



UEPB

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I – CAMPINA GRANDE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO EM ODONTOLOGIA**

LETÍCIA TARGINO CAMPOS

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO FLUCONAZOL EM MODELO EXPERIMENTAL *In vivo* DE *Galleria mellonella*: UM ESTUDO PARA PADRONIZAÇÃO.

**CAMPINA GRANDE
2022**

LETÍCIA TARGINO CAMPOS

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO FLUCONAZOL EM MODELO EXPERIMENTAL *In vivo* DE *Galleria mellonella*: UM ESTUDO PARA PADRONIZAÇÃO.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Área de concentração: Clínicas odontológicas.

Orientador: Profa. Dra. Edja Maria Melo de Brito Costa.

Coorientador: Prof. Dr. Diego Romário da Silva.

**CAMPINA GRANDE
2022**

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

C198a Campos, Letícia Targino.

Atividade antifúngica do fluconazol em modelo experimental *In vivo* de *Galleria mellonella* [manuscrito] : um estudo para padronização / Letícia Targino Campos. - 2022.
43 p.

Digitado.

Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2022.

"Orientação : Profa. Dra. Edja Maria Melo de Brito Costa, Coordenação do Curso de Odontologia - CCBS."

1. Modelos animais. 2. *Candida albicans*. 3. Candidíase. 4. Fluconazol. 5. Atividade antifúngica. I. Título

21. ed. CDD 615.321

LETÍCIA TARGINO CAMPOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Odontologia.

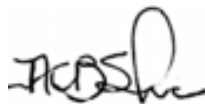
Área de concentração: Clínicas odontológicas.

Aprovada em: 10/08/2022.

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Edja Maria Melo de Brito Costa (Orientadora)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Dra. Andréa Cristina Barbosa da Silva
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Profa. Dra. Josy Goldoni Lazarini
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

À minha família, em especial, meus pais, Eliete e Alexandre, pelo amor, força e suporte incondicionais.

À minha orientadora, Edja Costa, e co-orientador, Diego Romário, pela confiança e incentivo constantes para meu crescimento.

Dedico-lhes este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, Força que me guia, sustenta e protege, pelo amparo sempre presente em todos os momentos da minha trajetória. Nos meus dias mais difíceis, obrigada por me lembrar de respirar e desacelerar, ao se mostrar para mim através de sutilezas como um entardecer ou no soprar da brisa.

À minha família, em especial aos meus pais, Eliete e Alexandre, pela vida, pelo amor, por me transmitirem os meus melhores valores, pela dedicação e esforço para proporcionarem a educação que me permitiu a realização dos meus maiores sonhos. Agradeço aos meus irmãos, Luana, Daniel, Eládio e Davi (in memoriam), por serem fontes inesgotáveis de afeto, por trazerem leveza aos meus dias, por me permitirem ser exemplo para a vida de vocês.

Às minhas tias, Andréa e Aretuza, à minha prima Isla, ao meu Tio Sandro, à minha madrastra Manuela, ao meu padrasto Ederaldo e ao meu cunhado Gabriel, pelo apoio constante, por participarem ativamente da minha vida como incentivadores para o meu crescimento.

Aos que já partiram, mas que permanecem presentes no meu caminho. Obrigada pela contribuição fundamental na minha criação, por nunca medirem esforços para cuidarem de mim com todo carinho e atenção. Obrigada por sempre me impulsionarem a dar passos além do que eu me julgava capaz, porque apenas dessa forma eu pude chegar até aqui. Obrigada à minha tia, Shirlaine, meus avós maternos, Maria José e Francisco Eládio, e paternos, Maria de Fátima e José Targino.

Agradeço a Luiz Bonfim, meu amado, amigo e companheiro de todas as horas, pelo cuidado constante, por nunca soltar a minha mão, nos momentos bons ou ruins, por me apoiar continuamente no alcance dos meus propósitos, como se fossem seus. Obrigada por acreditar em mim e por ser meu porto seguro.

À minha querida orientadora, Edja Costa, pelo acolhimento, pelos conselhos, pela generosidade em compartilhar suas experiências e conhecimento

comigo. Palavras são insuficientes para expressar minha gratidão pela oportunidade de concluir esta etapa sob sua orientação e por ter aprendido tanto ao seu lado. O mestrado intensificou o carinho e a admiração que sinto por você desde a graduação. Desejo, sinceramente, que possamos preservar este vínculo.

Ao meu querido co-orientador, Diego Romário, por me transmitir seus saberes com tamanha presteza e paciência. Obrigada por me encorajar e mostrar a beleza que existe na realização da ciência, constantemente. Foi uma honra poder contar com as suas valiosas contribuições durante esta jornada. A você todo meu respeito e estima.

Ao Programa de Pós-graduação em Odontologia (PPgO) da Universidade Estadual da Paraíba, incluindo todos os professores que o compõem, pela oportunidade de aprendizado, de desenvolvimento intelectual e profissional.

À minha grande amiga Laís Gonzaga, também companheira nesta jornada, pela preciosa amizade, pelo apoio incondicional. Obrigada por simplesmente estar presente. Sei que tanto para ultrapassar os percalços da jornada como para vibrar as conquistas, posso contar com você. Que sigamos juntas.

À querida Priscila Guimarães, por toda ajuda, dedicação e disponibilidade em me ensinar de técnicas laboratoriais até a prática da docência. Sua colaboração foi fundamental para a realização deste trabalho. Agradeço também pelos conselhos e pelo suporte, conviver com você durante esta etapa foi uma surpresa muito especial para mim. Torço, verdadeiramente, pelo sucesso.

Aos meus colegas de turma, pela parceria e pela troca, sempre engrandecedora, durante esses anos. Todos, cada um à sua maneira, tornaram-se queridos para mim. Mesmo diante de todas as adversidades da pandemia, é notável o carinho e união que existe entre nós. Desejo a vocês sucesso nos novos ciclos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro que viabilizou esta pesquisa - Código de Financiamento 001.

RESUMO

A incidência de infecções fúngicas e a crescente resistência aos antifúngicos são desafios atuais na área da saúde e justificam a realização de estudos que prospectem novas terapias ou terapias adjuvantes. A candidíase sistêmica ocorre, especialmente, em ambiente hospitalar, contribuindo com altas taxas de mortalidade, entre 58 a 81% dos casos de infecções nosocomiais. O invertebrado *Galleria mellonella* tem recebido cada vez mais destaque como um modelo alternativo ao uso de animais, porém existe uma alta variabilidade de parâmetros encontrados nos estudos de infecção por espécies de *Candida* neste modelo experimental. Este estudo objetivou padronizar um modelo experimental para prospecção de novas drogas anticandida por meio do modelo animal alternativo de larvas de *G. mellonella*. Realizou-se um estudo experimental in vivo, com observação direta em laboratório. Culturas de cepas de *C. albicans*, sendo duas padronizadas (ATCC 90028 e ATCC10231) e duas isoladas da cavidade oral (A1 e A2) foram padronizadas em diferentes densidades de inóculo para determinação dos níveis de infecção (infecção não-letal; infecção letal e super infecção). Foram realizados testes de toxicidade do fluconazol em diferentes dosagens. As larvas infectadas foram submetidas a diferentes modelos de tratamento com fluconazol (diferentes dosagens de antifúngico e momentos de administração). Os dados obtidos a partir da análise da viabilidade foram plotados em curvas de sobrevivência de Kaplan–Meier e analisados pelo teste log-rank, no GraphPad Prism 5.0 ($p < 0,05$). Os inóculos fúngicos na densidade 2×10^4 , 2×10^5 e 2×10^6 cél/mL foram determinados como infecções não-letais; na densidade 2×10^7 cél/mL apenas o isolado clínico A2 foi capaz de provocar infecção letal; a densidade 2×10^8 cél/mL foi determinada como capaz de provocar super infecção. O fluconazol apresentou baixa toxicidade para as larvas de *G. mellonella*. Dentre os modelos de tratamento testados, as terapias com aplicação dose única de 20mg/kg e 80mg/kg de fluconazol foram as que proporcionaram melhores taxa de sobrevivência de larvas *G. mellonella* com infecção letal e super infecção por *C. albicans*, respectivamente. Os parâmetros metodológicos utilizados neste estudo acerca dos níveis de infecção, toxicidade do antifúngico sistêmico fluconazol, bem como dos modelos de tratamento com diferentes dosagens de fluconazol, podem ser utilizados como

parâmetros em estudos para a prospecção de drogas anticandida no modelo experimental *G. mellonella*.

Palavras-Chave: modelos animais; *Candida albicans*; candidíase; fluconazol.

ABSTRACT

The incidence of fungal infections and the growing resistance to antifungals are current challenges in the health area and justify the performance of studies that prospect new therapies or adjuvant therapies. Systemic candidiasis occurs, especially, in a hospital environment, contributing to high mortality rates, between 58 to 81% of cases of nosocomial infections. The invertebrate *Galleria mellonella* has received increasing attention as an alternative model to the use of animals, but there is a high variability of parameters found in studies of infection by *Candida* species in this experimental model. This study aimed to standardize an experimental model for prospecting new anticandida drugs through the alternative animal model of *G. mellonella* larvae. An experimental study was carried out in vivo, with direct observation in the laboratory. Cultures of *C. albicans* strains, two standardized (ATCC 90028 and ATCC10231) and two isolated from the oral cavity (A1 and A2) were standardized in different inoculum densities to determine the levels of infection (non-lethal infection; lethal infection and super infection). Fluconazole toxicity tests were performed at different dosages. The infected larvae were submitted to different models of fluconazole treatment (different antifungal dosages and administration times). The data obtained from the viability analysis were plotted on Kaplan–Meier survival curves and analyzed by the log-rank test in GraphPad Prism 5.0 ($p < 0.05$). Fungal inocula at 2×10^4 , 2×10^5 and 2×10^6 cél/mL density were determined as non-lethal infections; at 2×10^7 cél/mL density, only the clinical isolate A2 was able to cause lethal infection; the 2×10^8 cél/mL density was determined to cause super infection. Fluconazole showed low toxicity to *G. mellonella* larvae. Among the treatment models tested, therapies with a single dose of 20mg/kg and 80mg/kg of fluconazole were the ones that provided the best survival rate of *G. mellonella* larvae with lethal infection and super infection by *C. albicans*, respectively. The methodological parameters used in this study regarding the levels of infection, toxicity of the systemic antifungal fluconazole, as well as the treatment models with different doses of fluconazole, can be used as parameters in studies for the prospection of anticandida drugs in the experimental model *G. mellonella*.

