso alternativo aos vertebrados no estudo da virulência de espécies de fungo recém descobertas. Em 2005, Tavanti et al. descreveram duas novas espécies relacionadas a *C. parapsilosis* responsáveis por causar doenças, *Candida orthopsilosis* e *Candida metapsilosis*. Gago et al. (2014) compararam a virulência de isolados desses fungos através da curva de sobrevivência, comparando flutuações na densidade dos hemócitos e diferenças na atividade fagocítica. A média de sobrevivência das larvas foi maior para *C. metapsilosis* em relação às outras espécies e foi evidenciado que as células fagocíticas de *G. mellonella* foram mais eficazes em internalizarem *C. orthopsilosis* e *C. parapsilosis* do que *C. metapsilosis*. Além disso, a densidade dos hemócitos foi aumentada em larvas infectadas com *C. metapsilosis* em comparação com as infectadas com *C. parapsilosis* ou *C. orthopsilosis*.

G. mellonella provou ser um modelo *in vivo* conveniente e barato no estudo de cepas mutantes de espécies de fungos leveduriformes e filamentosos. Brennan et al. (2002) avaliaram a taxa de morte de *G. mellonella* e de camundongo desafiados com cepas de *C. albicans* selvagens e com mutações que alteravam sua virulência quanto à formação de hifa. A pesquisa comprovou através desse teste e de comparação com a literatura, a correspondência da virulência entre essas cepas no modelo utilizando o inseto e o murino. Renshaw et al. (2016) avaliaram a virulência de duas cepas mutantes de *Aspergillus fumigatus* incapazes de produzir dois tipos distintos de miosinas, proteínas motoras baseadas em actina. Os

experimentos foram realizados inoculando as cepas em *G. mellonella* e em camundongo imunossuprimido. Os autores descobriram que a miosina da classe do tipo E se apresentou hipovirulenta, sendo que a porcentagem de sobrevivência dos animais foi igualmente proporcional, mostrando novamente grande similaridade entre os dois modelos.

Estudos sobre patogenicidade são encontrados na literatura de *Cryptococcus neoformans*. Desalermos et al. (2015) fizeram uma triagem de 1201 cepas, de uma biblioteca genômica, com deleções marcadas para identificar novos fatores de virulência. Esses mutantes foram testados em organismos com crescentes níveis de complexidade, iniciando-se com *C. elegans*, depois com *G. mellonella* e por fim com camundongo, e os resultados mostraram correspondência entre os diferentes modelos. Este procedimento mostrou-se o mais viável e eticamente responsável pela economia de animais, recursos e tempo. Outro experimento com *C. neoformans* comprovou que os mesmos genes responsáveis pela virulência do fungo são expressos em *G. mellonella* e de maneira similar em mamíferos. Um exemplo disso são as proteínas CAP59, GPA1, RAS1 e PKA1, que estão envolvidas no processo de morte do hospedeiro (LONDON; OROZCO; MYLONAKIS, 2006).

A mariposa também tem sido utilizada na análise do perfil de suscetibilidade a antifúngicos convencionais e na procura de novas formas terapêuticas, a seguir serão citados alguns exemplos: As larvas de *G. mellonella* foram escolhidas como hospedeiras num trabalho que averiguou a eficácia de azóis contra cepas de *A. fumigatus* com mutação no gene *cyp51*, que confere resistência a esses antifúngicos (FORASTIERO et al., 2015). Esse inseto foi utilizado em um ensaio que demonstrou que o astemizol e outra substância análoga promoveram a atividade fungicida do fluconazol, um antifúngico conhecido como sendo fungistático, quando as larvas foram infectadas com *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* e *Cryptococcus gattii* (VU; GELLI, 2010). Özakan e Coutts (2015) demonstraram a influência de um micovírus na patogenicidade de *A. fumigatus*, o vírus A78 ainda não caracterizado, que foi capaz de aumentar a taxa de sobrevivência das larvas de *G. mellonella*.

Tenebrio molitor

Tenebrio molitor (Coleoptera: Tenobridae) é um besouro pertencente à família Tenebrionidae primeiramente conhecido como sendo praga de lavouras de grãos, como de trigo, por exemplo (RAMOS-ELORDUY et al., 2002). Em estágio larval é utilizado na alimentação de animais de estimação como aves, répteis e anfíbios (MARTIN et al. 1976; BARKER; FITZPATRICK; DIERENFELD, 1998; FINKE, 2002). Em alguns países possui importância na alimentação humana sendo uma fonte de proteína (VAN BROEKHOVEN et al., 2015). Sua utilização como modelo em estudos de infecções é mais recente, se iniciou em 2013 com a bactéria *Listeria monocytogenes* (TINDWA et al., 2013).

A criação de *T. molitor* em condições laboratoriais é mais simples em comparação com *G. mellonella*. Além disso, há vários fornecedores comerciais desse inseto no Brasil, enquanto que *G. mellonella* não é comercializada neste país, obrigando os investigadores a manterem o seu próprio fornecimento de larvas da mariposa, elevando o custo dos experimentos e requer uma pessoa responsável pela sua manutenção.

Outra vantagem refere-se à forma de inoculação, que é realizada por injeção tanto no modelo com *T. molitor* quanto com *G. mellonella* e *D. melanogaster* (OPPERT et al., 2012). No modelo com o verme *C. elegans*, no entanto, o agente patogênico é adicionado ao poço em que o nematóide é inoculado durante o experimento, não havendo exatidão de quantos microrganismos irão infectar o animal (MERKX-JACQUES et al., 2013). Assim como a mariposa e a ameba *Acanthamoeba castellanii*, *T. molitor* tolera a temperatura de 37°C favorecendo o estudo de patógenos clínicos a temperatura em que estão expressando seus genes de virulência (LI et al., 2013).

Os insetos não possuem resposta imune adaptativa assim como foi explicado anteriormente, contudo, a resposta imune inata de *T. molitor* pode ser de longa duração, mesmo quando não há mais infecção, proporcionando um efeito profilático, sendo funcionalmente parecida com a resposta imune adaptativa humana (MORET; SILVA-JOTHY, 2003). Uma exposição prévia da larva a um filamento de nylon induziu seu sistema imunológico e aumentou sua sobrevivência frente a uma subsequente exposição, uma semana depois, a fungos entomopatogênicos (KRAMS, et al. 2013). Larvas que foram pré-desafiadas com lipopolissacarídeos (componentes da membrana externa de bactérias gram negativas) também

apresentaram maior resistência à infecção por *Metarhizium anisopliae*, outro fungo entomopatogênico (MORET; SILVA-JOTHY, 2003).

Johnston, Makarova e Rolff (2014) desafiaram larvas de *T. molitor* com as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Os autores comprovaram, através de análises moleculares, a expressão de genes responsáveis pela imunidade celular, cicatrização de feridas, melanização e produção de espécies reativas de oxigênio, que foi identificada imediatamente após a inoculação. Em contraste, a expressão de genes que codificam AMPs, componentes da via de sinalização Toll e proteínas responsáveis pela aquisição de ferro, permaneceu elevada durante pelo menos 7 dias após a inoculação. Além disso, outros genes responsáveis pelas funções metabólicas e armazenamento de nutrientes foram reprimidos, apontando um custo energético para manter o sistema imunológico induzido. *T. molitor* é um modelo alternativo no estudo de infecções persistentes bacterianas e nada impede que o modelo também possa ser útil no estudo de infecções recorrentes de origem fúngicas.

As variedades de AMPs produzidos por *T. molitor* são específicos para cada tipo de microrganismo (JOHNSTON; MAKAROV; ROLFF, 2014). Em se falando exclusivamente da resposta imunológica contra fungos, um exemplo de AMP produzido por *T. molitor* é a tenecina 3 que possui atividade contra *Candida albicans* (LEE et al, 1999; KIM, 2001).

Em 2014 Guo e colaboradores estudaram o efeito da alimentação de *T. molitor* por grãos colonizados por *Fusarium* spp, um fungo produtor de micotoxinas, importante tanto na agricultura como na saúde humana. Eles avaliaram a influência do fungo na escolha do alimento, ganho de peso e mortalidade do besouro. Os autores descobriram que *T. molitor* evitou se alimentar de grãos colonizados com *Fusarium avenaceum*, porém não com *Fusarium proliferatum*, *Fusarium poae* ou *Fusarium culmorum*. Também observaram que as larvas que se alimentavam de grãos colonizados com *F. culmorum*, *F. avenaceum* obtiveram altas taxas de mortalidade. Além disso, eles conseguiram isolar as micotoxinas das larvas após a alimentação, concluindo que ela conseguia sobreviver às micotoxinas produzidas pelas espécies não evitadas. Esse trabalho mostra a possibilidade de utilizar *T. molitor* no estudo de toxinas produzidas por microrganismos.

O primeiro estudo utilizando *T. molitor* como modelo de infecções causadas por fungos de importância clínica foi realizado pelo grupo de pesquisa de

De Souza, et al. (2015). Nesse trabalho, larvas de *T. molitor* foram infectadas com *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* e foram analisadas as curvas de sobrevivência e os tecidos infectados. Os resultados mostraram um aumento na taxa de morte com o aumento da concentração do inóculo. Adicionalmente foi possível observar nos cortes histológicos, hifas de *C. albicans* formando micélio e as células de *C. neoformans* com suas cápsulas de melanina. A pesquisa demonstrou a eficiência do método em avaliar a virulência de leveduras patogênicas.

T. molitor também já foi utilizado no estudo de substâncias com atividade antifúngica. Morey et al. (2016) mostrou que uma fração rica em taninos condensados de *Stryphnodendron adstringens* teve atividade antifúngica *in vivo* contra *Candida tropicalis* utilizando *T. molitor* como modelo animal. Esse trabalho assim como os outros revelam que esse modelo invertebrado possui grande potencial de ser utilizado nas mais diversas áreas, e se mostra disponível para estudos envolvendo também fungos filamentosos.

Acanthamoeba castellanii

O gênero *Acanthamoeba* é formado por protozoários que possuem ampla distribuição, são encontrados na natureza no solo e na água. Esses microrganismos possuem dois estágios em seu ciclo de vida, um estágio trofozoíta, ativo, que exibe multiplicação por mitose e um estágio prevaletente encistado onde sua atividade metabólica é mínima (BAND; MOHRLOK, 1973). Essas amebas são consideradas oportunistas, são conhecidas por causar lesões cutâneas, queratites (infecções na córnea) e mais raramente encefalite como a encefalomeningite amebiana granulomatosa (VISVESVARA; MOURA; SCHUSTER, 2007; KHAN, 2006). Dentre as espécies do gênero, a maioria dos pesquisadores prefere utilizar *A. castellanii* como hospedeiro em estudos sobre a interação entre fungo e ameba. Esse modelo é o mais adaptado em sobreviver em meio livre de qualquer organismo vivo, uma característica que possibilita a pesquisa nas condições laboratoriais, sem a necessidade de bactérias para alimentação, porém criando uma situação muito mais artificial (CASADEVALL, 2012).

A maioria dos fungos patogênicos vive livremente no ambiente e não necessita de hospedeiro para se replicar, com exceção de *Candida albicans*, que é uma levedura comensal pertencente à microbiota humana (HOGAN; KLEIN; LEVITZ, 1996; STEENBERGEN; CASADEVALL, 2003). Devido a ausência de especificidade para um determinado hospedeiro, esses fungos são capazes de infectar diferentes espécies de animais (GUIMARÃES et al., 2016). Podem ser citados como exemplo as leveduras *Cryptococcus neoformans*, comumente encontrado em fezes de pássaros, *Histoplasma capsulatum*, predominante em solo contaminado e *Coccidioides immitis* que ocorre na América do Norte, em partes do sudoeste dos Estados Unidos (CASADEVALL, 2012). Esses microrganismos não possuem um hospedeiro específico e são comumente considerados patógenos inespecíficos. Contudo, alguns fungos são, até determinado ponto, dependentes de seus hospedeiros originais para a sobrevivência e propagação, porém também podem ser encontrados no meio ambiente, como é o caso dos fungos dermatófitos (GUIMARÃES et al., 2016; WHITE et al., 2014).

A. castellanii coexiste na natureza com esses fungos e também com bactérias e outros microrganismos. Alguns fungos e bactérias servem de alimento para a ameba, porém, os mesmos também podem utilizá-la como hospedeiro (RODRIGUEZ-ZARAGOZA, 1994). Por exemplo, *C. neoformans* é utilizado na obtenção de energia pela ameba, entretanto, esse fungo também é capaz de se replicar internamente e matá-la (STEENBERGEN; SHUMAN; CASADEVALL, 2001). O primeiro relato da interação entre *C. neoformans* e *A. castellanii* ocorreu há muitos anos quando foi observada a contaminação de *A. castellanii* nas culturas do fungo, porém ainda não se conhecia a preferência alimentar do protozoário (CASTELLANI, 1931).