Keywords: animal models; *Candida albicans*; candidiasis; fluconazole.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Processos de criação de <i>G. mellonella</i> sugerido por Jorjão <i>et al.</i> (2018).....	22
Figura 2 – Curva de sobrevivência de Kaplan-Maier de larvas de <i>G. mellonella</i> infectadas por <i>C. albicans</i> ATCC 10231 ($p > 0.05$, log-ranktest).....	28
Figura 3 – Curva de sobrevivência de Kaplan-Maier de larvas de <i>G. mellonella</i> infectadas por <i>C. albicans</i> ($p > 0.05$, log-rank test).....	29
Figura 4 – Curva de sobrevivência de Kaplan-Maier de larvas de <i>G. mellonella</i> infectadas por <i>C. albicans</i> ATCC 10231 e tratadas com fluconazol (FCZ), em diferentes doses ($p > 0.05$, log-rank test).....	30
Figura 5 – Curva de sobrevivência de Kaplan-Maier de larvas de <i>G. mellonella</i> infectadas por <i>C. albicans</i> (isolado clínico A1) e tratadas com fluconazol (FCZ), em diferentes doses ($p > 0.05$, log-rank test).....	30
Figura 6 – Curva de sobrevivência de Kaplan-Maier de larvas de <i>G. mellonella</i> infectadas por <i>C. albicans</i> (isolado clínico A2) e tratadas com fluconazol (FCZ), em diferentes doses ($p > 0.05$, log-rank test).....	31
Figura 7 – Curva de sobrevivência de Kaplan-Maier de larvas de <i>G. mellonella</i> infectadas por <i>C. albicans</i> (ATCC 90028) e tratadas com fluconazol (FCZ), em diferentes doses ($p > 0.05$, log-rank test).....	31

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Requisitos de cultivo de <i>G. mellonella</i> sugeridos por Jorjão <i>et al</i> , 2018.....	21
Quadro 2 – Distribuição dos grupos de acordo com os diferentes modelos de tratamento com fluconazol em larvas de <i>G. mellonella</i> infectadas por <i>C. albicans</i>	26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	American Type Culture Collection
ASD	Ágar Sabouraud Dextrose
B.O.D	Biochemical Oxygen Demand
CSD	Caldo Sabouraud Dextrose
EROs	Espécies Reativas do Oxigênio
FCZ	Fluconazol
FCZ20	Dose única de fluconazol: 20mg/kg
FCZ40	Dose única de fluconazol: 40mg/kg
FCZ80	Dose única de fluconazol: 80mg/kg
FCZ20/ 20	Dose inicial de fluconazol: 20mg/kg e Reaplicação da mesma dosagem.
FCZ40/ 40	Dose inicial de fluconazol: 40mg/kg e Reaplicação da mesma dosagem.
FCZ80/ 20	Dose inicial de fluconazol: 80mg/kg e Reaplicação da dose de fluconazol 20mg/kg.
FCZ80/ 40	Dose inicial de fluconazol: 80mg/kg e Reaplicação da dose de fluconazol 40mg/kg.
LAD	Laboratório de Análises e Diagnóstico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 Candidíase	16
2.2 Modelos alternativos ao uso de animais maiores em pesquisa	17
2.3 Galleria mellonella	18
3 OBJETIVOS	20
3.1 Objetivo geral	20
3.2 Objetivos específicos	20
4 METODOLOGIA	21
4.1 Delineamento do estudo	21
4.2 Local de realização da pesquisa	21
4.3 Cultivo das larvas G. mellonella	21
4.4 Amostra	22
4.5 Preparo do inóculo de C. albicans	23
4.6 Preparo de antifúngico	23
4.7 Análise da viabilidade de G. mellonella	23
4.8 Etapas da pesquisa	23
4.8.1 Estudo piloto	23
4.8.2 Determinação dos níveis de infecção por C. albicans	24
4.8.3 Toxicidade sistêmica aguda do fluconazol	24
4.8.4 Tratamento da infecção	25
4.8.5 Controle da pesquisa	27
4.9 Análise estatística	27
5 RESULTADOS	28
5.1 Estudo Piloto	28
5.2 Determinação dos níveis de infecção por C. albicans	28
5.3 Toxicidade sistêmica aguda do fluconazol	29
5.4 Tratamento de infecção por C. albicans com fluconazol	29
5.5 Controle da pesquisa	31
7 CONCLUSÕES	36
REFERÊNCIAS	37

1 INTRODUÇÃO

A prevalência e incidência de infecções fúngicas, bem como a crescente resistência aos antifúngicos são, atualmente, graves problemas de saúde pública, e, justificam a realização de estudos que prospectem novas terapias ou terapias adjuvantes (Vallabhaneni et al, 2016; Łukaszuk; Krajewska-Kułak; Kułak, 2017; Chiurlo et al, 2021; Lakoh et al, 2021). Dentre as infecções fúngicas, aquelas causadas por espécies de *Candida*, principalmente pela *Candida albicans* (*C. albicans*), são as mais comuns e foco da maioria dos estudos (Clarck-Ordóñez et al, 2017; Di Cosola et al, 2021; Kotey et al, 2021; Rasoulpoor et al, 2021). A candidíase mucocutânea superficial é a forma mais frequente e menos grave. Porém pode evoluir para uma condição sistêmica, especialmente, em ambiente hospitalar, contribuindo com altas taxas de mortalidade, entre 58 a 81% dos casos de infecções nosocomiais (Delaloye, Calandra, 2014; Lewis, Williams, 2017; Vaezi et al., 2017; Nikou et al, 2019; Bhattacharya et al, 2020).

O desenvolvimento de novas alternativas para facilitar a realização de ensaios pré-clínicos, como os testes *in vivo*, cujos modelos abrangem diferentes tipos de organismos. O modelo invertebrado *Galleria mellonella* (*G. mellonella*), popularmente conhecido como a larva de cera, vem recebendo cada vez mais destaque como um método alternativo satisfatório para experimentações iniciais *in vivo*. Esse modelo alternativo apresenta vantagens, como: não necessita de aprovação em comitê de ética, requer infraestrutura simples para o funcionamento e demanda um baixo custo de manutenção. Além disso, proporciona respostas rápidas e colabora com os princípios dos 3Rs (redução, refinamento e substituição), propostos por Russell e Burch (1959), considerados importantes na orientação da utilização de animais para fins de pesquisa de forma mais ética, tendo em vista que incentivam o desenvolvimento de abordagens alternativas para testes experimentais, bem como a adoção de técnicas que visem melhorar o bem estar animal, quando o seu uso for indispensável.

G. mellonella possui tempo de reprodução relativamente rápido, ciclo de vida curto e gera alto número de descendentes. Além disso, suporta variações de temperaturas entre 25 e 37°C, condições compatíveis com a do corpo humano. Apresenta, também, um sistema imunológico inato, semelhante aos de hospedeiros

mamíferos, o que favorece a sua utilização para ensaios de infecção (Fuchs et al., 2010; Fleming, et al, 2017).

Existe uma alta variabilidade de parâmetros encontrados nos estudos de tratamento de larvas infectadas por espécies de *Candida* em modelo *G. mellonella*, perceptível a partir de uma busca avançada na base de dados Pubmed utilizando os termos "*Galleria mellonella*" e "Fluconazol" com o operador booleano "AND". Na última consulta, em 15 de julho de 2022, foram encontrados 80 artigos, entre eles 46 descreveram o tratamento de larvas infectadas por *C. albicans*. A infecção nas larvas foi realizada com diferentes padrões de inóculo: 8×10^6 células (Wu et al, 2020), 2×10^4 , 2×10^5 , 2×10^6 (Vertyporokh e Wojda, 2020), 5×10^8 (Chen et al, 2021), 1×10^7 células (Li et al, 2022), 5×10^7 células (Sun et al, 2022). Além disso, foram utilizadas diferentes doses de fluconazol, entre elas: 16mg/kg (Cruz et al, 2018), 14mg/kg (Antoran et al, 2020), 20 e 40 mg/kg (Barreto et al, 2020), 10mg/kg (Li et al, 2022) e 4mg/kg (Sun et al, 2022). Após revisão da literatura, não foi possível identificar metodologias que realizaram testes de modelos de tratamento com aplicação do fluconazol após infecção e reaplicação de dosagens do antifúngico posteriormente. Os estudos de padronização dessa metodologia ainda são incipientes e é necessária a elaboração de protocolos que determinem parâmetros de referência mais precisos.

O objetivo deste estudo consistiu em padronizar um modelo experimental para prospecção de novas drogas anticandida por meio do modelo animal alternativo de larvas de *G. mellonella*. A partir deste protocolo, será possível além de standardizar os estudos que compartilham do mesmo tipo de metodologia, facilitar a reprodução do método por outros pesquisadores e otimizar o tempo investido nos testes para definição das melhores densidades de inóculo e tratamento.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Candidíase

A candidíase oral, uma das infecções fúngicas locais mais comuns, manifesta-se clinicamente de diferentes formas, variando de lesões leucoplásicas e eritroplásicas. Sintomas comuns são relatados entre os indivíduos acometidos pela infecção, principalmente, ardor oral e faríngeo, disfagia, odinofagia, disgeusia (Medeiros et al, 2015; Millsop e Fazel, 2016; Uygun-Can, Kadir; Gumru, 2016).

Quando essa infecção fúngica acomete indivíduos imunocomprometidos, a lesão pode se estender para a traqueia e esôfago, desenvolvendo erosões sintomáticas. Pela presença de numerosas colônias de *Candida* na mucosa gastrointestinal, a disseminação sistêmica pode acontecer dando origem a um quadro de candidemia, condição frequente em pacientes hospitalizados (Maureira et al, 2017; Tso, Reales-Calderon, Pavelka, 2018; Bojang et al, 2021). Em casos graves, a candidemia pode acontecer por difusão pelo sangue, caracterizando fungemia (Patricio et al, 2019).

C. albicans é o quarto principal patógeno causador de septicemia e terceira espécie mais comumente isolada de cateteres médicos. Além disso, é a mais prevalente, tanto no desenvolvimento de infecções locais como sistêmicas, e associa-se a um maior risco de mortalidade em indivíduos susceptíveis (Harriot et al, 2011; Santos et al, 2016). Esse patógeno tem a capacidade de formar biofilme, ou seja, capacidade de coexistir, através de relações de mutualismo, com várias espécies microbianas, na superfície da mucosa humana, bem como de tecidos dentários duros e superfície de materiais restauradores/reabilitadores, o que resulta em aumento da virulência das espécies, redução da eficácia de drogas antifúngicas e do sistema imunológico do hospedeiro (Van Acker , Dijck, Coenye, 2014; Nobile e Johnson, 2015).

A incidência de infecções fúngicas acarretou um cenário crítico na esfera da saúde pública, tendo em vista que, em comparação com os antibacterianos, o arsenal de drogas antifúngicas é consideravelmente menor e efeitos adversos provocados são mais expressivos, além disso, ressalta-se o alto impacto socioeconômico como consequência da resistência das espécies (Scorzoni et al,

2017). Diante disso, existe a atual necessidade de se estudar o desenvolvimento dessas infecções e as possibilidades de tratamentos eficazes e seguros.