As semelhanças entre os fatores de virulência expressos por *C. neoformans* em hospedeiro mamífero e em *A. castellanii* são grandes. O mecanismo de fagocitose desse fungo pela ameba é similar ao que acontece com os macrófagos. A secreção da cápsula de polissacarídeo pela levedura aparece como um importante mecanismo de virulência. Em mamíferos, os macrófagos necessitam da ajuda de anticorpos e/ou do sistema complemento para que a fagocitose das células de *C. neoformans* encapsulados seja eficiente (KOZEL, 1993). Quando comparado com *A. castellanii*, a ameba é capaz de fagocitar esse fungo

encapsulado, contudo, a eficiência da fagocitose é inversamente proporcional ao diâmetro da cápsula (CHRISMAN; ALVAREZ; CASADEVALL 2010).

Depois da fagocitose *C. neoformans* é internalizado em uma vesícula e se replica dentro da ameba similar ao que se acontece em macrófagos. Também ocorre a formação de vários vacúolos contendo polissacarídeos que por sua vez causam a lise dos macrófagos (FELDMESSER, et al. 2000; STEENBERGEN; SHUMAN; CASADEVALL, 2001). Várias horas após a ingestão, pesquisadores observaram na ameba, a exocitose das células de *C. neoformans*, um fenômeno semelhante ao processo de exocitose não-lítica descrito para macrófagos que fagocitam esse fungo (CHRISMAN; ALVAREZ; CASADEVALL 2010). A melanização e a atividade de fosfolipase que são fatores de virulência expressos em *C. neoformans* quando internalizado por macrófagos também se mostraram importantes no modelo utilizando *A. castellanii*. A melanização em especial auxiliou na sobrevivência de cepas não capsuladas apenas, mostrando que a cápsula é um fator de virulência dominante (STEENBERGEN; SHUMAN; CASADEVALL, 2001).

Derengowski et al. (2013) compararam o perfil transcricional de *C. neoformans* internalizados por macrófagos de murino e *A. castellanii*. Eles observaram uma maior expressão de vários genes pelo fungo nos dois ambientes intracelulares. Houve indução do gene *ISC1*, que protege o fungo contra estresse nitrosativo e oxidativo e o pH ácido encontrado no fagossoma. Igualmente houve maior expressão do gene *CAP64*, que codifica uma proteína necessária para a síntese da cápsula de polissacarídeo.

A interação de *A. castellanii* com outras espécies de fungos também tem sido estudada. Nero, Tarver e Hedrick, 1964 mostraram que a ameba quando cultivada com *Candida famata* foi capaz de fagocitá-la e utilizá-la como fonte de energia (NERO; TARVER; HEDRICK, 1964) Outro estudo revelou que a infecção com *C. albicans* resultou na morte do fungo e sobrevivência da ameba (STEENBERGEN; SHUMAN; CASADEVALL, 2001). O fato de que *C. albicans* não é encontrado do ambiente seria uma explicação para esse comportamento, já que aparentemente o fungo não possui tantos mecanismos de defesa contra *C. castellanii*, por isso é utilizado como controle nos experimentos. Até o momento não há relatos do uso especificamente de *C. castellanii* como um modelo alternativo no

estudo da virulência de cepas de *Candida* spp., indicando este ser um campo da pesquisa que ainda pode ser explorado.

Steenbergen et al. (2004) averiguaram a interação de fungos dimórficos, capazes de alterar a sua morfologia de levedura para hifa conforme a temperatura, com *C. castellanii*. O estudo se concentrou em três espécies, *Blastomyces dermatitidis*, *Sporothrix schenckii* e *H. capsulatum*, e o resultado foi diferente do que foi obtido com *Candida* sp., os fungos foram responsáveis pela morte do invertebrado, que por sua vez, foi utilizado como fonte nutricional. Um fato interessante foi que a co-incubação da ameba com os três fungos levou a um aumento nas formas de hifas, tal morfologia expressada quando esses fungos se encontram em sua forma não infectante no ambiente, à temperatura de 25°C. Porém, assim como *Galleria mellonella* e *Tenebrio molitor*, a ameba é incubada a 37°C durante os experimentos. Essa descoberta concordou com estudos que preconizam que a transição de hifa/levedura não depende somente da temperatura. Também foi constatado que a exposição de *A. castellanii* a uma cepa de *H. capsulatum* avirulenta induziu um fenótipo virulento de *H. capsulatum* que causou uma infecção pulmonar persistente em modelo murino.

Todas essas descobertas consolidam a hipótese de que a capacidade de virulência desses fungos em mamífero é uma consequência de adaptações que evoluíram a partir de interações fungo-protozoário no ambiente. Dessa forma *A. castellanii* se mostra um modelo favorável nos estudos envolvendo as interações dos patógenos com os macrófagos, principalmente quando se trata de *Cryptococcus* spp.

2. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem as agências que financiaram o projeto, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasil), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasil), pela bolsa de mestrado concedida.

3. CONFLITO DE INTERESSES

Não existe conflito de interesse.

4. REFERÊNCIAS

ALTINCICEK, B.; STÖTZEL, S.; WYGRECKA, M. et al. Host-derived extracellular nucleic acids enhance innate immune responses, induce coagulation, and prolong survival upon infection in insects. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 181, n. 4, p. 2705–12, 15 ago. 2008.

ALARCO, A. M.; MARCIL, A.; CHEN, J. et al. Immune-deficient *Drosophila melanogaster*: a model for the immune innate response to human fungal pathogens. **The Journal of Immunology**, v. 172, p. 5622-5628, 2004.

APIDIANAKIS, Y.; RAHME, L. G.; HEITMAN, J. et al. Challenge of *Drosophila melanogaster* with *Cryptococcus neoformans* and role of the innate immune response. **Eukaryotic Cell**, v. 3, n. 2, p. 413-419, 2004.

BAND, R. N.; MOHRLOK, S. The Cell Cycle and Induced Amitosis in *Acanthamoeba*. **The Journal of Protozoology**, v. 20, n. 5, p. 654–657, nov. 1973.

BARKER, D.; FITZPATRICK, M. P.; DIERENFELD, E. S. Nutrient composition of selected whole invertebrates. **Zoo Biology**, v. 17, n. 2, p. 123–134, 1998.

BERGIN, D.; MURPHY, L.; KEENAN, J. et al. Pre-exposure to yeast protects larvae of *Galleria mellonella* from a subsequent lethal infection by *Candida albicans* and is mediated by the increased expression of antimicrobial peptides. **Microbes and Infection**, v. 8, n. 8, p. 2105–2112, 2006.

BEUTLER, B. Innate immunity: an overview. **Molecular Immunology**, v. 40, p. 845-859, 2004.

BIDLA, G.; LINDGREN, M.; THEOPOLD, U. et al. Hemolymph coagulation and phenoloxidase in *Drosophila* larvae. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 29, n. 8, p. 669–679, 2005.

BRENNAN, C. A; ANDERSON, K. V. *Drosophila*: the genetics of innate immune recognition and response. **Annu. Ver. Immunol**, v. 22, 457-483, 2004.

BRENNAN, M.; THOMAS D. Y.; WHITEWAY, M. et al. Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. v. 34 p. 153-157, 2002.

BRUNKE, S.; QUINTIN, J.; KASPER, L. et al. Of mice, flies- and man? Comparing fungal infection models for large-scale screening efforts. **Disease Models & Mechanisms**, v. 8, p. 473-486, 2015.

BULET, P.; HETRU, C.; DIMARCG, J. L. et al. Antimicrobial peptides in insects; structure and function. **Developmental and comparative immunology**, v. 23, n. 4–5, p. 329–44, 1999.

CASADEVALL, A. Amoeba provide insight into the origin of virulence in pathogenic fungi. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 710, p. 1–10, 2012.

CASTELLANI, A. An amoeba growing in cultures of a yeast. **Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v. 33, p.188–191, 1931.

CHAMILOS, G.; LIONAKIS, M. S.; LEWIS, R. E et al. *Drosophila melanogaster* as a facile model for large scale studies of virulence mechanisms and antifungal drug efficacy in *Candida species*. **The Journal of infectious Diseases**, v. 193, p. 1014-1022, 2006.

CHAMILOS, G.; LEWIS, R. E.; HU, J. et al. *Drosophila melanogaster* as a model host to dissect the immunopathogenesis of zygomycosis. **PNAS**, v. 105, n. 27, p. 9367-9372, 2008.

CHAMILOS, G.; LIONAKIS, M. S.; LEWIS, R. E. et al. Role of mini-host models in the study of medically important fungi. **Lancet Infect Dis**, n. 7, p. 42-55, 2007.

CHENG, T. ZHANG, Y. L.; LIU, C. et al. Identification and analysis of Toll-related genes in domesticated silk worm, *Bombix mori*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 32, p. 464-475, 2007.

CHRISMAN, C. J.; ALVAREZ, M.; CASADEVALL, A. Phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* by, and nonlytic exocytosis from, *Acanthamoeba castellanii*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 18, p. 6056–6062, 2010.

COUILLAULT, C.; PUJOL, N.; REBOUL, J. et al. TLR-independent control of innate immunity in *Caenorhabditis elegans* by the TIR domain adaptor protein TIR-1, an ortholog of human SARM. **Nature immunology**, v. 5, n.5, p. 488-494, 2004.

CRUZ, M. R.; GRAHAM, C. E.; GAGLIANO, B. C. et al. *Enterococcus faecalis* inhibits hyphal morphogenesis and virulence of *Candida albicans*. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 1, p. 189-200, 2012.

CYTRYŃSKA, M., MAK, P.; ZDYBICKA-BARABAS, A. et al. Purification and characterization of eight peptides from *Galleria mellonella* immune hemolymph. **Peptides**, v. 28, n. 3, p. 533–546, mar. 2007.

DE GREGORIO, E.; SPELLMAN, P. T.; RUBIN, G. M. et al. Genome-wide analysis of the *Drosophila* immune response by using oligonucleotide microarrays. **PNAS**, v. 98, n. 22, p. 12590-12595, 2001.

DERENGOWSKI, L. DA S.; PAES, H. C.; ALBUQUERQUE, P. et al. The transcriptional response of *Cryptococcus neoformans* to ingestion by *Acanthamoeba castellanii* and macrophages provides insights into the evolutionary adaptation to the mammalian host. **Eukaryotic Cell**, v. 12, n. 5, p. 761–774, 2013.

DE SOUZA, P. C.; MOREY, A. T.; CASTANHEIRA, G. M. et al. *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) as an alternative host to study fungal infections. **Journal of microbiological methods**, v. 118, p. 182–186, 8 out. 2015.

DESALERMOS, A.; FUCHS, B. B.; MYLONAKIS, E. Selecting an invertebrate model

host for the study of fungal pathogenesis. **PLoS pathogens**, v. 8, n. 2, p. e1002451, 2 fev. 2012.

DESALERMOS, A.; TAN, X.; RAJAMUTHIAH, R. et al. A multi-host approach for the systematic analysis of virulence factors in *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 211, n. 2, p. 298–305, 2015.

DUNN, P. E. Biochemical aspects of insect immunology. **Annual Reviews of Entomology**, v. 31, p. 321-339, 1986.

DUNPHY, G. B.; THURSTON, G. S. Insect immunity. In: GAUGLER, R. & KAYA, H. K. **Entomopathogenic Nematodes in Biological Control**, New York: CRC Press, 1990, p. 301-323.

EGUCHI, M.; ITOH, M.; NISHINO, K. et al. Amino acid sequence of an inhibitor from de Silkworm (*Bombyx mori*) hemolymph against fungal protease. **J. Biochem**, v. 115, p. 881-884, 1994.

ELEFThERIANOS, I.; REVENIS, C. Role and Importance of phenoloxidase in insect hemostasis. **Journal of Innate Immunity**, v. 3, n. 1, p. 28-33, 2011.

FELDMESSER, M.; KRESS, Y.; NOVIKOFF, P. et al. *Cryptococcus neoformans* is a facultative intracellular pathogen in murine pulmonary infection. **Infection and immunity**, v. 68, n. 7, p. 4225–37, jul. 2000.

FERRANDON, D.; IMLER, J. L.; HETRU, C. et al. The *Drosophila* systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infection. **Nature Reviews: Immunology**, v. 7, p. 862-874, 2007.

FEKETE, C.; THOLANDER, M.; RAJASHEKAR, B. et al. Paralysis of nematodes: shifts in the transcriptome of the nematode-trapping fungus *Monacrosporium haptotylum* during infection of *Caenorhabditis elegans*. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 364-375, 2008.

FINKE, M. D. Complete nutrient composition of commercially raised invertebrates used as food for insectivores. **Zoo Biology**, v. 21, n. 3, p. 269–285, 27 jun. 2002.

FORASTIERO, A.; BERNAL-MARTÍNEZ, L.; MELLADO, E. et al. *In vivo* efficacy of voriconazole and posaconazole therapy in a novel invertebrate model of *Aspergillus fumigatus* infection. **International journal of antimicrobial agents**, 17 ago. 2015.

FUCHS, B. B.; O'BRIEN, E.; KHOURY, J. B. et al. Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. **Virulence**, v. 1, n. 6, p. 475–482, 2010.

GAGO, S.; GARCÍA-RODAS, R.; CUESTA, I. et al. *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* virulence in the non-conventional host *Galleria mellonella*. **Virulence**, v. 5, n. 2, p. 278-85, fev. 2014.

GILLESPIE, J. P.; KANOST, M. R. Biological mediators of insect immunity. **Annu. Rev. Entomol**, v. 42, p. 611-643, 1997.

GOMEZ-LOPEZ, A.; FORASTIERO, A.; CENDEJAS-BUENO, E. et al. An invertebrate model to evaluate virulence in *Aspergillus fumigatus*: The role of azole resistance. **Medical Mycology**, v. 52, n. 3, p. 311–319, 2014.

GUIMARAES, A. J.; GOMES, K. X.; CORTINES, J. R. et al. *Acanthamoeba* spp as a universal host for pathogenic microorganisms: one bridge from environment to host virulence. **Microbiological Research**, v. 163, n. 1, p. 30-38, ago, 2016.

GUO, Z.; DÖLL, K.; DASTJERD, R. et al. Effect of fungal colonization of wheat grains with *Fusarium* spp. on food choice, weight gain and mortality of meal beetle larvae (*Tenebrio molitor*). **PloS one**, v. 9, n. 6, p. e100112, jan. 2014.

HANAOKA, N.; TAKANO, Y.; SHYBUYA, K. et al. Identification of putative protein phosphatase gene PTC1 as a virulence-related gene using a silkworm model of *Candida albicans* infection. **Eukaryotic cell**, v. 7, n. 10, 1640-1648, 2008.

HOFFMANN, J. A. REICHHART, J. M. *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. **Nature Immunology**, v. 3, n. 2, p. 121-126, 2002.

HOFFMANN, J. A.; KAFATOS, F. C.; JANEWAY, C. A.; EZEKOWITZ, R. A. B. Phylogenetic perspectives in innate immunity. **Science**, v. 284, p. 1313- 1318, 1999.

HOGAN, L. H.; KLEIN, B. S.; LEVITZ, S. M. Virulence factors of medically important fungi. **Clinical microbiology reviews**, v. 9, n. 4, p. 469–88, out. 1996.

HOU, C-X.; QIN, G-X.; LIU, T. et al. Differentially expressed genes in the cuticle and hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*, injected with the fungus *Beauveria bassiana*. **Journal of Insect Science**, v. 13, n. 144, 2013.

HOROHOV, D. W.; DUNN, P. E. Phagocytosis and nodule formation by hemocytes of *Manduca sexta* larvae following injection of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 41, n. 2, p. 203–213, 1983.

HUANG, X; LI, D; XI, L; MYLONAKIS, E. *Caenorhabditis elegans*: a simple nematode infection model for *Penicillium marneffeii*. **PLOS one**, v. 9, n. 9, 2014.

JEFFERY, C. J. Moonlighting proteins. **Trends in Biochemical Sciences**, 1999.

JOHNSON, C. H; AYYADEVARA, S; MCEWEN, J. E; REIS, R. J. S. *Histoplasma capsulatum* and *Caenorhabditis elegans*: a simple nematode model for an immune response to fungal infection. **Medical Mycology**, v. 47, p. 808-813, 2009.

JOHNSTON, P. R.; MAKAROVA, O.; ROLFF, J. Inducible defenses stay up late: temporal patterns of immune gene expression in *Tenebrio molitor*. **G3 (Bethesda, Md.)**, v. 4, n. 6, p. 947–55, 2014.

KIM, D. H.; LEE, D. G.; KIM, K. L. et al. Internalization of tenecin 3 by a fungal cellular process is essential for its fungicidal effect on *Candida albicans*. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, n. 16, p. 4449–4458, 2001.

KRAMS, I.; DAUKSTE, J.; KIVLENIENCE, I. et al. Previous encapsulation response enhances within individual protection against fungal parasite in the mealworm beetle *Tenebrio molitor*. **Insect Science**, v. 20, n. 6, p. 771–777, dez. 2013.

KUMAR, V; SINGH, G. P; BABU, A. M. Surface ultra structural studies of germination, penetration and conidial development of *Aspergillus flavus* Link: fries infecting silkworm *Bombyx mori* Linn. **Mycopathologia**, v. 157, p. 127-135, 2004.

KURZ, C. L. & EWBANK, J. J. *Caenorhabditis elegans*: an emerging genetic model for the study of innate immunity. **Nature Genetics**, v. 4, p. 380-390, 2003.

LECLERC, V; REICHART, J. M. The immune response of *Drosophila melanogaster*. **Immunologica and reviews**, v. 198, p. 59-71, 2004.

LEE, Y-T.; KIM, D. H.; SUH, J. Y. et al. Structural characteristics of tenecin 3, an insect antifungal protein. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v. 47, n. 3, mar. 1999.

LEMAITRE, B.; HOFFMANN, J. The host defense of *Drosophila melanogaster*. **Annu. Rev. Immunol**, v.25, p. 697-743, 2007.

LEMAITRE, B.; NICOLAS, E.; MICHAUT, L. et al. The dorso ventral regulatory gene cassettes pätzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. **Cell**, v. 86, p. 973-983, 1996.

LEMAITRE, B; REICHHART, J. M; HOFFMANN, J. A. *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. **Proc. Natl, Acad, Sci. USA**, v. 94, p. 14614-14619, 1997.

LI, D-D.; DENG, L.; HU, G. H. et al. Using *Galleria mellonella*–*Candida albicans* Infection Model to Evaluate Antifungal Agents. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 36, n. 9, p. 1482–1487, 1 set. 2013.

LIONAKIS, M. S. *Drosophila* and *Galleria* insect model hosts: new tools for the study

of fungal virulence, pharmacology and immunology. **Virulence**, v. 2, n. 6, p. 521–7, 1 jan. 2011.

LI, Y.; XIANG, Q.; ZHANG, Q. et al. Overview on the recent study of antimicrobial peptides: Origins, functions, relative mechanisms and application. **Peptides**, v. 37, n. 2, p. 207–215, out. 2012.

LU, D.; GENG, T.; HOU, C. et al *Bombyx mori* cecropin A has a high antifungal activity to entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Gene**, v. 583, p. 29-35, 2016.

MARTIN, R. D.; RIVERS, J. P. W.; COWGILL, U. M. Culturing mealworms as food for animals in captivity. **International Zoo Yearbook**, v. 16, n. 1, p. 63-70, 1976.

MATSUMOTO, Y.; MIYAZAKI, S.; FUKUNAGA, D. H. et al. Quantitative evaluation of cryptococcal pathogens is and antifungal drugs using a silkworm infection model with *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 112, p. 138-146, 2011.

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

MESA-ARANGO, A. C.; FORASTIERO, A.; BERNAL-MARTÍNEZ, L. et al. The non-mammalian host *Galleria mellonella* can be used to study the virulence of the fungal pathogen *Candida tropicalis* and the efficacy of antifungal drugs during infection by this pathogenic yeast. **Medical mycology**, v. 51, n. 5, p. 461–72, 2013.

MORET, Y.; SIVA-JOTHY, M. T. Adaptive innate immunity? Responsive-mode prophylaxis in the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. **Proceedings. Biological sciences / The Royal Society**, v. 270, n. 1532, p. 2475–80, 7 dez. 2003.

MOREY, A. T.; DE SOUZA, F. C.; SANTOS, J. P. et al. Antifungal Activity of Condensed Tannins from *Stryphnodendron adstringens*: Effect on *Candida tropicalis* Growth and Adhesion Properties. **Current pharmaceutical biotechnology**, v. 17, n. 4, p. 365–75, jan. 2016.

MORISHIMA, I; YAMANO, Y; INOUE, K; MATSUO, N. Eicosanoids mediate induction of immune genes in the fat body of the silkworm, *Bombix mori*. **FEBS letters**, v. 419, p. 83-86, 1997.

MORTON, D. B.; DUNPHY, G. B.; CHADWICK, J. S. Reactions of hemocytes of immune and non-immune *Galleria mellonella* larvae to *Proteus mirabilis*. **Developmental and comparative immunology**, v. 11, n. 1, p. 47–55, 1987.

MYLONAKIS, E.; AUSUBEL, F. M.; PERFECT, J. R. et al. Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Cryptococcus neoformans* as a model of yeast pathogenesis. **PNAS**, v. 99, n. 24, p. 15675-15680, 2002.

MYLONAKIS, E.; MORENO, R.; EL KHOURY, J. B. et al. *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 7, p. 3842-3850, 2005.

MYLONAKIS, E; CASADEVALL, A; AUSUBEL, F. M. Exploiting Amoeboid and non-vertebrate animal model systems to study the virulence of human pathogenic fungi. **PLOS pathogens**, v. 3, n. 7, p. 859-865, 2007.

NERO, L. C.; TARVER, M. G.; HEDRICK, L. R. Growth of *Acanthamoeba castellanii* with yeast *Torulopsis famata*. **Journal of bacteriology**, v. 87, p. 220–5, jan. 1964.

OPPERT, B.; DOWD, S. E.; BOUFFARD, P. et al. Transcriptome profiling of the intoxication response of *Tenebrio molitor* larvae to *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa protoxin. **PloS One**, v. 7, n. 4, p. e34624, jan. 2012.

ÖZKAN, S.; COUTTS, R. H. A. *Aspergillus fumigatus* mycovirus causes mild hypervirulent effect on pathogenicity when tested on *Galleria mellonella*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 76, p. 20–26, 2015.

PELEG, A. Y.; TAMPAKAKIS, E.; FUCHS, B. B. et al. Prokaryote-eukaryote interactions identified by using *Caenorhabditis elegans*. **PNAS**, v. 105, n. 38, p. 14585-14590, 2008.

PUJOL, N. Anti-Fungal innate immunity in *C. elegans* is enhanced by evolutionary diversification of antimicrobial peptides. **Plos Pathogens**, v. 4, n. 7, 2008.

PUKKILA-WORLEY, R; PELEG, A. Y; TAMPAKAKIS, E; MYLONAKIS, E. *Candida albicans* hyphal formation and virulence assessed using a *Caenorhabditis elegans* infection model. **Eukaryotic cell**, v. 8, n. 11, p. 1750-1758, 2009.

RAMOS-ELORDUY, J.; GONZÁLEZ, E. A.; HERNÁNDEZ, A. R. et al. Use of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) to recycle organic wastes and as feed for broiler chickens. **Journal of economic entomology**, v. 95, n. 1, p. 214–220, 1 fev. 2002.

RENSHAW, H.; VARGAS-MUÑIZ, J. M.; RICHARDS, A. D. et al. Distinct roles of myosins in *Aspergillus fumigatus* hyphal growth and pathogenesis. **Infection and Immunity**, v. 84, n. 5, p. 1556–1564, 2016.

RODRÍGUEZ-ZARAGOZA, S. Ecology of Free-Living Amoebae. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 20, n. 3, p. 225–241, 25 jan. 1994.

SCORZONI, L.; DE LUCAS, M. P.; MESA-ARANGO, M. C. et al. Antifungal Efficacy during *Candida krusei* Infection in Non-Conventional Models Correlates with the Yeast *In Vitro* Susceptibility Profile. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, 2013.

SLEPNEVA, I. A.; KOMAROV, D. A.; GLUPOV, V. V. et al. Influence of fungal infection on the DOPA-semiquinone and DOPA-quinone production in haemolymph

of *Galleria mellonella* larvae. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 300, n. 1, p. 188–91, 3 jan. 2003.

SIFRI, C. D; BEGUN, J; AUSUBEL, F. M. The worm has turned – microbial virulence modeled in *Caenorhabditis elegans*. **TRENDS in Microbiology**, v. 13, n. 3, 2005.

SOWA-JASIŁEK, A.; ZDYBICKA-BARABAS, A.; STACZEC, S. et al. Studies on the role of insect hemolymph polypeptides: *Galleria mellonella* anionic peptide 2 and lysozyme. **Peptides**, v. 53, p. 194–201, 2014.