2.2 Modelos alternativos ao uso de animais maiores em pesquisa

O “Princípio dos 3Rs,” amplamente aceito pela comunidade científica até os dias atuais, apresenta uma perspectiva pertinente sobre como garantir que os animais experimentais sejam utilizados com base em preceitos éticos e de forma regulamentada (Kirk, 2017). Russel e Burch (1959) estabeleceram o “Princípio dos 3Rs”, do inglês, “reduction”(redução), “refinement”(refinamento) e “replacement”(substituição), indicando três conceitos relevantes para serem implementados no contexto científico, com o intuito de reduzir o sofrimento dos animais utilizados para fins de estudo e pesquisa.

Esse princípio indica a necessidade de redução, ao máximo, do número de animais utilizados para experimentos, destaca a importância do desenvolvimento de técnicas refinadas que causem o mínimo de sofrimento animal, bem como indica ser indispensável à substituição dos animais de pesquisa por modelos alternativos, sempre que possível (Russel e Burch, 1959).

Sabe-se que os testes pré-clínicos para o estudo de infecções microbianas são realizados, principalmente, em modelos murinos, porém existem algumas questões logísticas, além de exigências éticas e orçamentárias que devem ser levadas em consideração pelos pesquisadores, tendo em vista que podem ser consideradas como barreiras significativas para a realização de uma pesquisa (Borman, 2018).

Entre as limitações mais importantes relacionadas ao uso de animais, destacam-se a necessidade de aprovação em comitê de ética, de instalações apropriadas, com tamanho suficiente para o alojamento dos animais, e de técnicos especializados na manutenção dos cuidados e do bem-estar animal. Além disso, levando em consideração o tempo do ciclo reprodutivo dos mamíferos, as pesquisas que utilizam esses modelos animais demandam um maior período para realização (Tsai et al 2016, Pereira et al, 2020).

Nesse contexto, os modelos invertebrados têm sido considerados como uma alternativa viável e promissora ao uso de animais. Observa-se que entre 1990 e 2015 houve um aumento de 909% no número de artigos publicados usando animais

alternativos e análise *In silico* em comparação com 154% de estudos que utilizaram mamíferos no mesmo período ($p < 0,0001$) (Freires et al, 2016). Os animais alternativos mais comumente utilizados para o estudo de infecções fúngicas, são: *Acanthamoeba castellanii*, *Dictyostelium discoideum*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Tenebrio molitor* e *G. mellonella* (De Souza et al, 2015; Koller et al, 2016; Da Silva et al, 2020; Hernando-Ortiz et al, 2021).

2.3 *Galleria mellonella*

G. mellonella, popularmente conhecida como larva da traça-cera, pertencente ao grupo dos insetos Lepidópteros e à família *Pyralidae*. Por comprometer colônias de abelhas, provocando prejuízos aos favos de cera nas colmeias, pode ser considerada como uma praga. *G. mellonella* tem um ciclo de vida que pode variar entre 8 a 12 semanas, dependendo das condições favoráveis de temperatura e umidade. O início do ciclo é marcado pela eclosão dos ovos do inseto, que se transformam em larvas. A fase larval inclui sete instares, seguido, do estado de pupa e, posteriormente, a fase final de mariposa, finalizando o ciclo (Kavanagh e Reeves, 2004).

Devido aos prejuízos causados na apicultura, *G. mellonella* passou a ser alvo de inúmeros estudos e, ao longo dos anos, seu uso passou a ser associado a uma série de vantagens para fins de pesquisa, as quais consolidaram sua utilização como um modelo alternativo de infecção versátil e eficaz para a realização de estudos microbiológicos *In vivo*. Entre as suas principais vantagens, destacam-se o baixo custo de criação, fácil manipulação, tolerância a uma ampla faixa de temperatura, que permite mimetizar as condições fisiológicas de mamíferos, além do curto ciclo de vida, o que garante estudos de alto rendimento com forte suporte estatístico, bem como sem grandes restrições éticas (Cutuli et al, 2019; Firacative et al, 2020).

Esse invertebrado é considerado apropriado para o desenvolvimento de pesquisas com patógenos microbianos por possuir as respostas celulares e humorais consideradas homólogas às do sistema imunológico inato dos seres humanos, isso se deve, principalmente, ao fato de que o seu sistema circulatório é composto por uma hemolinfa que, por sua vez, contém células imunológicas denominadas hemócitos, capazes de realizar fagocitose como um mecanismo de

proteção do organismo, semelhante aos macrófagos, células da imunidade inata humana (Malavia, Gow, Usher, 2020).

O modelo de *G. mellonella* tem sido amplamente utilizado na investigação dos mecanismos envolvidos na virulência de cepas microbianas e na avaliação da eficácia de antimicrobianos, principalmente, em análises de toxicidade de substâncias (Garcia-Carnero et al, 2020; Marcos-Zambrano et al, 2020; Li et al, 2020).

G. mellonella tem sido amplamente utilizada como modelo experimental em estudos *In vivo* que exploram a virulência de espécies fúngicas, no entanto, para que seu uso seja bem-sucedido é indispensável que existam métodos de padronização para os insetos, em um ambiente com condições controladas e com dieta regular, a fim de que se obtenha uma menor variabilidade genotípica e fenotípica das larvas e, dessa forma, insetos de qualidade e experimentos mais seguros (Tsai; Loh; Proft, 2016; Champion, Titball, Bates, 2020; Firacative et al, 2020).

Atualmente, existem fatores que dificultam a obtenção de resultados em pesquisas desenvolvidas com *G. mellonella*, bem como a reprodutibilidade das metodologias que envolvem esse invertebrado, como: a escassez de fornecedores do inseto para fins científicos e a falta de protocolos bem estabelecidos para sua criação e testes (Pereira e Rossi, 2020).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Padronizar um modelo experimental para prospecção de novas drogas anticandida por meio do modelo animal alternativo de larvas de *G. mellonella*.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar densidades de inóculos de cepas de *C. albicans* para diferentes níveis de infecção: não letal, letal e super infecção;
- Determinar dosagens viáveis de antifúngico convencional sistêmico (fluconazol), considerando os diferentes níveis de infecção das larvas;
- Analisar diferentes modelos de tratamento do fluconazol em *G. mellonella* infectadas por *C. albicans*, considerando diferentes momentos de administração do antifúngico após infecção. Padronizar um modelo experimental para prospecção de novas drogas anticandida por meio do modelo animal alternativo de larvas de *G. mellonella*.

4 METODOLOGIA

4.1 Delineamento do estudo

Estudo experimental *In vivo*, com observação direta em laboratório (Marconi; Lakatos, 2011).

4.2 Local de realização da pesquisa

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Análises e Diagnóstico (LAD), situado no Departamento de Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba.

4.3 Cultivo das larvas *G. mellonella*

As larvas foram cultivadas com base no protocolo sugerido por Jorjão *et al* (2018), esquematizado no Quadro 1 e Figura 1, considerando os requisitos necessários para a manutenção das larvas e as etapas de criação.

Quadro 1 - Requisitos de cultivo de *G. mellonella* sugeridos por Jorjão *et al* (2018).

Requisitos de Cultivo	
Pulpas	1. 10 a 30 unidades devem ser colocadas em recipiente de plástico ou vidro, medindo cerca de 30 cm de altura, e com tampa perfurada;
	2. Para dar suporte à postura dos ovos, uma camada de papel filtro deve ser colocada no topo do recipiente, seguida por um pedaço de tecido do tipo voal, sob a tampa perfurada, para impedir a fuga das larvas e permitir a entrada e saída de ar;
	3. Esses recipientes devem ser incubados à temperatura ambiente por 1 a 3 semanas, para deposição dos ovos, a depender da duração do ciclo de vida, quando a maioria das mariposas envelhece ou morre;
	4. Duas vezes por semana, o papel de filtro com os ovos precisa ser substituído por um novo e, transferido para um recipiente de plástico com tampa perfurada.
Ovos	1. Os recipientes contendo os ovos devem ser incubados a 28°C por cerca de 20 dias e, monitorados uma vez por semana, a fim de avaliar o crescimento larval.
Larvas	1. Uma toalha de papel deve ser colocada sob a tampa perfurada para impedir que pequenas lagartas escapem (as larvas recém-nascidas medem em torno de 1 mm). Dentro deste recipiente deve haver ração e pedaços de cera;
	2. Cerca de 20 dias depois, quando as lagartas atingem tamanho suficiente para o manuseio, o recipiente deve ser higienizado e, as teias e casulos removidos;
	3. As lagartas devem ser separadas entre pequenas, médias e grandes, medindo cerca de 1,0, 1,5 e 2,0 cm, respectivamente, e transferidas para recipientes com tampas perfuradas, contendo a ração de escolha;
	4. As lagartas devem ser mantidas a 28°C.

Fonte: Jorjão et al, 2018.

Figura 1 - Processos de criação de *G. mellonella*. Adaptado de Jorjão *et al* (2018).



Fonte: Jorjão et al, 2018.

As larvas foram alimentadas com dieta artificial (Silva et al, 2019), contendo 100g cera de abelha, 193g de fubá, 94g de levedo de cerveja, 80g de farinha de soja, 48g de leite em pó desnatado, 207g de mel e 100ml de água.

4.4 Amostra

A amostra foi composta por larvas de *G. mellonella*, de aparência saudável, com peso médio de 0,25 g, distribuídas em diferentes grupos, de acordo com o nível de infecção e tratamento, cada grupo contendo 10 larvas. As larvas foram mantidas em incubadora B.O.D. (Demanda Bioquímica de Oxigênio), a 30° C, durante o experimento, sendo removidas exclusivamente para a aplicação de inóculo e antifúngico, bem como para os registros da análise.

Para facilitar a injeção do inóculo fúngico e do tratamento com fluconazol, as placas de vidro contendo os grupos de larvas de *G. mellonella* eram deixados sobre uma placa térmica de gelo artificial durante cinco minutos, dessa forma, a redução no nível de movimentação das larvas proporcionada por esta técnica, permitiu um melhor manuseio durante as aplicações com a seringa de Hamilton (10µL; Hamilton Company®, Reno, Nevada, USA).

4.5 Preparo do inóculo de *C. albicans*

Culturas de cepas de *C. albicans*, sendo duas padronizadas (ATCC 90028 e ATCC 10231) e duas isoladas de lesões da cavidade oral (A1 E A2), disponíveis em estoque no LAD, foram ativadas em meio de cultura Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) por 24h. A suspensão microbiana de cada cepa foi preparada em meio de cultura Caldo Sabouraud Dextrose (CSD) e padronizada em espectrofotômetro, a partir das densidades estabelecidas por Vertyporokh e Wojda (2020): 2×10^4 , 2×10^5 , 2×10^6 , 2×10^7 e 2×10^8 células. Após a padronização no espectrofotômetro, as densidades das suspensões foram confirmadas em câmara de Neubauer.