STRAND, M. R.; PECH, L. L. Immunological Basis for Compatibility in Parasitoid-Host Relationships. **Annual Review of Entomology**, v. 40, n. 1, p. 31–56, jan. 1995.

STEINER, H. HULTMARK, D.; ENGSTRÖM, A. et al. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. **Nature**, v. 292, 246-248, 1981.

STEENBERGEN, J.; NOSANCHUK, J. D.; MALLIARIS, S. D. et al. Interaction of *Blastomyces dermatitidis*, *Sporothrix schenckii*, and *Histoplasma capsulatum* with *Acanthamoeba castellanii*. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 6, p. 3478–3488, 1 jun. 2004.

STENBERGEN, J. N. *Cryptococcus neoformans* virulence is enhanced after growth in the genetically malleable host *Dictyostelium discoideum*. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 9. P. 4862-4872, 2003.

STEENBERGEN, J. N.; SHUMAN, H. A.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 26, p. 15245–15250, 18 dez. 2001.

TAUSZIG, S; JOUANGUY, E; HOFFMANN, J. A; IMLER, J. Toll-related receptors and the control of antimicrobial peptide expression in *Drosophila*. **PNAS**, v. 97, n. 19, p. 10520-10525, 2000.

TAVANTI, A.; DAVIDSON, A. D.; GOW, N. A. R. et al. *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III. **Journal of clinical microbiology**, v. 43, n. 1, p. 284–92, jan. 2005.

TINDWA, H.; PATNAIK, B. B.; KIM, D. H. et al. Cloning, characterization and effect of TmPGRP-LE gene silencing on survival of *Tenebrio molitor* against *Listeria monocytogenes* infection. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 11, p. 22462–22482, 2013.

TZOU, P; GREGORIO, E; LEMAITRE, B. How *Drosophila* combats microbial infection: a model to study innate immunity and host-pathogen interactions. **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, p. 102-110, 2002.

UJITA, M.; KATSUNO, Y.; KAWACHI, I. et al. Glucan-Binding activity of silkorm 30-kDa apolipoprotein and its involvement in defense against fungal infection. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 69, n. 6, p. 1178-1185, 2014.

VAN BROEKHOVEN, S.; OONINCX, D. G.; VAN HUIS, A. et al. Growth performance and feed conversion efficiency of three edible mealworm species (Coleoptera: Tenebrionidae) on diets composed of organic by-products. **Journal of Insect Physiology**, v. 73, p. 1–10, fev. 2015.

VISVESVARA, G. S.; MOURA, H.; SCHUSTER, F. L. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 1–26, jun. 2007.

VU, K.; GELLI, A. Astemizole and an analogue promote fungicidal activity of fluconazole against *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *Cryptococcus gattii*. **Medical Mycology**, v. 48, n. 2, p. 1–8, mar. 2009.

WALTERS, J. B.; RATCLIFFE, N. A. Studies on the *in vivo* cellular reactions of insects: fate of pathogenic and non-pathogenic bacteria in *Galleria mellonella* nodules. **Journal of Insect Physiology**, v. 29, n. 5, p. 417-424, 1983.

WHITE, T. C.; FINDLEY, K.; DAWSON, T. L. J. et al. Fungi on the Skin: Dermatophytes and Malassezia. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 4, n. 8, p. a019802–a019802, 1 ago. 2014.

WHITTEN, M. M. A.; TEW, I. F.; LEE, B. L. et al. A novel role for an insect apolipoprotein (apolipoprotein III) in beta-1,3-glucan pattern recognition and cellular encapsulation reactions. **Journal of immunology**, v. 172, n. 4, p. 2177–85, 15 fev. 2004.

WU, G.; LIU, Y.; DING, Y. et al. 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, p. 297-304, 2016.

YAMASHITA, M.; IWABUCHI, K. *Bombyx mori* prohemocyte division and differentiation in individual microcultures. **Journal of Insect Physiology**, v. 47, n. 4, p. 325–331, 2001.

YOSHIDA, S; YAMASHITA, M. YONEHARA, S; EGUCHI, M. Properties of fungal protease inhibitors from the integument and haemolymph of the silkworm and effect of an inhibitor on the fungal growth. **Comp. Biochem. Physiol**, v. 95B, n. 3, p. 559-564, 1990

ZAIDMAN-RÉMY, A.; HERVÉ, M.; POIDEVIN, M. et al. The *Drosophila* amidase PGRP-LB modulates the immune response to bacterial infection. **Immunity**, v. 24, p. 463-473, 2006.

ZANETTE, R. A.; SANTURIO, J. M.; LORETO, É. S. et al. Toll-deficient *Drosophila* is susceptible to *Pythium insidiosum* infection. **Microbiology and Immunology**, v. 57, p. 732-735, 2013.

ZHANG, J; WU, X; ZHANG, S. Q. Antifungal mechanism of antibacterial peptide, ABP-CM4, from *Bombyx moria* against *Aspergillus niger*. **Biotechnol Lett**, v. 30, p. 2157-2163, 2008.

ZIEGLER, K.; KURZ, C. L.; CYPOWYI, S. et al. Antifungal Innate Immunity in *C. elegans*: PKC δ Links G Protein Signaling and a Conserved p38 MAPK Cascade. **Cell Host & Microbes**, v. 5, p. 341-352, 2009.

5.2 Artigo 2

Tenebrio molitor como um hospedeiro modelo para estudo de infecções por *Candida* spp.

Aline Dias Valério¹ Ricardo Sérgio de Couto Almeida¹

¹Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR, Brasil.

Palavras-chave: *Galleria mellonella*, *Tenebrio molitor*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii*, virulência.

Corresponding author:

Prof. Dr. Ricardo Sergio Almeida

Present/permanent address:

Departamento de Microbiologia/ Centro de Ciências Biológicas

Universidade Estadual de Londrina

Rodovia Celso Garcia Cid, Pr 445, Km 380

86.057-970, Londrina – PR, Brazil

Fone: +55 43 3371-4976

RESUMO

Os modelos invertebrados têm se destacado como alternativa para o estudo de patogenicidade e virulência microbiana. *Galleria mellonella* já é um modelo bem estabelecido, principalmente em estudos com espécies do gênero *Candida*. *Tenebrio molitor* apresenta características imunológicas semelhantes a *G. mellonella*, e os estudos com larvas desse besouro ainda são poucos. Tendo em vista o potencial que *T. molitor* apresenta, utilizamos este modelo para avaliar a virulência de diferentes espécies do gênero *Candida*. Além de avaliar a eficiência do *T. molitor* como alternativa para o estudo de virulência fúngica, foi realizado a comparação deste modelo com larvas de *G. mellonella* submetidas aos mesmos procedimentos experimentais. As larvas de *T. molitor* e de *G. mellonella* foram inoculadas com 5 μ L de cada concentração fúngica (1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7), a 37° C e observadas a cada 24 horas por um período de 10 dias experimentais. Ao final do período experimental os resultados foram plotados em uma curva de sobrevivência. Os dados demonstraram que a mortalidade dos indivíduos frente às infecções fúngicas foram dose dependente para para ambos os hospedeiros. Deste modo *T. molitor* apresentou potencial para ser uma alternativa nos estudos de patogenicidade e virulência fúngica.

Palavras-chave: *Tenebrio molitor*, *Candida*, *Galleria mellonella*, virulência

1. INTRODUÇÃO

Diante dos problemas éticos que envolvem o uso de animais sencientes na pesquisa científica, esforços têm sido realizados para buscar alternativas a tal problema. Já existem estudos publicados que trazem resultados favoráveis na área de métodos alternativos. Exemplos de modelos alternativos que já estão sendo utilizados nas pesquisas científicas são: células, ovos embrionados, tecido reconstituído, nematódeos e insetos (DIETERICH et al, 2001; CHAMILOS et al, 2006; SANCHEZ et al, 2007; HANAOKA et al, 2008; PUKKILA-WORLEY, 2009; JACOBSEN et al, 2011; QUITIN et al, 2013). As áreas que tais metodologias são implantadas são diversas, sendo que uma delas é na pesquisa da virulência e patogenicidade microbiana.

Um fato que torna claro a necessidade de se criar novas metodologias de estudo nos campos de virulência e patogenicidade microbiana são os dados epidemiológicos que têm mostrado um aumento na incidência de infecções em todo mundo, principalmente nos casos de infecções fúngicas (LASS-FLÖRL, 2009; NUCCI et al, 2013). Tal aumento tem vários motivos, dentre eles, aumento na expectativa de vida e crescente utilização de medicamentos antimicrobianos de amplo espectro (HOLZHEIMER; DRALLE, 2002; KOJIC; DAROUICHE, 2004; LASS-FLÖRL, 2009; SILVA et al, 2012). Neste quadro, o gênero *Candida* se destaca como patógeno presente em grande parte dos casos de infecções fúngicas. Dentro do gênero *Candida*, a espécie *Candida albicans* se destaca como agente isolado com maior frequência, tanto em pessoas saudáveis quanto em indivíduos que apresentam quadro infeccioso no qual o agente causal é um fungo (SOLL, 2002; COLOMBO; GUIMARÃES, 2003; RUPING; VEHRESCHILD; CORNELLY, 2008). Apesar de *C. albicans* se destacar como o agente isolado com maior frequência, as espécies não-*albicans* tem ganhado mais espaço nos estudos nos últimos anos, seja pelo aumento de casos ou também pela resistência a antifúngicos que algumas dessas espécies apresentam (COLOMBO; GUIMARÃES; SILVA, 2007; SILVA et al, 2012; YAPAR, 2014).

De encontro com as necessidades da comunidade científica em se encontrar um novo modelo para testes de virulência e patogenicidade que se enquadre nas exigências éticas, e ao mesmo tempo seja logisticamente viável para

a realidade dos laboratórios de pesquisa, diversos estudos vêm demonstrando o potencial de vários modelos invertebrados para atender tal necessidade.

Dentre os modelos que estão sendo investigados se encontram as larvas da mariposa *Galleria mellonella* e do besouro *Tenebrio molitor*. O primeiro, já apresenta um vasto número de pesquisas científicas nas quais são utilizados como alternativa para os estudos de virulência e patogenicidade microbiana. Diversas bactérias e fungos já foram testados utilizando este modelo (REEVES, 2004; FUCHS et al, 2010; BANVILLE; BROWNE; KAVANAGH, 2013; COOK; MCARTHUR, 2013; TSAI; LOH; PROFT, 2016). O segundo, começou a ser utilizados como modelo alternativo a menos tempo, por isso ainda conta com poucos estudos de patogenicidade e virulência bacteriana e fúngica (HAINE et al, 2008; OPPERT et al, 2012; DE SOUZA et al, 2015).

Como o *T. molitor* ainda é um modelo pouco explorado, nós estudamos seu comportamento diante da infecção com microrganismos do gênero *Candida*, além disso nós comparamos os resultados gerados com larvas de *G. mellonella* submetidas às mesmas condições experimentais. Ao final do experimento conseguimos traçar um padrão de comportamento do modelo *T. molitor* diante da infecção por *Candida* spp, mostrando o potencial do mesmo como modelo de infecção para estudo de virulência fúngica.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Preparo das cepas

Cepas de 5 espécies do gênero *Candida* foram utilizados no estudo. *C. albicans* SC5314, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. tropicalis* ATCC 200956, *C. glabrata* ATCC MYA 2950, *C. guilliermondii* ATCC6260, foram cultivadas em meio YPD (1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 2% de glicose), em agitação de 180 rpm, a 30°C overnight. Após esse período, as células foram centrifugadas, descartou-se o sobrenadante, e foi feita a lavagem das mesmas três vezes com tampão fostato salina (PBS- 137 mMNaCl, 2.7 mMKCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.76mM KH₂PO₄, pH 7.4). A densidade celular foi aferida utilizando um hemocítômetro. Posteriormente a este procedimento, foi feito o preparo das concentrações utilizadas no estudos a partir de diluições do inóculo principal utilizando PBS. As

concentrações utilizadas no estudo foram 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 por larva, e o ensaio foi realizado em triplicata.

2.2. Ensaio de sobrevivência

2.2.1. *Galleria mellonella*

Larvas de *Galleria mellonella* foram obtidas de cultivo próprio do Laboratório de Micologia e Métodos Alternativos ao Uso de Animais, na Universidade Estadual de Londrina. As larvas utilizadas no ensaio, apresentavam coloração clara, livre de manchas, e peso entre 0,2-0,3g. Cada grupo experimental era composto por 10 larvas, sendo que cada experimento foi realizado em triplicata.

Antes de aplicar o inóculo nas larvas as mesmas eram limpas com álcool 70%, para retirar qualquer resíduo externo que pudesse interferir nos resultados experimentais. A inoculação foi realizada na última proleg do lado esquerdo, utilizando uma seringa Hamilton (701N, calibre 26, 10 μ L de capacidade).

O experimento era composto do grupo controle o qual continha larvas que foram inoculadas com 5 μ L de PBS, e dos grupos que foram inoculados com as diferentes concentrações das cepas do gênero *Candida*, sendo que o volume inoculado foi o mesmo do grupo controle.

As larvas, após a inoculação, foram armazenadas em placas de Petri de 90 mm, e deixadas em estufa de 37°C durante todo o período experimental, que se estendeu por 10 dias. A cada 24 horas experimentais, o resultado era aferido, sendo que as larvas eram consideradas mortas quando não respondiam ao toque, as mesmas eram retiradas das placas de Petri em que estavam armazenadas e congeladas a -20°C, para posterior descarte (incineração).

2.2.2. *Tenebrio molitor*

As larvas de *T. molitor* utilizadas no experimento são cultivadas na Universidade Estadual de Londrina pelo Laboratório de Micologia e Métodos Alternativos ao Uso de Animais. As larvas de *T. molitor* são mantidas em caixas

plásticas (50X20X35 cm) com ração a base de diferentes tipos de farinhas, em temperatura de 25-30°C.

As larvas utilizadas no experimento apresentavam peso que variava de 0,1-0,2 g. As mesmas foram selecionadas para que não apresentassem nenhum sinal de contaminação, ou seja, as larvas utilizadas no ensaio apresentavam coloração uniforme, clara, a cutícula estava intacta e não havia nenhuma mancha ou outro indício de melanização. Da mesma forma que *G. mellonella*, os grupos experimentais para *T. molitor* eram compostos por 10 larvas, sendo que para cada concentração fúngica utilizada no ensaio, o experimento era repetido três vezes.

As larvas de *T. molitor* eram previamente limpas com álcool 70% para eliminar possíveis contaminantes externos, e para retirar os resíduos da ração que poderiam vir a atrapalhar a inoculação. Em larvas de *T. molitor* a aplicação do inóculo é realizada no segundo anel posterior as patas, tal processo foi realizado com o auxílio de uma seringa Hamilton (701N, calibre 26, 10 µL de capacidade).

O controle experimental foi realizado com a inoculação de 5 µL de PBS, nos grupos experimentais foi inoculado o mesmo volume de cada uma das concentrações das diferentes espécies de *Candida*. Após a inoculação as larvas foram armazenadas nas placas de Petri de 90 mm, em estufa a 37°C, durante 10 dias. A cada 24 horas o experimento era monitorado, e as larvas mortas (que não respondiam ao toque) eram descartadas, sendo primeiramente congeladas a -20°C, para posterior incineração.

2.3 Análises Estatísticas

Os dados gerados pelo experimento foram analisados com o auxílio do programa GraphPad Prism 5. As curvas de sobrevivência foram construídas e analisadas através do método de Keplén Meier e as análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste de Log Rank. O resultado foi considerado significativo quando $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

Em nosso estudo avaliamos o comportamento de larvas de *T. molitor* diante da infecção por diferentes espécies do gênero *Candida*. Além disso nós comparamos os resultados obtidos com *G. mellonella* submetido as mesmas condições experimentais. *T. molitor* apresentou uma mortalidade dose dependente diante da infecção fúngica, mesmo comportamento apresentado por *G. mellonella* (fig 1-5). Os dados obtidos através da análise das curvas de sobrevivência, demonstraram que concentrações de 5×10^6 e 1×10^7 das espécies do gênero *Candida*, utilizadas neste trabalho, quase sempre mataram todas as larvas, tanto de *G. mellonella*, quanto de *T. molitor* em 24 horas (figuras 1-5). *C. guilliermondii* foi uma das exceções a essa regra, pois na concentração de 5×10^6 apresentou uma taxa de mortalidade de aproximadamente 65% das larvas de *G. mellonella* e 87% das larvas de *T. molitor*, após 24 horas de experimento (figura 5). *C. glabrata* também apresentou variação na taxa de mortalidade na concentração de 5×10^6 , sendo que ao final do período de 24 horas, causou a morte de aproximadamente 87% das larvas de *T. molitor* (figura 4).

Quando realizamos a comparação entre as concentrações de *C. albicans* inoculadas em larvas de *T. molitor* não encontramos diferença significativa entre as mesmas (fig 1). A avaliação realizada em *G. mellonella* inoculadas com o mesmo fungo, encontramos diferenças significativas quando comparamos as concentrações de 1×10^5 e 5×10^5 ($P < 0,0001$) e entre 5×10^5 e 1×10^6 ($P = 0,0033$) (fig. 1). Nas larvas de *T. molitor* inoculadas com *C. tropicalis*, também não foi encontrada diferença significativa entre os inóculos (fig. 2). Enquanto que, entre as concentrações de 1×10^5 e 5×10^5 em *G. mellonella* inoculadas com o mesmo fungo foi encontrada diferença significativa ($P = 0,0156$) (fig. 2).

Nas larvas de *T. molitor* infectadas com *C. parapsilosis* foi encontrada a diferença significativa entre as concentrações de 1×10^5 e 5×10^5 ($P = 0,0075$); e também entre 1×10^6 e 5×10^6 ($P = 0,0003$) (fig. 3). As larvas de *G. mellonella* submetidas às mesmas condições experimentais, apresentaram diferença significativa as concentrações de 1×10^5 e 5×10^5 ($P < 0,0001$); 5×10^5 e 1×10^6 ($P < 0,0001$); 1×10^6 e 5×10^6 ($P = 0,0026$) (fig. 3).

Os hospedeiros invertebrados inoculados com *C. glabrata* também apresentaram diferenças significativas quando realizada a comparação entre suas

concentrações. As concentrações de 1×10^6 e 5×10^6 ($P < 0,0022$); 5×10^6 e 1×10^7 ($P = 0,0401$) diferiram significativamente em *T. molitor* (fig. 4). Em *G. mellonella* a concentração de 5×10^5 provocou mais mortes de *G. mellonella* do que a 1×10^5 ($P = 0,0002$). O inóculo de 1×10^6 foi mais letal do que 5×10^5 ($P = 0,0011$). A concentração de 5×10^6 provocou maior taxa de mortalidade que 1×10^6 ($P = 0,0013$) (fig. 4).

As larvas de *T. molitor* inoculadas com *C. guilliermondii* apresentaram diferenças significativas quando comparamos as concentrações de 1×10^6 com 5×10^6 ($P < 0,0001$), e também entre 5×10^6 e 1×10^7 ($P = 0,0401$) (fig. 5). *G. mellonella* infectada com este fungo as diferenças foram encontradas na comparação das concentrações de 5×10^5 e 1×10^6 ($P = 0,0061$); 1×10^6 e 5×10^6 ($P < 0,0001$); 5×10^6 e 1×10^7 ($P = 0,0003$) (fig 5).

Na tabela 01, estão registrados os dados estatísticos da comparação pontual de cada concentração fúngica entre os modelos *T. molitor* e *G. mellonella*. As larvas inoculadas com *C. albicans* não apresentaram diferença estatística entre os dois modelos utilizados no estudo. Larvas de *T. molitor* e *G. mellonella* infectada com *C. tropicalis* apenas apresentaram diferença significativa com o inóculo de menor concentração, mesmo comportamento observado nas larvas inoculadas com *C. parapsilosis*. As maiores diferenças foram encontradas na comparação entre as larvas inoculadas com *C. glabrata*, que apresentaram diferença significativa nas concentrações de 1×10^5 , 5×10^5 e 5×10^6 , e naquelas inoculadas com *C. guilliermondii* em que as diferenças significativas entre os dois modelos foram encontradas em 1×10^5 , 5×10^5 e 1×10^6 .

4. DISCUSSÃO

O uso de *G. mellonella* para o estudo da virulência do gênero *Candida* já é bem estabelecido, porém, existem poucos trabalhos que utilizam *T. molitor* para esse fim (BRENNAN et al, 2002; LI et al, 2013; DE SOUZA et al, 2015). Brennan e colaboradores (2002), estabeleceram uma relação de virulência entre ratos e *G. mellonella* infectados com *C. albicans*, mostrando ao final dos experimentos o potencial do modelo invertebrado como alternativa ao uso de animais sencientes. Em trabalho prévio realizado pelo nosso grupo de pesquisa nós encontramos que larvas de *T. molitor* infectadas com diferentes concentrações de *C. albicans*, mostraram comportamento dose dependência (DE SOUZA et al, 2015). Em

nosso trabalho a relação de virulência de todas as cepas estudadas com a mortalidade de ambos os insetos utilizados também foi de dose-dependência, dado que reafirma o potencial dos modelos invertebrados como alternativa para esse tipo de estudo. A relação da dose dependência já foi demonstrada em outros estudos na literatura que utilizam estes modelos para o estudo de virulência fúngica (LI et al, 2013; DE SOUZA et al, 2015; MORALEZ et al, 2016)

O gênero *Candida* se destaca como um dos principais agentes etiológicos de infecções fúngicas, principalmente devido ao conjunto de diferentes fatores de virulência que apresenta (O'DONNELL et al, 2015). Tais fatores de virulência são variáveis entre as espécies e são justamente essas diferenças que podem ajudar a explicar a variação da taxa de mortalidade das larvas de *G. mellonella* e *T. molitor* infectados com *Candida* spp. A interação do sistema imunológico das larvas com as diferentes espécies de *Candida* spp. tem um grau de diferença, pois, como dito anteriormente, o conjunto de fatores de virulência que cada uma das espécies apresenta é variado. Por exemplo, a maior parte dos estudos apontam *C. albicans* como a espécie mais virulenta do gênero *Candida*, isso se deve principalmente aos vários fatores de virulência encontrados nessa espécie, os quais irão ajudar o fungo a se estabelecer no hospedeiro e provocar a infecção (CALDERONE; FONZI, 2001; SUDBERY; GOW; BERMAN, 2004; SILVA et al, 2012; MAYER, WILSON, HUBE, 2013; MCMANUS; COLEMAN, 2014; YAPAR, 2014). *C. tropicalis* é uma das espécies do gênero que mais se assemelha geneticamente com *C. albicans*, apresentando também uma variedade de fatores de virulência, como por exemplo capacidade de formação de biofilmes e produção de hifas (YOSHIO, KOUJI, 2006; BUTLER et al, 2009; NEGRI et al, 2012). Tais características ajudam a explicar a pouca variação quando comparamos a taxa de mortalidade das larvas de *G. melonella* e *T. molitor* infectados com *C. albicans* e *C. tropicalis*.

As larvas infectadas com *C. glabrata* e *C. guilliermondii* foram as que mais apresentaram diferenças entre os modelos, sendo que as larvas de *T. molitor* apresentaram maior sensibilidade à infecção por esses dois fungos do que as larvas da mariposa. As variáveis que podem ajudar a explicar a maior sensibilidade de *T. molitor* a essas espécies podem ser desde os fatores de virulência destes fungos e o modo que os mesmos interagem com os mecanismos

de defesa dessa larva, até o tamanho reduzido das mesmas em comparação com *G. mellonella*, o que pode ter contribuído para os resultados encontrados.

Quando avaliamos os resultados fica claro que a utilização de larvas do besouro é tão vantajosa quanto larvas da mariposa. Assim como *G. mellonella*, *T. molitor* pode ser armazenado em temperaturas que variam de 25° C a 37°C, o inóculo pode ser feito por injeção e além da curva de sobrevivência e histopatologia, ensaios *ex vivo*, *in vivo*, e *in vitro* podem ser realizados para complementar a pesquisa. Em países como o Brasil, onde larvas da mariposa não podem ser adquiridas comercialmente, larvas de *T. molitor* podem ser uma alternativa comercialmente viável, pois estas são utilizadas na alimentação de pássaros e outros animais. Mesmo em países onde não existe venda comercial desse coleóptero, é possível realizar a criação e manutenção dos mesmos em laboratório mais facilmente do que a lepdóptera modelo. Os insetos são mantidos em caixas plásticas com uma ração à base de componentes da alimentação humana (farinha, gérmen de trigo e farelo de trigo). Além disso, não são necessárias técnicas de manutenção específicas, sendo apenas necessário a retirada dos animais mortos e a reposição da ração em determinados intervalos de tempo.

Diante dos dados apresentados acima, fica claro que *T. molitor*, apresenta-se como um modelo alternativo para os estudos de virulência fúngica. Seu potencial é confirmado pelos dados apresentados em nosso trabalho, o qual é inédito, pois além de comparar a virulência de várias espécies do gênero *Candida*, também comparou o modelo de *T. molitor* com *G. mellonella*, o qual já é estudado a mais tempo para este fim.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o financiamento deste estudo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasil) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasil), pela bolsa de mestrado concedida.