4.6 Preparo de antifúngico

O fluconazol (Fagron®) foi o antifúngico sistêmico selecionado para a realização do tratamento da infecção fúngica. A partir das doses de referência apresentadas no estudo de Barreto *et al*, 2020, foram estabelecidas as dosagens de fluconazol de 20, 40, 50, 70 e 80 mg/kg de peso corporal. Para o preparo das soluções, a quantidade de antifúngico correspondente à dosagem desejada foi diluída em 1 mL de água destilada estéril.

4.7 Análise da viabilidade de *G. mellonella*

Para verificar a viabilidade da *G. mellonella* nas diferentes análises do estudo foram considerando os seguintes parâmetros: 1) grau de melanização e 2) capacidade de movimentação das larvas. As larvas com alto grau de melanização e falta de movimento ao toque foram consideradas mortas (Silva *et al*, 2019).

4.8 Etapas da pesquisa

4.8.1 Estudo piloto

O estudo piloto foi realizado com a *C. albicans* (ATCC 10231), considerando para infecção das larvas os níveis de infecção estabelecidos por Vertyporokh e Wojda (2020): não letal (2×10^4 células), letal (2×10^5 células) e super infecção (2×10^6 células). As larvas foram injetadas com 5 μ l de inóculo na última pró-pata

esquerda, através de uma seringa de Hamilton (25 µl). As larvas foram observadas quanto à sua sobrevivência periodicamente, a cada 24h, por 48 h.

A classificação dos níveis de infecção por *C. albicans* definidos por Vertyporokh e Wojda (2020) baseou-se nos seguintes critérios:

- Infecção não letal: Infecção capaz de matar 5% do número total de larvas que compõem o grupo experimental, após o tempo total de análise.
- Infecção letal: Infecção capaz de matar 50% do número total de larvas que compõem o grupo experimental, após o tempo total de análise.
- Super infecção: Infecção capaz de matar 100% das larvas em 24 h.

Após a análise da sobrevivência, realizou-se o plaqueamento da hemolinfa das larvas infectadas de cada grupo experimental em meio de cultura Caldo Saboureaud Dextrose (CSD), a fim de confirmar ou descartar a infecção fúngica através da identificação visual de unidades formadoras de colônia (UFC). As larvas foram selecionadas de forma aleatória e os testes para detecção da infecção foram realizados em triplicata.

4.8.2 Determinação dos níveis de infecção por *C. albicans*

Para determinar os diferentes níveis de infecção fúngica no modelo *G. mellonella*, as larvas foram separadas em 20 grupos. Foram injetados 5 µl de diferentes densidades de inóculos (2×10^4 , 2×10^5 , 2×10^6 , 2×10^7 e 2×10^8 células) de quatro cepas de *C. albicans* (ATCC 10231, ATCC 90028 e dois isolados clínicos da cavidade oral), na última pró-pata esquerda de cada larva, utilizando uma seringa de Hamilton (25 µl). Os grupos foram observados por 48 horas, considerando os critérios estabelecidos por Vertyporokh e Wojda (2020).

4.8.3 Toxicidade sistêmica aguda do fluconazol

A toxicidade do fluconazol em *G. mellonella* foi analisada considerando as seguintes dosagens: 20, 40, 60, 70 e 80mg/kg de peso corporal. Para manter a

proporção no preparo das soluções de cada dosagem, considerou-se o peso médio das larvas de 0,25g, sendo assim, foram dissolvidos, respectivamente, 0,0012g, 0,0024g, 0,0036g, 0,0042g e 0,0048g de fluconazol em 1 mL de água destilada estéril. A aplicação foi realizada através da seringa de Hamilton, na última pró-pata direita de cada larva, na quantidade de 5 µL. A sobrevivência foi avaliada a cada 24 horas, até o tempo máximo de 72 horas.

Considera-se o tratamento tóxico quando este é capaz de provocar a morte de 50-100% das larvas que compõem o grupo experimental, após o tempo total de análise (Silva *et al*, 2019).

4.8.4 Tratamento da infecção

Para analisar o tratamento da infecção por *C. albicans* utilizando o fluconazol foram considerados os níveis de infecção letal (2×10^7) e a super infecção (2×10^8), determinados no item 4.8.1.

Foram estabelecidos diferentes modelos de tratamento, nos quais foram realizadas associações entre dosagens de fluconazol (20, 40 e 80mg/k) e momentos de administração (1- Dose única aplicada 1 h após infecção; 2- Dose inicial aplicada 1 h após infecção + reaplicação em 8 h) (Quadro 2).

A sobrevivência foi avaliada a cada 24 horas, até o tempo máximo de 72 horas, utilizando os critérios descritos no item 4.7.

Quadro 2 - Grupos de pesquisa considerando a aplicação de diferentes modelos de tratamento com fluconazol em larvas de *G. mellonella* infectadas por *C. albicans*.

Cepa <i>C. albicans</i>	Inóculo	Modelo de tratamento
ATCC 10231	2×10^7	Dose única FCZ20
		Dose única FCZ40
	2×10^8	Dose única FCZ20
		Dose única FCZ40
		Dose única FCZ80
		DI FCZ20 + Reaplicação FCZ20
		DI FCZ40 + Reaplicação FCZ40
ATCC 90028	2×10^7	Dose única FCZ20
		Dose única FCZ40
	2×10^8	Dose única FCZ20
		Dose única FCZ40
		Dose única FCZ80
		DI FCZ20 + Reaplicação FCZ20
		DI FCZ40 + Reaplicação FCZ40
Isolado clínico A1	2×10^7	Dose única FCZ20
		Dose única FCZ40
	2×10^8	Dose única FCZ20
		Dose única FCZ40
		Dose única FCZ80
		DI FCZ20 + Reaplicação FCZ20
		DI FCZ40 + Reaplicação FCZ40
Isolado clínico A2	2×10^7	Dose única FCZ20
		Dose única FCZ40
	2×10^8	Dose única FCZ20
		Dose única FCZ40
		Dose única FCZ80
		DI FCZ80 + Reaplicação FCZ20
		DI FCZ80 + Reaplicação FCZ40

Fonte: Elaborada pelo autor, 2019.

4.8.5 Controle da pesquisa

Com o propósito de identificar ou descartar alterações provenientes da contaminação do meio de cultura ou do trauma da injeção, foram incluídos grupos de larvas para controle do experimento: 1) Grupo Controle 1 (larvas injetadas com 5 μ l do meio de cultura que foi utilizado para o cultivo dos inóculos: Caldo Saboureaud Dextrose - CSD) e 2) Grupo Controle 2 (larvas submetidas à aplicação da agulha sem qualquer solução). Os grupos experimentais para os testes de controle da pesquisa foram realizados em triplicata.

4.9 Análise estatística

Os dados obtidos a partir da análise da viabilidade nas diferentes análises foram plotados em curvas de sobrevivência de Kaplan–Meier e analisados pelo teste log-rank, no GraphPad Prism 5.0. Para obtenção do nível de significância foi considerado como parâmetro o valor de $p < 0,05$. Todos os testes foram realizados em triplicata.

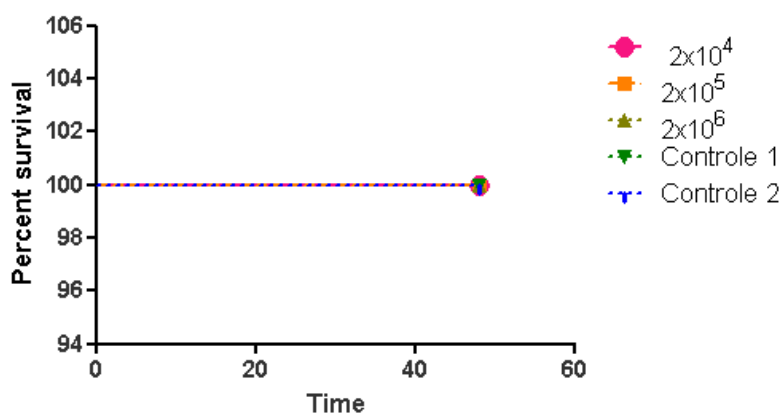
5 RESULTADOS

5.1 Estudo Piloto

As infecções com a *C. albicans* (ATCC 10231), nas densidades de 2×10^4 , 2×10^5 e 2×10^6 células, em larvas de *G. mellonella*, não foram capazes de causar a morte das larvas. Todas as larvas permaneceram viáveis, ativas e sem sinais de melanização, durante o tempo de observação (48h) (Figura 2). Essas densidades de inóculo foram consideradas não letais para *G. mellonella*.

A partir da análise visual das placas contendo hemolinfa das larvas infectadas, foi possível identificar a presença de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) para todas as densidades de inóculo testadas (2×10^4 , 2×10^5 e 2×10^6 células), sendo assim, infere-se que mesmo mantendo-se vivas, as larvas apresentavam a infecção fúngica.

Figura 2 - Curva de sobrevivência de Kaplan-Maier de larvas de *G. mellonella* infectadas por *C. albicans* ATCC 10231 ($p > 0.05$, log-rank test).



5.2 Determinação dos níveis de infecção por *C. albicans*

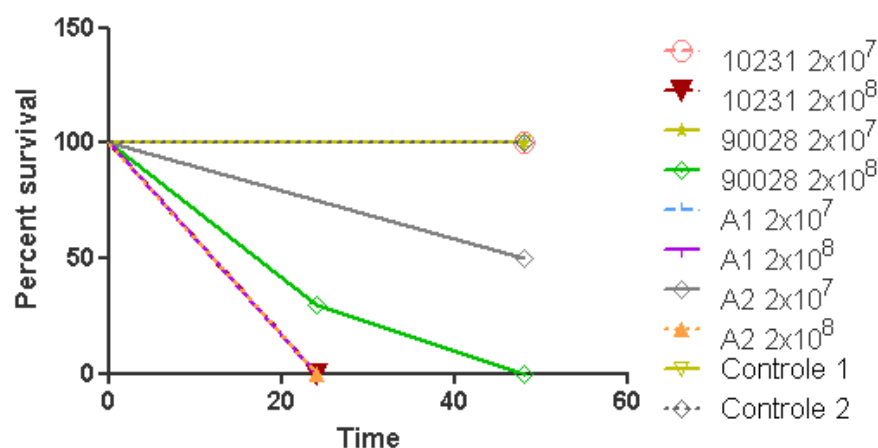
Todas as quatro cepas de *C. albicans*, nas densidades 2×10^4 , 2×10^5 e 2×10^6 células induziram infecções não letais em *G. mellonella*.

Na densidade 2×10^7 células, todas as larvas de *G. mellonella* permaneceram viáveis após a infecção com a *C. albicans* ATCC 10231, *C. albicans* ATCC 90028 e

com o isolado clínico A1, classificadas infecções não letais. O isolado clínico A2 induziu infecção letal (Figura 3).

A infecção com a densidade de 2×10^8 células produziu super infecção em todos os grupos (Figura 3).

Figura 3 - Curva de sobrevivência de Kaplan-Maier de larvas de *G. mellonella* infectadas por *C. albicans* ($p < 0.05$, log-rank test).



5.3 Toxicidade sistêmica aguda do fluconazol

Foi observada baixa toxicidade sistêmica aguda do Fluconazol, cujas doses terapêuticas (20, 40, 60, 70 e 80mg/kg) não afetaram a sobrevivência das larvas até o período de 72h.

5.4 Tratamento de infecção por *C. albicans* com fluconazol

As larvas de *G. mellonella* super infectadas (2×10^8 células) com a *C. albicans* ATCC 10231, *C. albicans* - isolado clínico A1 e *C. albicans* - isolado clínico A2 responderam melhor ao tratamento realizado com a aplicação de dose única de 80mg/kg de fluconazol (figura 4, figura 5, figura 6). As larvas super infectadas pela *C. albicans* ATCC 90028 apresentaram 80% e 100% de taxa de sobrevivência, quando tratadas com dose única de 80mg/kg de fluconazol e com duas doses (FCZ20/20 ou FCZ40/40), respectivamente (figura 7).

As larvas de *G. mellonella* infectadas (2×10^7 células) com as diferentes cepas de *C. albicans* apresentaram 100% de taxa de sobrevivência ao tratamento realizado com a aplicação de uma dose única de 20mg/kg de fluconazol.

Figura 4 - Curva de sobrevivência de Kaplan-Maier de larvas de *G. mellonella* infectadas por *C. albicans* ATCC 10231 e tratadas com fluconazol (FCZ) ($p < 0.05$, log-rank test).

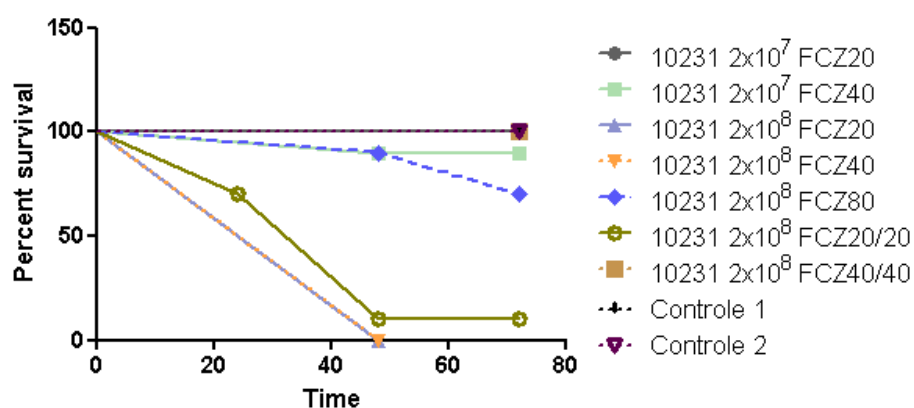


Figura 5 - Curva de sobrevivência de Kaplan-Maier de larvas de *G. mellonella* infectadas pelo isolado clínico A1 e tratadas com fluconazol (FCZ) ($p < 0.05$, log-rank test).

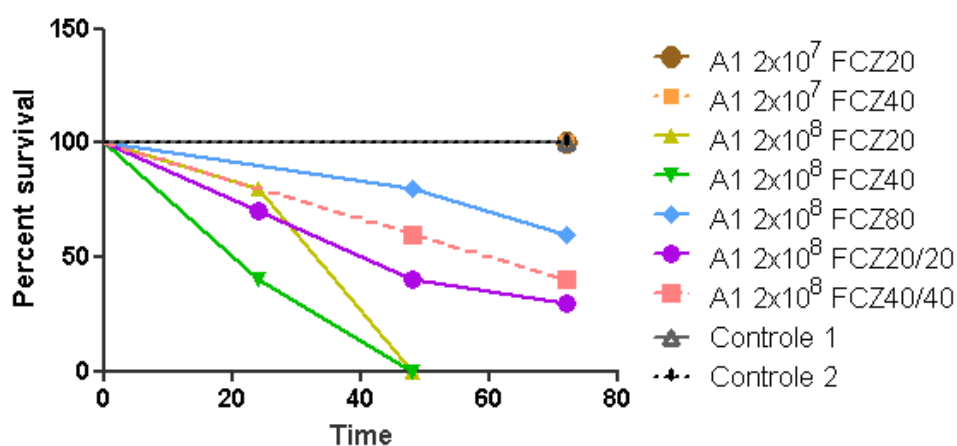


Figura 6 - Curva de sobrevivência de Kaplan-Maier de larvas de *G. mellonella* infectadas pelo isolado clínico A2 e tratadas com fluconazol (FCZ) ($p < 0.05$, log-rank test).

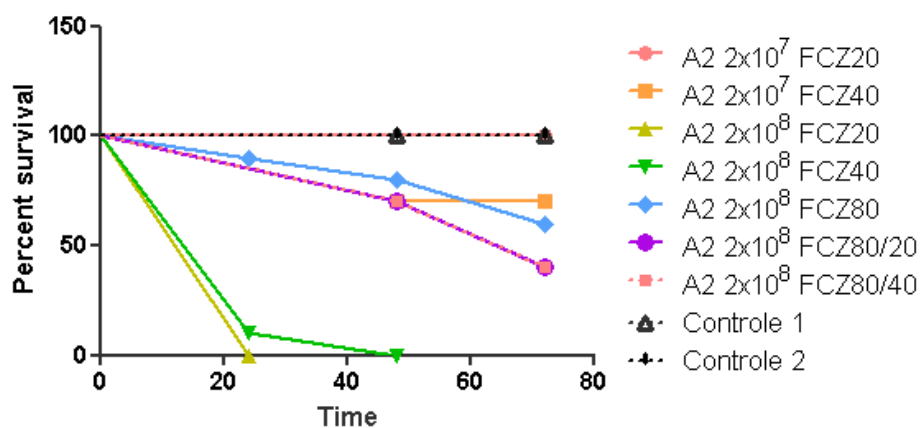
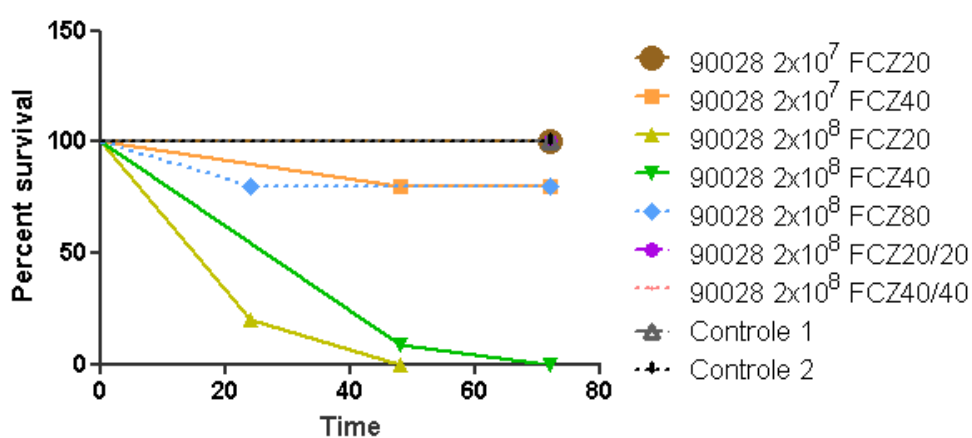


Figura 7 - Curva de sobrevivência de Kaplan-Maier de larvas de *G. mellonella* infectadas por *C. albicans* ATCC 90028 e tratadas com fluconazol (FCZ) ($p < 0.05$, log-rank test).



5.5 Controle da pesquisa

Todos os grupos de larvas de *G. mellonella* testados para o controle da pesquisa citados anteriormente (Grupos controle 1 e 2), apresentaram 100% de viabilidade ao final do tempo total de análise (Figuras 2, 3, 4, 5, 6, e 7).

6 DISCUSSÃO

O número crescente de infecções por patógenos fúngicos invasivos ao longo dos anos representa risco à saúde humana, especialmente, em indivíduos imunocomprometidos, sendo responsáveis por significativas taxas de morbidade e mortalidade (Cornely et al, 2017). Levando em consideração a alta prevalência de infecções fúngicas, principalmente causadas por *Candida* spp, bem como o surgimento de cepas multiresistentes, os estudos para prospecção de novas drogas anticandida tem sido cada vez mais necessários (Li et al, 2020, Barantsevich e Barantsevich, 2022).

Tendo em vista a necessidade de análises *in vivo* para estudos de compostos antifúngicos, bem como as limitações éticas e os custos envolvidos na utilização de murinos e outros roedores, as larvas de *G. mellonella* têm recebido cada vez mais destaque como um modelo experimental alternativo, para testar a virulência de fungos e avaliar a toxicidade e eficácia de antifúngicos (Arvanitis et al, 2013; Andrea, Krogfelt, Jenssen, 2019).

Os níveis de infecção em *G. mellonella* parecem variar de acordo com a cepa de *C. albicans* e as condições de cultivo da larva (dieta). Vertyporokh e Wojda (2020) verificaram que a aplicação de 5 µl de inóculo de *C. albicans* ATCC 10231 nas densidades 2×10^4 , 2×10^5 e 2×10^6 células provocaram infecções não letais, letais e super infecções, respectivamente, em *G. mellonella*. Os autores ressaltaram que a super infecção acarretou a diminuição da motilidade das larvas, atraso no desenvolvimento, anéis melanizados ao redor da área de injeção, e causou a morte de todas as larvas em 24 horas. Resultados diferentes foram identificados neste estudo, onde a injeção de 5 µL de suspensões de quatro cepas de *C. albicans*, incluindo a *C. albicans* ATCC 10231, nas densidades 2×10^4 , 2×10^5 e 2×10^6 células, não foram capazes de afetar a viabilidade das larvas após o tempo total de análise (48h). Não foram identificados sinais de perda de motilidade ou de melanização, sendo classificadas como infecções não letais. Foram necessárias densidades mais altas, 2×10^7 e 2×10^8 células, para produzir infecções letais e super infecções, respectivamente. A diferença de resultados em relação a *C. albicans* ATCC 10231 entre os dois estudos deve ser investigada. Variações quanto ao fornecedor, genótipo, condições laboratoriais de criação e manutenção, bem como o manejo de larvas de *G. mellonella*, podem resultar em discrepâncias nas

taxas de mortalidade após infecção por patógenos. Isso pode explicar resultados conflitantes de viabilidade das larvas diante de infecções por cepas de referência (Tsai et al, 2016).