6. CONFLITO DE INTERESSES

Não existe conflito de interesse.

7. REFERÊNCIAS

BANVILLE, N; BROWNE, N; KAVANAGH K. Effect of nutrient deprivation on the susceptibility of *Galleria mellonella* larvae to infection. **Virulence**, v. 3, n. 6, p. 497-503, 2012.

BRENNAN, M.; THOMAS, D. Y.; WHITEWAY, M. *et al.* Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 34, p. 153-157, 2002.

CHAMILOS, G.; LIONAKIS, M. S.; LEWIS, R. E. *et al.* *Drosophila melanogaster* as a facile model for large-scale studies of virulence mechanisms and antifungal drug efficacy in *Candida* species. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 193, p. 1014-22, 2006.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T.; SILVA, L. R. *et al.* Prospective Observational Study of Candidemia in São Paulo, Brazil: Incidence rate, Epidemiology, and Predictors of Mortality. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 28, n. 5, p. 570-576, 2007.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 5, p. 599-607, 2003.

COOK, S. M; MCARTHUR, J. D. Developing *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens. **Virulence**, n. 4, n. 5, p. 350-353, 2013.

DE SOUZA, P. C.; MOREY, A. T.; CASTANHEIRA, G. M. *et al.* *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) as an alternative host to study fungal infections. **Journal of Microbiological Methods**, v. 118, p. 182-186.

DIETERICH, C.; SCHANDAR, M.; NOLL, M. In vitro reconstructed human epithelia reveal contributions of *Candida albicans* EFG1 and CPH1 to adhesion and invasion. **Microbiology**, v. 148, p. 497-506, 2002.

FUCHS, B.; O'BRIEN, E.; KHOURY, J. B. et al. Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. **Virulence**, v. 1, n. 6, 475-482, 2010.

HAINÉ, E. R.; POLLITT, L. C.; MORET, Y. et al. Temporal patterns in immune responses to a range of microbial insults (*Tenebrio molitor*). **Journal of Insect Physiology**, v. 54, p. 1090-1097, 2008.

HANAOKA, N.; TAKANO, Y.; SHIBUYA, K. et al. Identification of the putative protein phosphatase gene PTC1 as a virulence-related gene using a silkworm model of *Candida albicans* infection. **Eukaryotic cell**, v. 7, n. 10, p. 1640-48, 2008.

HOLZHEIMER, R. G.; DRALLE, H. Management of mycoses in surgical patients review of the literature. **European Journal of Medical Research**, v. 7, p. 200-226, 2002.

JACOBSEN, I. D.; GROBE, K.; BERNDT, A. et al. Pathogenesis of *Candida albicans* infections in the alternative chorio-allantoic membrane chicken embryo model resembles systemic murine infections. **PLOS One**, v. 6, n. 5, p. 1-15, 2011.

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.

KOJIC, E.; DAROUICHE, R. O. Candida infections of medical devices. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 2, p. 255-267, 2004.

LASS-FLORL, C. The changing face of epidemiology of invasives fungal disease in Europe. **Mycoses**, v. 52, p. 197-205, 2009.

LI, D. D. Using *Galleria mellonella-Candida albicans* infection model to evaluate antifungal agents. **Biol. Pharm. Bull**, v. 36, n. 9, p. 1482-1487, 2013.

MORALEZ, A. T. P.; PERINI, H. F.; MAIA, L. F. et al. Phenotypic switching of *Candida tropicalis* is associated with cell damage in epithelial cells and virulence in *Galleria mellonella* model. **Virulence**, v. 7, n. 4, p. 379-386, 2016.

NUCCI, M.; QUEIROZ-TELLES, F.; ALVARADO-MATUTE, T. et al. Epidemiology of candidemia in Latin America: A laboratory-based survey. **PLOS One**, v. 8, n. 3, p. 1-7, 2013.

OPPERT, B.; DOWD, S. E.; BOUFFARD, P. et al. Transcriptome Profiling of the Intoxication Response of *Tenebrio molitor* Larvae to *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa Protoxin. **Plos One**, v. 7, n. 4, p. 1-12, 2012.

PUKKILA-WORLEY, R.; PELEG, A. Y.; TAMPAKAKIS, E. et al. *Candida albicans* hyphal formation and virulence assessed using a *Caenorhabditis elegans* infection model. **Eukaryotic Cell**, v. 8, n. 11, p. 1750-58, 2009.

QUINTIN, J.; ASMAR, J.; MATSKEVICH, A. A. et al. The *Drosophila* toll pathway controls but does not clear *Candida glabrata* infections. **The Journal of Immunology**, v. 190, p. 2818-27, 2013.

REEVES, E. P.; MESSINA, C. G.; DOYLE, S. et al. Correlation between gliotoxin production and virulence of *Aspergillus fumigatus* in *Galleria mellonella*. **Mycopathologia**, v. 158, n. 1, p. 73-79, 2004.

RUPING, M. J. G. T.; VEHRÉSCHILD, J. J.; CORNELLY, O. A. Patients at High Risk of invasive Fungal Infections. **Drugs**, v. 14, p. 194-196, 2008.

SANCHEZ, A. A.; JOHNSTON, D. A.; MYERS, C. et al. Relationship between *Candida albicans* virulence during experimental hematogenously disseminated infection and endothelial cell damage in vitro. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 1, p. 598-601, 2004.

SILVA, A. P., MIRANDA, I. M.; LISBOA, C. et al. Prevalence, distribution, and antifungal susceptibility profiles of *Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis* in a tertiary care hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 8, p. 2392-2397, 2009.

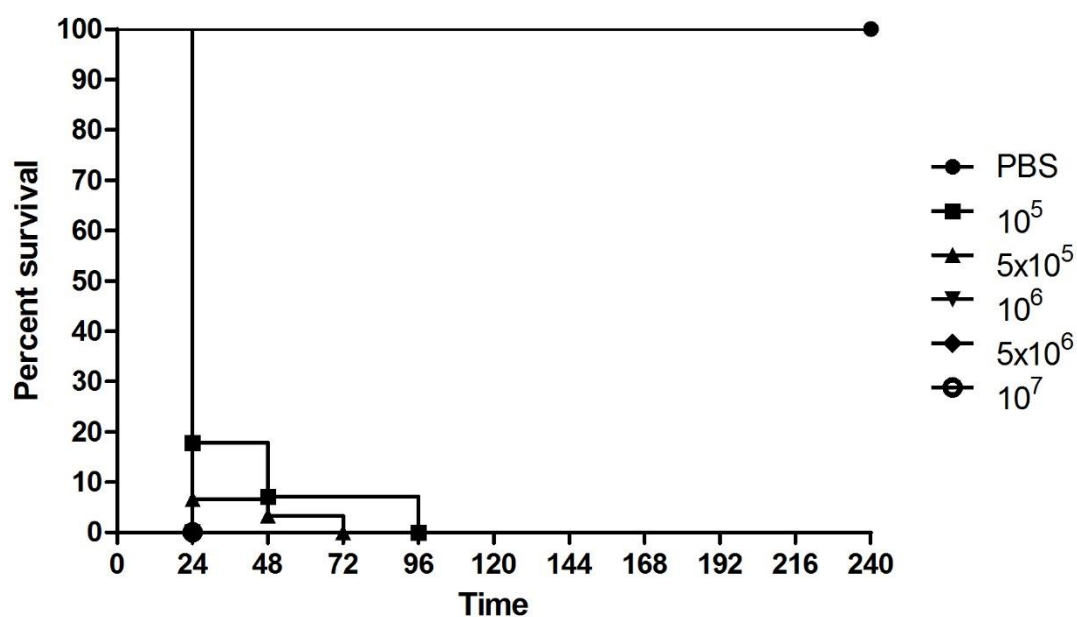
SOLL, D. R. Candida commensalism and virulence: the evolution of phenotypic plasticity. **Acta Tropica**, v. 81, p. 101-110, 2002.

TSAI, C. J; LOH, J. M. S; PROFT, T. *Galleria mellonella* infections models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. **Virulence**, v. 7, n. 3, p. 214-229, 2016.

YAPAR, N. Epidemiology and risk factor for invasive candidiasis. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 10, p. 95-105, 2014.

8. IMAGENS

A



B

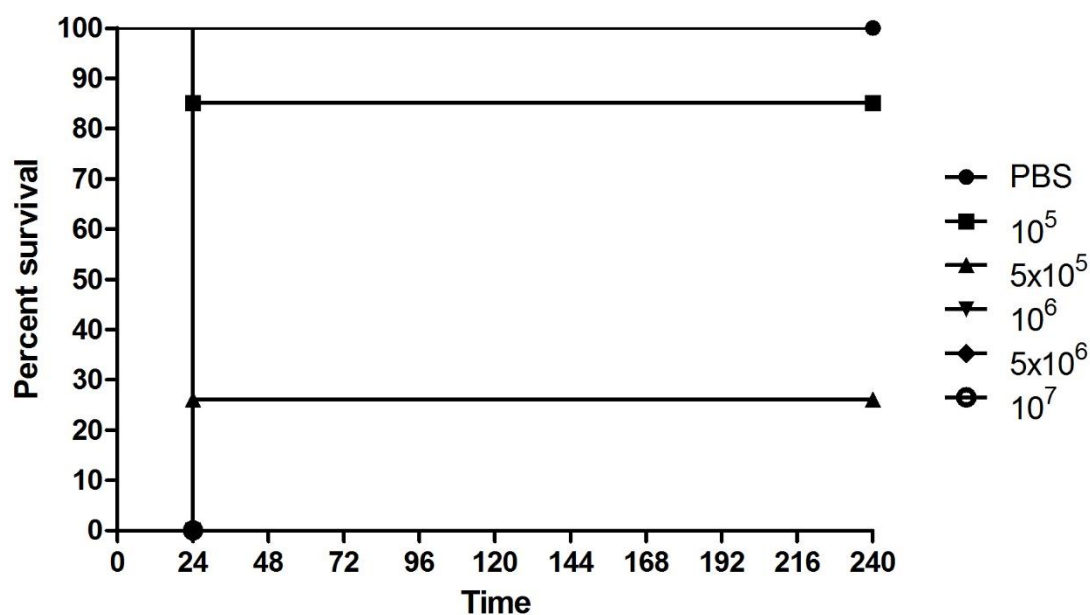


Figura 01 - Curvas de sobrevivência para *T. molitor* (A) e *G. mellonella* (B), inoculados com diferentes concentrações de *C. albicans* SC5314. A morte das larvas apresentou-se inóculo dependente. Não houve diferença estatística significativa na morte das larvas de *T. molitor* inoculados com *C. albicans* (Teste Log rank). O grupo controle apresenta larvas inoculadas com PBS. B: Concentração de 5×10^5 foi significativamente mais letal para larvas de *G. mellonella* que a concentração de 10^5 ($P < 0,0001$). O inóculo de 1×10^6 foi mais letal do que 5×10^5 ($P = 0,0033$). O experimento foi realizado em triplicata sendo que o n amostral para cada um dos experimentos foi de 10 larvas. O valor de P considerado significativo foi quando ele era $< 0,05$ (Teste Log rank).