A melanização apresentada pelas larvas de *G. mellonella* pode ser descrita como uma resposta do sistema imune à infecção, que gera a síntese e deposição de melanina para encapsular patógenos no local da lesão/infecção. Em seguida ocorre a coagulação da hemolinfa e opsonização que, por sua vez, induz a fagocitose. Este processo é análogo à formação de abscessos por infecções em mamíferos (Tsai et al, 2016). A melanização e a perda de motilidade são os principais sinais sugestivos de infecção para *G. mellonella* (Jemel et al, 2020), além da redução da capacidade de formação de casulo (Loh et al, 2013). Neste estudo foi possível observar que as larvas com infecção letal e super infecção, além de menos ativas e mais melanizadas, também exibiram uma considerável redução na formação de casulo, nas primeiras horas após a inoculação da *C. albicans*.

O grupo de larvas infectadas com a *C. albicans* ATCC 90028 (2×10^8 células) apesar de ter exibido o maior número de larvas sobreviventes após 24 horas, foi o grupo que primeiro exibiu melanização e considerável redução dos movimentos, aproximadamente 2 horas após a inoculação fúngica. Esses achados indicam que, apesar do rápido progresso do processo patológico, a resposta imune das larvas foi satisfatória para inibir a infecção.

Os estudos têm apresentado diferentes modelos em *G. mellonella* para analisar o tratamento da infecção por *C. albicans* (Cruz et al 2018; Antoran et al 2020; Li et al 2022; Sun et al, 2022). No estudo de Cruz et al (2018) foi observado 95% de sobrevivência nas larvas infectadas pela *C. albicans* CAN 14 (1×10^5 células), tratadas com 16mg/kg de fluconazol, após 72 horas de observação. No grupo sem tratamento a viabilidade foi de 25%. Sun et al (2022) trataram as larvas infectadas pela *C. albicans* SC5314 (5×10^7 células) com 4mg/kg de fluconazol e registraram 80% de viabilidade após 72 horas de observação. No grupo sem tratamento nenhuma larva sobreviveu. No estudo de Li et al (2022) foi utilizada a dosagem de 10mg/kg de fluconazol para tratar as larvas infectadas pela *C. albicans* SN152 (1×10^7 células). Observaram, após 72 horas, 80% e 30% de viabilidade nos grupos tratado e sem tratamento, respectivamente. Apesar desses estudos terem utilizado inóculos com menores densidades e menores doses de fluconazol, em comparação ao presente estudo, registraram, respectivamente, altas e baixas taxas de sobrevivência

nos grupos tratados e sem tratamento. É provável que as cepas de *C. albicans* desses estudos sejam mais virulentas em *G. mellonella* e mais sensíveis ao fluconazol do que as cepas deste estudo.

No estudo de Antoran et al (2020) foi identificada menor taxa de sobrevivência (20%) no grupo das larvas de *G. mellonella* infectadas pela *C. albicans* CECT 13062 (1×10^6 células) e tratadas com 14mg/kg fluconazol. No grupo sem tratamento foi registrada taxa de sobrevivência de 0%. Apesar de ter sido utilizada uma dosagem maior de fluconazol e um inóculo menor, em relação aos estudos anteriormente mencionados, a viabilidade das larvas tratadas não passou de 20%. É possível que doses maiores de fluconazol sejam necessárias para tratar infecções com essa cepa de referência.

Neste estudo foram estabelecidas inicialmente doses de 20mg/kg e 40mg/kg, de fluconazol (Astvad et al 2017; Barreto et al 2020) para tratar diferentes níveis de infecção por *Candida*, conforme estabelecido por Vertyporokh e Wojda (2020), que incluiu em seu estudo a *C. albicans* ATCC 10231, uma das cepas de referência do presente estudo.

Astvad et al (2017) descreveram a farmacocinética do fluconazol na hemolinfa de *G. mellonella* e identificaram que este antifúngico é distribuído e eliminado pelo organismo do inseto em estado larval, sendo possível utilizar doses que permitam exposição terapêutica semelhante à observada em humanos. Além disso, os autores relataram que a dosagem de 20 mg/kg de fluconazol em larvas de *G. mellonella* resulta em uma exposição próxima à obtida em humanos, considerada uma dose padrão do antifúngico.

Barreto et al (2020) avaliaram o efeito terapêutico de duas dosagens de fluconazol (20 e 40mg/kg) em *G. mellonella* infectadas por *Candida auris*. Apesar de a droga promover uma leve melhora na taxa de sobrevivência das larvas, não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo tratado e o grupo não tratado, após aplicação da menor dosagem (20mg/kg). Por outro lado, houve um aumento significativo no índice de saúde das larvas infectadas quando submetidas ao tratamento com dosagens mais altas de fluconazol (40 mg/kg).

Neste estudo, considerando a super infecção pelas cepas padronizadas de *C. albicans* (ATCC 10231 e ATCC 90028), foi possível observar que as larvas responderam positivamente ao tratamento com dose única de 40mg/kg de fluconazol, com taxa de sobrevida igual ou maior que 80% durante o período de 24

horas. Porém, uma capacidade protetora melhor e mais duradoura foi observada após o tratamento com dosagem única de 80mg/kg de fluconazol, considerando que esse modelo de tratamento garantiu a sobrevivência de 70% da *C. albicans* ATCC 10231, 80% da *C. albicans* ATCC 90028 e 60% dos isolados clínicos da cavidade oral de *C. albicans*, por um período de observação de 72 horas.

A terapia 40mg/kg + 40mg/kg de fluconazol proporcionou melhor resultado nas *G. mellonella* super infectadas pela *C. albicans* 10231 e *C. albicans* - isolado clínico A1, com taxa de sobrevivência de 100% e 40%, respectivamente após 72 horas. Nos grupos super infectados pela *C. albicans* ATCC 90028 e *C. albicans* - isolado clínico A2 não foram identificadas diferenças entre os dois modelos de tratamento com reaplicação de fluconazol (20mg/kg + 20mg/kg e 40mg/kg + 40mg/kg).

As larvas super infectadas pela *C. albicans* - isolado clínico A2 responderam negativamente ao tratamento de dose única de fluconazol, tanto na dosagem de 20 quanto de 40mg/kg, justificando o aumento da dosagem do fluconazol apenas neste grupo. Este resultado distancia-se consideravelmente do que foi observado nas larvas super infectadas com as outras cepas, o que pode indicar que este isolado clínico A2 seja mais virulento e resistente em comparação às outras cepas fúngicas testadas (Cotter, Doyle, Kavanagh, 2000).

Os parâmetros metodológicos explorados neste estudo acerca dos níveis de infecção, toxicidade do antifúngico, bem como dos modelos de tratamento com diferentes dosagens de fluconazol, no modelo experimental *G. mellonella*, podem auxiliar estudos *in vivo* para a prospecção de drogas anticandida. No entanto, considerando as diferentes respostas exibidas pelas larvas infectadas com *C. albicans*, sugere-se que ensaios de sobrevivência para cada cepa fúngica sejam realizados previamente aos testes metodológicos.

Os aspectos celulares e humorais da resposta imune desencadeados por larvas de *G. mellonella* após infecção por diferentes cepas de *C. albicans* considerando, inclusive, as condições de cultivo e manipulação, devem ser esclarecidos por meio de novas pesquisas a fim de que os estudos com este modelo experimental sejam desenvolvidos por meio de métodos cada vez mais padronizados.

7 CONCLUSÕES

Dentre os modelos de tratamento testados, as terapias com aplicação dose única de 20mg/kg e 80mg/kg de fluconazol foram as que proporcionaram melhores taxa de sobrevivência de larvas *G. mellonella* com infecção letal e super infecção por *C. albicans*, respectivamente.

Ressalta-se que, levando em consideração a discrepância de resultados entre as diferentes cepas e formas de cultivo das larvas, torna-se indispensável a realização de estudo piloto de padronização de inóculo e doses de antifúngico de controle previamente à realização de pesquisas com o modelo *G. mellonella*. Parte final do trabalho na qual se apresentam as conclusões ou considerações finais apoiadas no desenvolvimento do assunto. É a recapitulação sintética dos resultados obtidos. Pode apresentar recomendações e sugestões para pesquisas futuras.

REFERÊNCIAS

ANDREA, A.; KROGFELT, K.A.; JENSSEN, H. Methods and Challenges of Using the Greater Wax Moth (*Galleria mellonella*) as a Model Organism in Antimicrobial Compound Discovery. **Microorganisms**. V.7, n.3, p.85, Mar. 2019.

ANTORAN, A.; APARICIO-FERNANDEZ, L.; PELLON, A.; BULDAIN, I.; MARTIN-SOUTO, L.; REMENTERIA, A.; GHANNOUM, M.A.; FUCHS, B.B.; MYLONAKIS, E.; HERNANDO, F.L.; RAMIREZ-GARCIA, A. The monoclonal antibody Ca37, developed against *Candida albicans* alcohol dehydrogenase, inhibits the yeast in vitro and *in vivo*. **Sci Rep**. v.10, n.1, p.9206, Jun. 2020.

ARIAS, L.S.; BUTCHER, M.C.; SHORT, B.; MCKLOUD, E.; DELANEY, C.; KEAN, R.; MONTEIRO, D.R.; WILLIAMS, C.; RAMAGE, G.; BROWN, J.L. Chitosan Ameliorates *Candida auris* Virulence in a *Galleria mellonella* Infection Model. **Antimicrob Agents Chemother**. V.65, n.3, e: e00476-20, Fev. 2021.

ASTVAD, K.M.T.; MELETIADIS, J.; WHALLEY, S.; ARENDRUP, M.C. Fluconazole pharmacokinetics in *Galleria mellonella* larvae and performance evaluation of a bioassay compared to liquid chromatography-tandem mass spectrometry for hemolymph specimens. **Antimicrob. Agents Chemother**. V,61:e00895, 2017.

BARANTSEVICH, N.; BARANTSEVICH, E. Diagnosis and Treatment of Invasive Candidiasis. **Antibiotics (Basel)**. V.11, n.6, p.718, Mai. 2022.

BARRETO, T.L.; ROSSATO, L.; DE FREITAS, A.L.D.; MEIS, J.F.; LOPES, L.B.; COLOMBO, A.L.; ISHIDA, K. Miltefosine as an alternative strategy in the treatment of the emerging fungus *Candida auris*. **Int J Antimicrob Agents**. V.56, n.2, e:106049, Ago. 2020.

BHATTACHARYA, S.; SAE-TIA, S.; FRIES, B.C. Candidiasis and Mechanisms of Antifungal Resistance. **Antibiotics (Basel)**. V.9, n.6, p.312, Jun. 2020.

BOJANG, E.; GHUMAN, H.; KUMWENDA, P.; HALL, R.A. Immune Sensing of *Candida albicans*. **J Fungi (Basel)**. V.7, n.2, p.119, Fev. 2021.

BORMAN, A.M. Of mice and men and larvae: *Galleria mellonella* to model the early host-pathogen interactions after fungal infection. **Virulence**. V.9, n.1, p.:9-12, Jan. 2018.