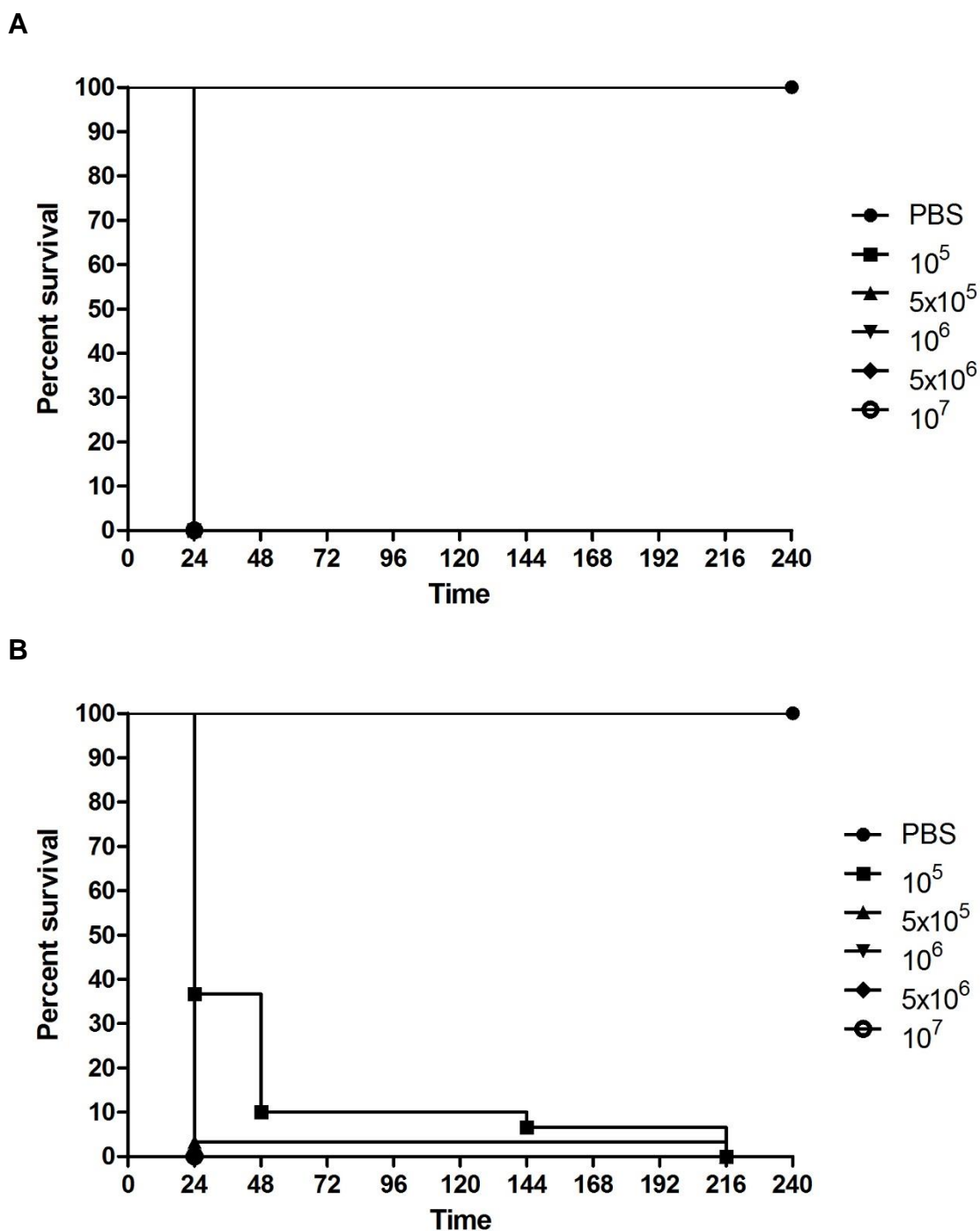
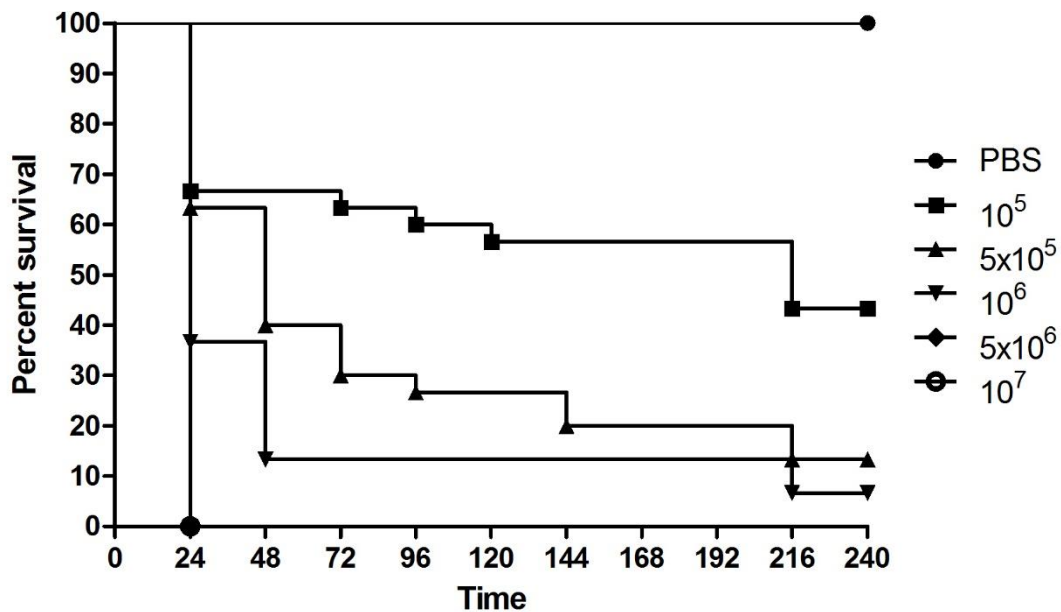


Figura 02 - Curvas de sobrevivência para *T. molitor* (A) e *G. mellonella* (B), inoculados com diferentes concentrações de *C. tropicalis* ATCC 200956. A: Não houve diferença estatística significativa na morte das larvas de *T. molitor* inoculados com *C. tropicalis* (Teste Log rank). B: Concentração de 5×10^5 foi significativamente mais letal para larvas de *G. mellonella* que a concentração de 10^5 ($P=0,0156$). O grupo controle era composto por larvas inoculadas com PBS. O experimento foi realizado em triplicata, sendo que o n amostral para cada um dos experimentos foi de 10 larvas. O valor de P considerado significativo foi quando ele era $<0,05$ (Teste Log rank).

A



B

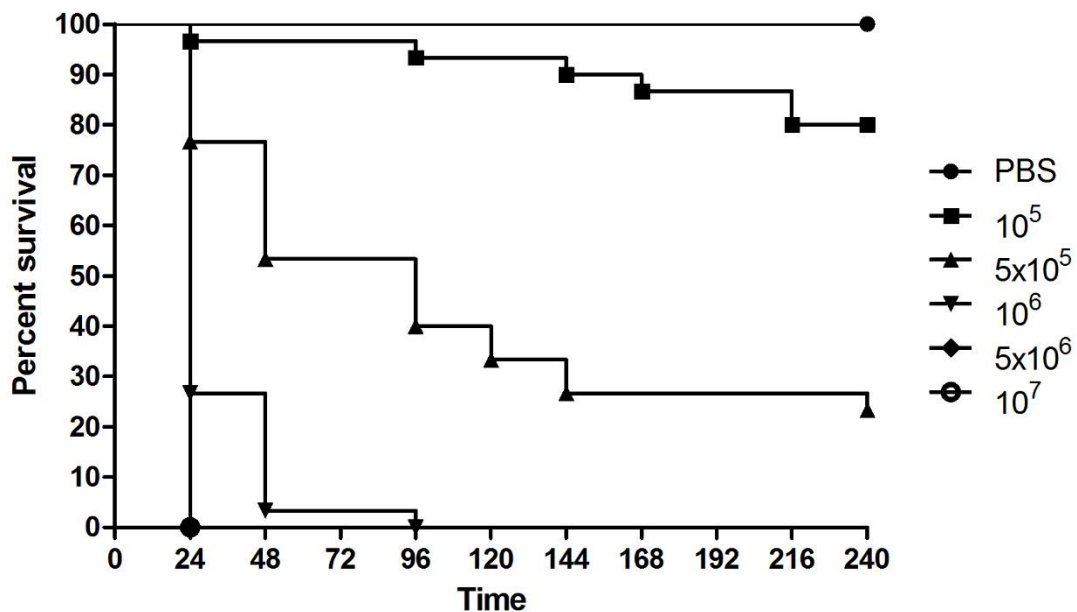
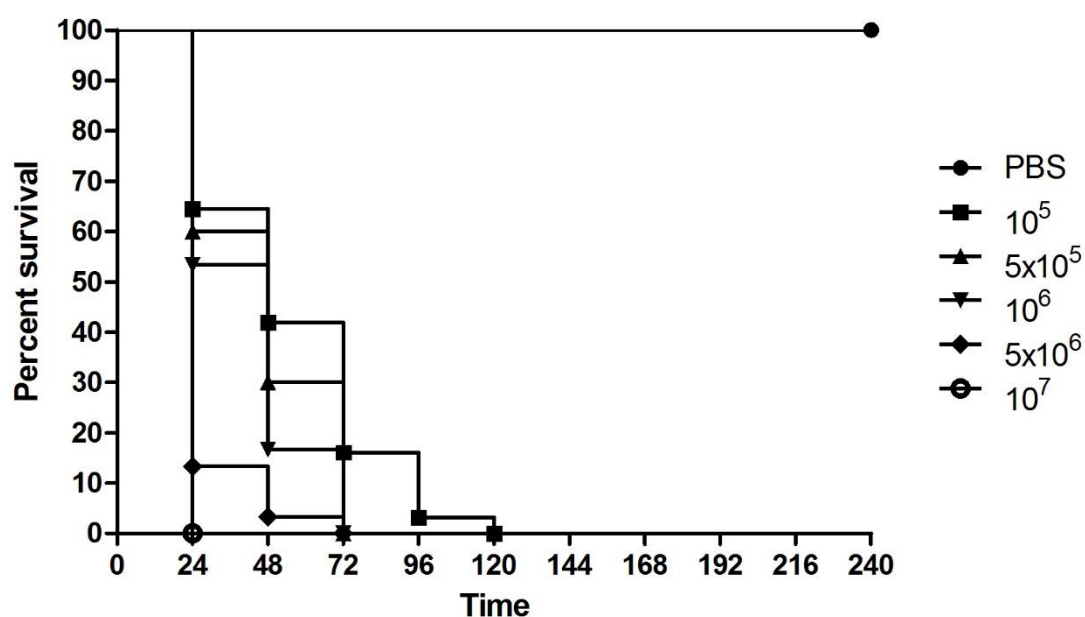


Figura 03 - Curvas de sobrevivência para *T. molitor* (A) e *G. mellonella* (B), inoculados com diferentes concentrações de *C. parapsilosis* ATCC 22019. A: Concentração de 5x10⁵ resultou em maior taxa de mortalidade de larvas de *T. molitor* do que a concentração de 1x10⁵ (P= 0,0075). A concentração de 5x10⁶ foi significativamente mais letal para larvas de *T. molitor* do que 1x10⁶ (P=0,0003). B: A concentração de 5x10⁵ provocou mais mortes de *G. mellonella* do que a 1x10⁵ (P<0,0001). O inóculo de 1x10⁶ foi mais letal do que 5x10⁵ (P<0,0001). A concentração de 5x10⁶ provocou maior taxa de mortalidade que 1x10⁶ (P= 0,0026). O grupo controle era composto por larvas inoculadas com PBS. O experimento foi realizado em triplicata, sendo que o n amostral para cada um dos experimentos foi de 10 larvas. O valor de P considerado significativo foi quando ele era <0,05 (Teste Log rank).

A



B

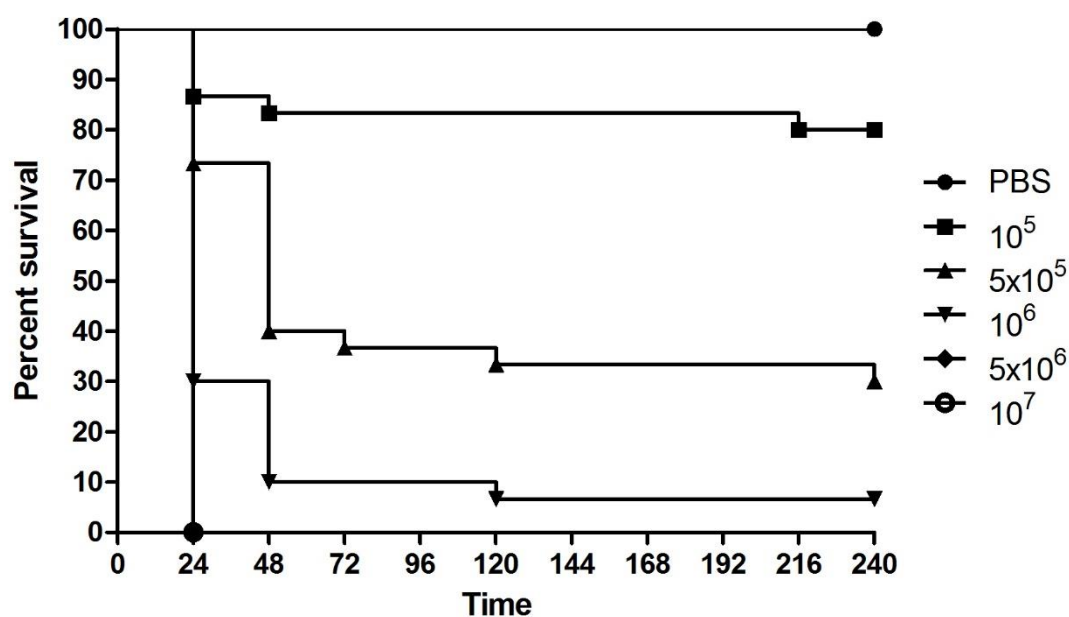


Figura 04 - Curvas de sobrevivência para *T. molitor* (A) e *G. mellonella* (B), inoculados com diferentes concentrações de *C. glabrata* ATCC MYA 2950. A: Concentração de 5x10⁶ resultou em maior taxa de mortalidade de larvas de *T. molitor* do que a concentração de 1x10⁶ (P<0,0022). A concentração de 1x10⁷ foi significativamente mais letal para larvas de *T. molitor* do que 5x10⁶ (P=0,0401). B: A concentração de 5x10⁵ provocou mais mortes de *G. mellonella* do que a 1x10⁵ (P= 0,0002). O inóculo de 1x10⁶ foi mais letal do que 5x10⁵ (P= 0,0011). A concentração de 5x10⁶ provocou maior taxa de mortalidade que 1x10⁶ (P= 0,0013). O grupo controle era composto por larvas inoculadas com PBS. O experimento foi realizado em triplicata, sendo que o n amostral para cada um dos experimentos foi de 10 larvas. O valor de P considerado significativo foi quando ele era <0,05 (Teste Log rank).

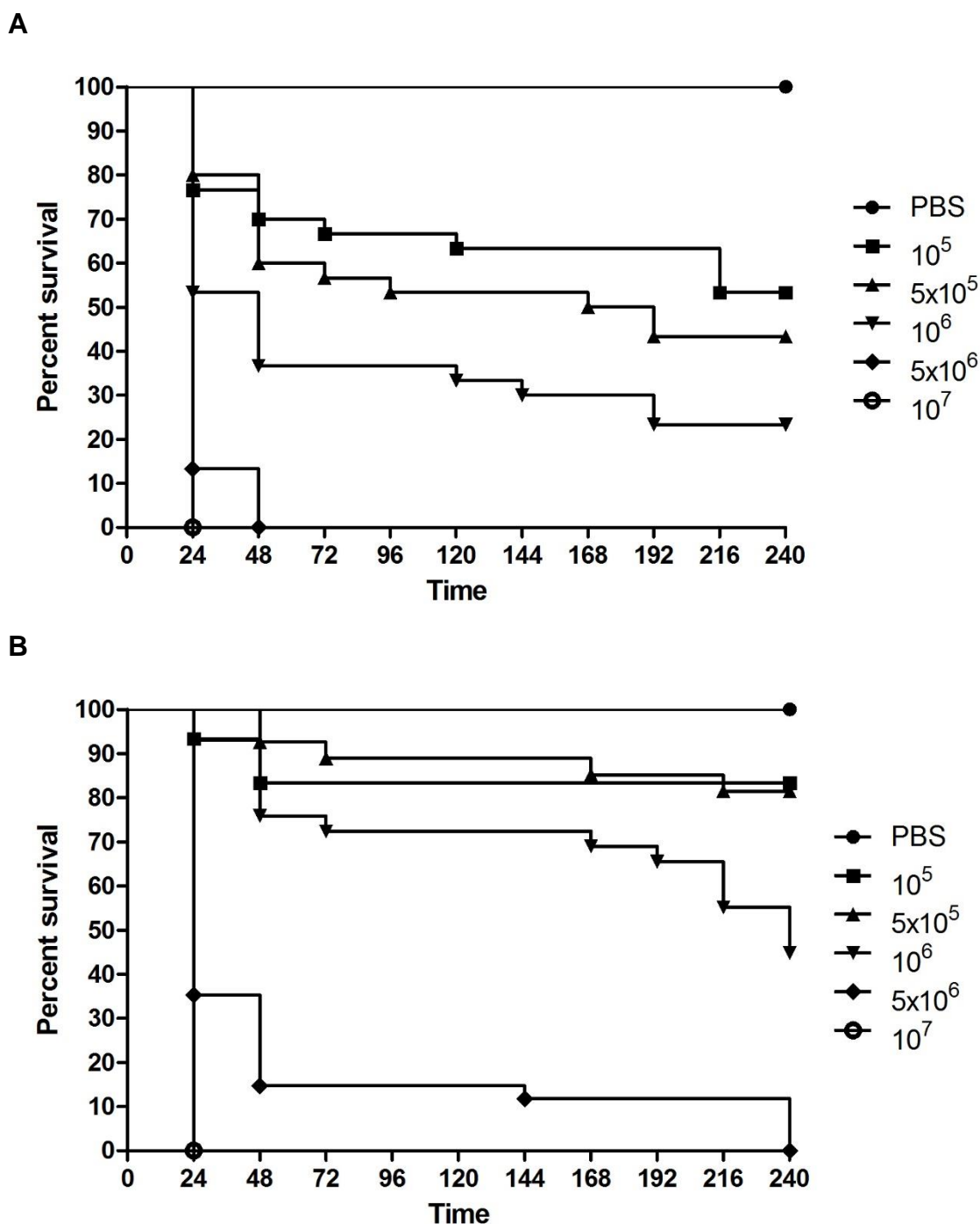


Figura 05 - Curvas de sobrevivência para *T. molitor* (A) e *G. mellonella* (B), inoculados com diferentes concentrações de *C. guilliermondii* ATCC6260. A: Concentração de 5×10^6 resultou em maior taxa de mortalidade de larvas de *T. molitor* do que a concentração de 1×10^6 ($P < 0,0001$). A concentração de 1×10^7 foi significativamente mais letal para larvas de *T. molitor* do que 5×10^6 ($P = 0,0401$). B: A concentração de 1×10^6 provocou mais mortes de *G. mellonella* do que a 5×10^5 ($P = 0,0061$). O inóculo de 5×10^6 foi mais letal do que 1×10^6 ($P < 0,0001$). A concentração de 1×10^7 provocou maior taxa de mortalidade que 5×10^6 ($P = 0,0003$). O grupo controle era composto por larvas inoculadas com PBS. O experimento foi realizado em triplicata, sendo que o n amostral para cada um dos experimentos foi de 10 larvas. O valor de P considerado significativo foi quando ele era $< 0,05$ (Teste Log rank).

Tabela 01 – Dados estatísticos da comparação das diferentes concentrações de *Candida* spp em *Tenebrio molitor* e *Galleria mellonella*.

Cepas	Concentração inóculo				
	1x10 ⁵	5x10 ⁵	1x10 ⁶	5x10 ⁶	1x10 ⁷
<i>C. albicans</i>	NS	NS	NS	NS	NS
<i>C. tropicalis</i>	p=0,0003	NS	NS	NS	NS
<i>C. parapsilosis</i>	p=0,0066	NS	NS	NS	NS
<i>C. glabrata</i>	p<0,0001	p=0,0141	NS	p=0,0401	NS
<i>C. guilliermondii</i>	p=0,0052	p=0,0149	p=0,0078	NS	NS

NS= diferença não significativa estatisticamente. Os valores de p foram considerados significativos quando eram < 0,05

5.3 Artigo 3

Disruption of protein mannosylation affects *Candida guilliermondii* cell wall, immune sensing, and virulence.



Disruption of Protein Mannosylation Affects *Candida guilliermondii* Cell Wall, Immune Sensing, and Virulence

Maria J. Navarro-Arias¹, Tatiana A. Defosso^{2,3}, Karine Demanthon⁴, Katalin Csonka⁵, Erika Mollado-Mojica⁶, Alino Dias Valério⁷, Roberto J. González-Hernández¹, Vincent Courdavault², Marc Clastre², Nahúm V. Hernández¹, Luis A. Pérez-García¹, Dhirendra K. Singh⁵, Csaba Vizler⁸, Attila Gácosor⁵, Ricardo S. Almeida⁷, Thierry Noël⁴, Marcelos G. López⁶, Nicolas Papon^{3*} and Héctor M. Mora-Montes^{1*}

¹ División de Ciencias Naturales y Exactas, Departamento de Biología, Universidad de Guanajuato, Guanajuato, Mexico, ² Biologiques et Biotechnologies Vegetales, Université François-Rabelais de Tours, Tours, France, ³ Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène, Université d'Angers, Angers, France, ⁴ Laboratoire de Microbiologie Fondamentale et Pathogénicité, Université Bordeaux 2, UMR-Centre National de la Recherche Scientifique 5294, Bordeaux, France, ⁵ Department of Microbiology, University of Szeged, Szeged, Hungary, ⁶ Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (IPN), Guanajuato, Mexico, ⁷ Departamento de Microbiología, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brazil, ⁸ Institute of Biochemistry, Biological Research Center of the Hungarian Academy of Sciences, Szeged, Hungary

OPEN ACCESS

Edited by:

Caraïne Washbar, Medical University of South Carolina, USA

Reviewed by:

Flávia Ana Hill, University of Birmingham, UK
Guilherme Lenz Sassaki, Federal University of Paraná, Brazil

*Correspondence:

Nicolas Papon
nicolas.papon@univ-angers.fr
Héctor M. Mora-Montes
hmora@ugto.mx

Specialty section:

This article was submitted to Fungi and Their Interactions, a section of the journal Frontiers in Microbiology

Received: 13 September 2016

Accepted: 21 November 2016

Published: 02 December 2016

Citation:

Navarro-Arias MJ, Defosso TA, Demanthon K, Csonka K, Mollado-Mojica E, Dias Valério A, González-Hernández RJ, Courdavault V, Clastre M, Hernández NV, Pérez-García LA, Singh DK, Vizler C, Gácosor A, Almeida RS, Noël T, López MG, Papon N and Mora-Montes HM (2016) Disruption of Protein Mannosylation Affects *Candida guilliermondii* Cell Wall, Immune Sensing, and Virulence. *Front. Microbiol.* 7:1961. doi: 10.3389/fmicb.2016.01961

The fungal cell wall contains glycoproteins that interact with the host immune system. In the prominent pathogenic yeast *Candida albicans*, Pmr1 acts as a Golgi-resident ion pump that provides cofactors to mannosyltransferases, regulating the synthesis of mannans attached to glycoproteins. To gain insight into a putative conservation of such a crucial process within opportunistic yeasts, we were particularly interested in studying the role of the *PMR1* homolog in a low-virulent species that rarely causes candidiasis, *Candida guilliermondii*. We disrupted *C. guilliermondii* *PMR1* and found that loss of Pmr1 affected cell growth and morphology, biofilm formation, susceptibility to cell wall perturbing agents, mannan levels, and the wall composition and organization. Despite the significant increment in the amount of β 1,3-glucan exposed at the wall surface, this positively influenced only the ability of the mutant to stimulate IL-10 production by human monocytes, suggesting that recognition of both mannan and β 1,3-glucan, is required to stimulate strong levels of pro-inflammatory cytokines. Accordingly, our results indicate *C. guilliermondii* sensing by monocytes was critically dependent on the recognition of N-linked mannans and β 1,3-glucan, as reported in other *Candida* species. In addition, chemical removal of cell wall O-linked mannans was found to positively influence the recognition of *C. guilliermondii* by human monocytes, suggesting that O-linked mannans mask other cell wall components from immune cells. This observation contrasts with that reported in *C. albicans*. Finally, mice infected with *C. guilliermondii* *pmr1* Δ null mutant cells had significantly lower fungal burdens compared to animals challenged with the parental strain. Accordingly, the null mutant showed inability to kill larvae in the *Galleria mellonella* infection model. This study thus demonstrates that mannans are relevant for the *C. guilliermondii*-host interaction, with an atypical role for O-linked mannans.

Keywords: cell wall, mannosylation pathway, *Candida guilliermondii*, host-fungus interplay, virulence, protein glycosylation

6. CONCLUSÕES

Através dos dados obtidos no presente trabalho foi possível observar o grande potencial de *T. molitor* nas pesquisas científicas, principalmente no que se refere a estudos de patogenicidade e virulência microbiana. *T. molitor* apresenta-se, além de uma alternativa ao modelos hospedeiros clássicos utilizados na pesquisa científica, mas também como uma alternativa para outro hospedeiro invertebrado já utilizado nas pesquisas científicas, as larvas de *G. mellonella*. Diferentemente de *G. mellonella*, o *T. molitor* pode ser obtido comercialmente no Brasil, o que favorece as pesquisas científicas, facilitando a aquisição do modelo e consequentemente as pesquisas na área.

Apesar dos resultados favoráveis ainda existe um longo caminho a ser percorrido até que os modelos hospedeiros alternativos sejam aceitos e utilizados amplamente no meio científico. Para que isto aconteça, a padronização de metodologias de criação e experimentação deve se estabelecer, também devem-se aumentar as pesquisas para o sequenciamento do genoma desses insetos. Tais atitudes irão trazer mais reprodutibilidade aos ensaios, além de poder propiciar novos caminhos a serem explorados no campo da metodologia alternativa na pesquisa científica.