CLARK-ORDÓÑEZ, I.; CALLEJAS-NEGRETE, O.A.; ARÉCHIGA-CARVAJAL, E.T.; MOURIÑO-PÉREZ, R.R. *Candida* species diversity and antifungal susceptibility patterns in oral samples of HIV/AIDS patients in Baja California, Mexico. **Med Mycol**. V.55, n.3, p.285-94, Abr. 2017.

CHAMPION ,O.L.; TITBALL, R.W.; BATES, S. Standardization of *G. mellonella* Larvae to Provide Reliable and Reproducible Results in the Study of Fungal Pathogens. **J Fungi (Basel)**. V.4, n.3, p.108, Set. 2018.

CHEN, X.; WU, J.; SUN, L.; NIE, J.; SU, S.; SUN, S. Antifungal Effects and Potential Mechanisms of Benserazide Hydrochloride Alone and in Combination with Fluconazole Against *Candida albicans*. **Drug Des Devel Ther.** V.16, n.15, p.4701-11, Nov. 2021.

CHIURLO, M.; MASTRANGELO, A.; RIPA, M.; SCARPELLINI, P. Invasive fungal infections in patients with COVID-19: a review on pathogenesis, epidemiology, clinical features, treatment, and outcomes. **New Microbiol.** V.44, n.2, p.71-83, Abr. 2021.

CORNELY, O.A.; LASS-FLÖRL, C.; LAGROU, K.; ARSIC-ARSENIJEVIC, V.; HOENIGL, M. Improving outcome of fungal diseases - Guiding experts and patients towards excellence. **Mycoses.** V.60, n.7, p.420-5, Jul. 2017.

COTTER, G.; DOYLE, S.; KAVANAGH, K. Development of an insect model for the *in vivo* pathogenicity testing of yeasts. **FEMS Immunol Med Microbiol.** V.27, n.2, p.163-9, Fev. 2000.

CRUZ, L.I.B.; LOPES, L.F.F.; DE CAMARGO RIBEIRO, F.; DE SÁ, N.P.; LINO, C.I.; THARMALINGAM, N.; DE OLIVEIRA, R.B.; ROSA, C.A.; MYLONAKIS, E.; FUCHS, B.B.; JOHANN, S. Anti-*Candida albicans* Activity of Thiazolylhydrazone Derivatives in Invertebrate and Murine Models. **J Fungi (Basel).** v.4, n.4, p.134, Dez. 2018.

CUTULI, M.A.; PETRONIO, G.; VERGALITO, F.; MAGNIFICO, I.; PIETRANGELO, L.; VENDITTI, N.; DI MARCO, R. *Galleria mellonella* as a consolidated *in vivo* model hosts: New developments in antibacterial strategies and novel drug testing. **Virulence.** V.10, n.1, p.527-41, Dez. 2019.

DA SILVA, A.; NOBRE, H.J.R.; SAMPAIO, L.; NASCIMENTO, B.D.; DA SILVA, C.; DE ANDRADE NETO, J.B.; MANRESA, Á.; PINAZO, A.; CAVALCANTI, B.; DE MORAES, M.O.; RUIZ-TRILLO, I.; ANTÓ, M.; MORÁN, C.; PÉREZ, L. Antifungal and antiprotozoal green amino acid-based rhamnolipids: Mode of action, antibiofilm efficiency and selective activity against resistant *Candida* spp. strains and *Acanthamoeba castellanii*. **Colloids Surf B Biointerfaces.** V.193, e:111148, Set. 2020.

DELALOYE, J.; CALANDRA, T. Invasive candidiasis as a cause of sepsis in the critically ill patient. **Virulence.** V.5, n.1, p.161-9, Jan. 2014.

DE SOUZA, P.C.; MOREY, A.T.; CASTANHEIRA, G.M.; BOCATE, K.P.; PANAGIO, L.A.; ITO, F.A.; FURLANETO, M.C.; YAMADA-OGATTA, S.F.; COSTA, I.N.; MORA-MONTES, H.M.; ALMEIDA, R.S. *Tenebrio molitor* (*Coleoptera: Tenebrionidae*) as an alternative host to study fungal infections. **J Microbiol Methods.** V.118, p.182-6, Nov. 2015.

DI COSOLA, M.; CAZZOLLA, A.P.; CHARITOS, I.A.; BALLINI, A.; INCHINGOLO, F.; SANTACROCE, L. *Candida albicans* and Oral Carcinogenesis. A Brief Review. **J Fungi (Basel).** v.7, n.6, p.476, Jun. 2021.

DOS SANTOS, J.D.; FUGISAKI, L.R.O.; MEDINA, R.P.; SCORZONI, L.; ALVES, M.S.; DE BARROS, P.P.; RIBEIRO, F.C.; FUCHS, B.B.; MYLONAKIS, E.; SILVA, D.H.S.; JUNQUEIRA, J.C. *Streptococcus mutans* Secreted Products Inhibit *Candida albicans* Induced Oral Candidiasis. **Front Microbiol.** v.11, p.1605, Jul. 2020.

FERNANDES, K.E.; WEEKS, K.; CARTER, D.A. Lactoferrin Is Broadly Active against Yeasts and Highly Synergistic with Amphotericin B. **Antimicrob Agents Chemother.** V.64, n.5, e02284-19, Abr. 2020.

FLEMING, I.D.; KREZALEK, M.A.; BELOGORTSEVA, N.; ZABORIN, A.; DEFAZIO, J.; CHANDRASEKAR, L.; ACTIS, L.A.; ZABORINA, O.; ALVERDY, J.C. Modeling *Acinetobacter baumannii* wound infections: The critical role of iron. **J Trauma Acute Care Surg.** V.82, n.3, p.557-65, Mar. 2017.

FREIRES, I.A.; SARDI, J.C.; DE CASTRO, R.D.; ROSALEN, P.L. Alternative Animal and Non-Animal Models for Drug Discovery and Development: Bonus or Burden? **Pharm Res.** V.34, n.4, p.681-86, Abr. 2017.

FUCHS, B.B.; O'BRIEN, E.; KHOURY, J.B.; MYLONAKIS, E. Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. **Virulence.** V.1, n.6, p.475-82, Dez. 2010.

HARRIOTT, M.M.; NOVERR, M.C. Importance of Candida-bacterial polymicrobial biofilms in disease. **Trends Microbiol.** V.19, n.11, p.557-63, Nov. 2011.

HERNANDO-ORTIZ, A.; MATEO, E.; PEREZ-RODRIGUEZ, A.; DE GROOT, P.W.J.; QUINDÓS, G.; ERASO, E. Virulence of *Candida auris* from different clinical origins in *Caenorhabditis elegans* and *Galleria mellonella* host models. **Virulence.** V.12, n.1, p.1063-75, Dez. 2021.

JEMEL, S.; GUILLOT, J.; KALLEL, K.; BOTTEREL, F.; DANNAOUI, E. *Galleria mellonella* for the Evaluation of Antifungal Efficacy against Medically Important Fungi, a Narrative Review. **Microorganisms.** v.8, n.3, p.390, Mar. 2020.

JORJÃO, A.L.; OLIVEIRA, L.D.; SCORZONI, L.; FIGUEIREDO-GODOI, L.M.A.; CRISTINA, A.; PRATA, M.; JORGE, A.O.C.; JUNQUEIRA, J.C. From moths to caterpillars: Ideal conditions for *Galleria mellonella* rearing for in vivo microbiological studies. **Virulence.** V.9, n.1, p.383-89, Jan. 2018.

KAVANAGH, K.; REEVES, E.P. Explorando o potencial de insetos para testes de patogenicidade *in vivo* de patógenos microbianos. **FEMS Microbiol. Rev.** V.28, p.101-12, 2004.

KOLLER, B.; SCHRAMM, C.; SIEBERT, S.; TRIEBEL, J.; DELAND, E.; PFEFFERKORN, A.M.; RICKERTS, V.; THEWES, S. *Dictyostelium discoideum* as a Novel Host System to Study the Interaction between Phagocytes and Yeasts. **Front Microbiol.** V.7, e:1665, Out. 2016.

KOTEY, F.C.; DAYIE, N.T.; TETTEH-UARCOO, P.B.; DONKOR, E.S. Candida Bloodstream Infections: Changes in Epidemiology and Increase in Drug Resistance. **Infect Dis (Auckl)**. V.14, e:11786337211026927, Jun. 2021.

LAKOH, S.; OREFUWA, E.; KAMARA, M.N.; JIBA, D.F.; KAMARA, J.B.; KPAKA, S.; DENNING, D.W. The burden of serious fungal infections in Sierra Leone: a national estimate. **Ther Adv Infect Dis**. V.30, n.8, e:20499361211027996, Jun. 2021.

LEWIS, M.A.O.; WILLIAMS, D.W. Diagnosis and management of oral candidosis. **Br Dent J**. v.223, n.9, p.675-81, Nov. 2017.

LI, Y.; YANG, J.; LI, X.; SU, S.; CHEN, X.; SUN, S.; LI, Y. The effect of Ginkgolide B combined with fluconazole against drug-resistant *Candida albicans* based on common resistance mechanisms. **Int J Antimicrob Agents**. V.56, n.2, p.106030, Ago. 2020.

LI, L.; LU, H.; ZHANG, X.; WHITEWAY, M.; WU, H.; TAN, S.; ZANG, J.; TIAN, S.; ZHEN, C.; MENG, X.; LI, W.; ZHANG, D.; ZHANG, M.; JIANG, Y. Baicalein Acts against *Candida albicans* by Targeting Eno1 and Inhibiting Glycolysis. **Microbiol Spectr**. p.e0208522, Jul. 2022.

LOH, J.M.; ADENWALLA, N.; WILES, S.; PROFT, T. *Galleria mellonella* larvae as an infection model for group A streptococcus. **Virulence**. V.4, n.5, p.419-28, Jul. 2013.

LU, M.; YAN, H.; YU, C.; YUAN, L.; SUN, S. Proton pump inhibitors act synergistically with fluconazole against resistant *Candida albicans*. **Sci Rep**. v.10, n.1, p.498, Jan. 2020.

ŁUKASZUK, C.; KRAJEWSKA-KUŁAK, E.; KUŁAK, W. Retrospective observation of drug susceptibility of *Candida* strains in the years 1999, 2004, and 2015. **PeerJ**. V. 5, p.e3038, Fev. 2017.

MACARTHUR CLARK, J. The 3Rs in research: a contemporary approach to replacement, reduction and refinement. **Br J Nutr**. V.120, n.s1, p.S1-S7, Ago. 2018.

MALAVIA, D.; GOW, N.A.R.; USHER, J. Advances in Molecular Tools and *In Vivo* Models for the Study of Human Fungal Pathogenesis. **Microorganisms**. v.8, n.6, p.803, Mai. 2020.

MARCONI, M.A.; LAKATOS, E.M. **Metodologia do trabalho científico: procedimentos básicos, pesquisa bibliográfica, projeto e relatório, publicações e trabalhos científicos**. 7. ed. 6.reimpr. São Paulo: Atlas, 2011.

MARCOS-ZAMBRANO, L.J.; BORDALLO-CARDONA, M.Á.; BORGHI, E.; FALLENI, M.; TOSI, D.; MUÑOZ, P.; ESCRIBANO, P.; GUINEA, J. *Candida* isolates causing candidemia show different degrees of virulence in *Galleria mellonella*. **Med Mycol**. V.58, n.1, p.83-92, Jan. 2020.

MARTINS DE ANDRADE, V.; BARDAJÍ, E.; HERAS, M.; RAMU, V.G.; JUNQUEIRA, J.C.; DIANE DOS SANTOS, J.; CASTANHO, M.A.R.B.; CONCEIÇÃO, K. Antifungal

and anti-biofilm activity of designed derivatives from kyotorphin. **Fungal Biol.** v.124, n.5, p.316-26, Mai. 2020.

MAURER, E.; HÖRTNAGL, C.; LACKNER, M.; GRÄSSLE, D.; NASCHBERGER, V.; MOSER, P.; SEGAL, E.; SEMIS, M.; LASS-FLÖRL, C.; BINDER, U. *Galleria mellonella* as a model system to study virulence potential of mucormycetes and evaluation of antifungal treatment. **Med Mycol.** V.57, n.3, p.351-62, Abr. 2019.

MAUREIRA, N; VIERA, P.; FERNANDEZ, A.; URREJOLA, M.; BRAVO, C.; MARDONES, F.; VINES, E.D.; HAIDAR, Z.S. Susceptibilidad de Cepas de *Candida* Oral a Extracto Etanólico del Propóleo Chileno de Olmué. **Int J Odontostomast.** V.11, n.3, p.295-303, 2017.

MEDEIROS, F.C.D.; DE ARAÚJO-SILVA, T.F.; ALVES FERREIRA, K.; BEZERRA DE OLIVEIRA-MOURA, J.M.; PINHEIRO CAVALCANTI-LIMA, I.; GUERRA-SEABRA, E.J. Use of dental prostheses and their relationship with oral lesions. **Rev Salud Publica (Bogota).** V.17, n.4, p.603-13, Jul. 2015.

MILLSOP, J.W.; FAZEL, N. Oral candidiasis. **Clin Dermatol.** V.34, n.4, p.487-94, Ago. 2016.

NIKOU, S.A.; KICHIK, N.; BROWN, R.; PONDE, N.O.; HO, J.; NAGLIK, J.R.; RICHARDSON, J.P. *Candida albicans* Interactions with Mucosal Surfaces during Health and Disease. **Pathogens.** V.8, n.2, p.53, Abr. 2019

NOBILE, C.J.; JOHNSON, A.D. *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. **Annu Rev Microbiol.** V.69, p.71-92, 2015.

PATRICIO, P.; PAIVA, J.A.; BORREGO, L.M. Immune Response in Bacterial and *Candida* Sepsis. **Eur J Microbiol Immunol (Bp).** V.9, n.4, p.105-13, Out. 2019.

PEREIRA, T.C.; DE BARROS, P.P.; FUGISAKI, L.R.O.; ROSSONI, R.D.; RIBEIRO, F.C.; DE MENEZES, R.T.; JUNQUEIRA, J.C.; SCORZONI, L. Recent Advances in the Use of *Galleria mellonella* Model to Study Immune Responses against Human Pathogens. **J Fungi (Basel).** V.4, n.4, p.128, Nov. 2018.

PEREIRA, M.F.; ROSSI, C.C.; DA SILVA, G.C.; ROSA, J.N.; BAZZOLLI, D.M.S. *Galleria mellonella* as an infection model: an in-depth look at why it works and practical considerations for successful application. **Pathog Dis.** V.78, n.8, e.ftaa056, Nov. 2020.

PEREIRA, M.F.; ROSSI, C.C. Overview of rearing and testing conditions and a guide for optimizing *Galleria mellonella* breeding and use in the laboratory for scientific purposes. **APMIS.** V.128, n.12, p.607-20, Dez. 2020.

RASOULPOOR, S.; SHOHAIMI, S.; SALARI, N.; VAISI-RAYGANI, A.; RASOULPOOR, S.; SHABANI, S.; JALALI, R.; MOHAMMADI, M. *Candida albicans* skin infection in patients with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. **J Diabetes Metab Disord.** V.20, n.1, p.665-72, Abr. 2021.

ROMERA, D.; AGUILERA-CORREA, J.J.; GARCÍA-COCA, M.; MAHILLO-FERNÁNDEZ, I.; VIÑUELA-SANDOVAL, L.; GARCÍA-RODRÍGUEZ, J.; ESTEBAN, J. The *Galleria mellonella* infection model as a system to investigate the virulence of *Candida auris* strains. **Pathog Dis.** V.78,n.9, e:ftaa067, Nov. 2020.

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

SANTOS, A.L.S.; CARVALHO, I.S.; PRATA, J.M.; MARTINS, M.B.; SOUZA, L.O.P.; GALDINO, A.C.M.; BRAGA-SILVA, L.A.; BRANQUINHA, M.H.; RODRIGUES, S.M.; SOUSA, L.V.N.F. 2016. *Candida albicans* Involvement in Denture-Related Stomatitis: A Serious and Real Clinical Concern. **J Infect Dis Diagn.** V.1, n.1, 2016.

SCORZONI, L.; DE PAULA E SILVA, A.C.; MARCOS, C.M.; ASSATO, P.A.; DE MELO, W.C.; DE OLIVEIRA, H.C.; COSTA-ORLANDI, C.B.; MENDES-GIANNINI, M.J.; FUSCO-ALMEIDA, A.M. Antifungal Therapy: New Advances in the Understanding and Treatment of Mycosis. **Front Microbiol.** V. 23, n.8, p.36, Jan. 2017.

SHEEHAN, G.; TULLY, L.; KAVANAGH, K.A. *Candida albicans* increases the pathogenicity of *Staphylococcus aureus* during polymicrobial infection of *Galleria mellonella* larvae. **Microbiology (Reading).** V.166, n.4, p.375-85, Abr. 2020.

SILVA, D.R.; ROSALEN, P.L.; FREIRES, I.A.; SARDI, J.C.O.; LIMA, R.F.; LAZARINI, J.G.; COSTA, T.K.V.L.D.; PEREIRA, J.V.; GODOY, G.P.; COSTA, E.M.M.B. *Anadenanthera Colubrina* vell Brenan: anti-*Candida* and antibiofilm activities, toxicity and therapeutical action. **Braz Oral Res.** V. 33, e023, 2019.

SUN, C.Q.; PENG, J.; YANG, L.B.; JIAO, Z.L.; ZHOU, L.X.; TAO, R.Y.; ZHU, L.J.; TIAN, Z.Q.; HUANG, M.J.; GUO, G. A Cecropin-4 Derived Peptide C18 Inhibits *Candida albicans* by Disturbing Mitochondrial Function. **Front Microbiol.** V.19, n.13, e:872322, Abr. 2022.

TSAI, C.J.; LOH, J.M.; PROFT, T. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. **Virulence.** V.7, n.3, p.214-29, Abr. 2016.

TSO, G.H.W.; REALES-CALDERON, J.A.; PAVELKA, N. The Elusive Anti-*Candida* Vaccine: Lessons From the Past and Opportunities for the Future. **Front Immunol.** V.27, n.9, p. 897, Abr. 2018.

UYGUN-CAN, B.; KADIR, T.; GUMRU, B. Effect of oral antiseptic agents on phospholipase and proteinase enzymes of *Candida albicans*. **Arch Oral Biol.** V.62, p.20-27, Fev. 2016.

VAEZI, A.; FAKHIM, H.; KHODAVAISY, S.; ALIZADEH, A.; NAZERI, M.; SOLEIMANI, A.; BOEKHOUT, T.; BADALI, H. Epidemiological and mycological characteristics of candidemia in Iran: A systematic review and meta-analysis. **J Mycol Med.** V.27, n.2, p.146-52, Jun. 2017.

VALLABHANENI, S.; MODY, R.K.; WALKER, T.; CHILLER, T. The Global Burden of Fungal Diseases. **Infect Dis Clin North Am.** V.30, n.1, p.1-11, Mar. 2016.

VAN ACKER, H.; VAN DIJCK, P.; COENYE, T. Molecular mechanisms of antimicrobial tolerance and resistance in bacterial and fungal biofilms. **Trends Microbiol.** V.22, n.6, p.326-33. Jun. 2014.

VAN DEN DRIESSCHE, F.; VANHOUTTE, B.; BRACKMAN, G.; CRABBÉ, A.; RIGOLE, P.; VERCRUYSSSE, J.; VERSTRAETE, G.; CAPPOEN, D.; VERVAET, C.; COS, P.; COENYE, T. Evaluation of combination therapy for Burkholderia cenocepacia lung infection in different *in vitro* and *in vivo* models. **PLoS One.** V.12, n.3, e0172723, Mar. 2017.

VARGAS, G.; HONORATO, L.; GUIMARÃES, A.J.; RODRIGUES, M.L.; REIS, F.C.G.; VALE, A.M.; RAY, A.; NOSANCHUK, J.D.; NIMRICHTER, L. Protective effect of fungal extracellular vesicles against murine candidiasis. **Cell Microbiol.** v.22, n.10, e13238, Out. 2020.

VERA-GONZÁLEZ, N.; BAILEY-HYTHOLT, C.M.; LANGLOIS, L.; DE CAMARGO RIBEIRO, F.; DE SOUZA SANTOS, E.L.; JUNQUEIRA, J.C.; SHUKLA A. Anidulafungin liposome nanoparticles exhibit antifungal activity against planktonic and biofilm *Candida albicans*. **J Biomed Mater Res A.** v.108, n.11, p. 2263-76, Nov. 2020.

VERTYPOROKH, L.; WOJDA, I. Immune response of *Galleria mellonella* after injection with non-lethal and lethal dosages of *Candida albicans*. **J Invertebr Pathol.** v.170, e107327, Fev. 2020.

WIJESINGHE, G.K.; MAIA, F.C.; DE OLIVEIRA, T.R.; DE FEIRIA, S.N.B.; JOIA, F.; BARBOSA, J.P.; BONI, G.C.; SARDI, J.C.O.; ROSALEN, P.L.; HÖFLING, J.F. Effect of *Cinnamomum verum* leaf essential oil on virulence factors of *Candida* species and determination of the *in-vivo* toxicity with *Galleria mellonella* model. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v.25, n.115, e200349, Set. 2020.

WU, J.; WU, D.; ZHAO, Y.; SI, Y.; MEI, L.; SHAO, J.; WANG, T.; YAN, G.; WANG, C. Sodium New Houttuynonate Inhibits *Candida albicans* Biofilm Formation by Inhibiting the Ras1-cAMP-Efg1 Pathway Revealed by RNA-seq. **Front Microbiol.** v.25, n.11, p.2075, Ago. 2020.