



UEPB

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA
CURSO DE BACHARELADO EM ODONTOLOGIA**

VICTOR MENDES DE VASCONCELOS

MANUAL SOBRE CRIAÇÃO E EXPERIMENTAÇÃO COM *Galleria mellonella*

**CAMPINA GRANDE - PB
2020**

VICTOR MENDES DE VASCONCELOS

MANUAL SOBRE CRIAÇÃO E EXPERIMENTAÇÃO COM *Galleria mellonella*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Odontologia.

Área de concentração: Microbiologia.

Orientadora: Profa. Dra Edja Maria Melo de Brito Costa

**Campina Grande
2020**

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.

V331m Vasconcelos, Victor Mendes de.
Manual sobre criação e experimentação com *Galleria mellonella* [manuscrito] / Victor Mendes de Vasconcelos. - 2020.
48 p. : il. colorido.
Digitado.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2020.
"Orientação : Profa. Dra. Edja Maria Melo de Brito Costa, Coordenação do Curso de Odontologia - CCBS."
1. Modelos animais. 2. Bactérias. 3. Virulência. 4. Toxicidade. I. Título

21. ed. CDD 617.6

VICTOR MENDES DE VASCONCELOS

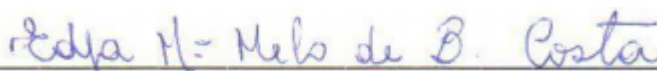
MANUAL SOBRE CRIAÇÃO E EXPERIMENTAÇÃO COM *Galleria mellonella*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Odontologia.

Área de concentração: Microbiologia

Aprovado em: 02/12/2020

BANCA EXAMINADORA



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



Profa. Dra. Jozinete Vieira Pereira
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Me. Priscilla Guimarães Silva
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

AGRADECIMENTOS

À professora Edja Maria Melo de Brito Costa, minha orientadora, por toda sua dedicação, desprendimento em ajudar e amizade sincera. Obrigado pela oportunidade, por possibilitar que este trabalho acontecesse e por todo apoio durante esses anos de Iniciação Científica. Você é um exemplo para mim.

A toda equipe do laboratório, em especial a Carolina Medeiros, Priscilla Guimarães, Rennaly Lima e Paolla Raimundo, por toda ajuda e disponibilidade ofertada, vocês tornaram o trabalho e a pesquisa mais leve, obrigado por tudo.

Aos meus pais, Givanilda Alves e Patrício Cavalcanti, e minhas irmãs, Patrícia Vasconcelos e Gabriela Vasconcelos, por todo o apoio, dedicação e afeto. Sem vocês nada disso seria possível. Vocês são os pilares principais da minha trajetória.

Aos professores do Departamento de Odontologia da UEPB, que contribuíram ao longo desses cinco anos, por meio das disciplinas, debates, conversas e conselhos para o desenvolvimento da minha vida acadêmica e profissional.

A Professora Jozinete Vieira Pereira e a Priscilla Guimarães Silva, por terem aceitado fazer parte da minha banca, fiquei muito honrado, obrigado por tudo.

Aos funcionários da UEPB, por toda sua dedicação em fazer a universidade funcionar, vocês são partes essenciais na vida de cada aluno.

Aos meus amigos e companheiros de apartamento, Paulo Rodrigues e Tiago Marques, por tantas aventuras e bons momentos vividos nesses cinco anos. Vocês se tornaram verdadeiros irmãos.

A minha dupla, Antares Silveira, obrigado por todo companheirismo e cumplicidade, sem você tudo teria sido mais difícil.

Aos colegas de classe, verdadeiros amigos, pelos momentos de amizade e apoio, por tantos bons momentos vividos. Vocês se tornaram parte da minha vida.

RESUMO

Os modelos de estudo com animais são bastante utilizados pela ciência em testes pré-clínicos, para analisar a eficácia e segurança de um determinado produto ou fármaco, antes de serem testados em seres humanos. Infecções fúngicas experimentais, ensaios com substâncias de interesse médico, criação de vacinas e de novas terapias, por exemplo, são comumente realizados em pequenos mamíferos como roedores ou coelhos. No entanto, o uso de mamíferos apresenta desvantagens, uma vez que exige uma infraestrutura mais complexa, custos mais elevados, períodos de experimentação maiores e questões éticas. Diante disso, uma opção eticamente viável, em substituição ao uso dos modelos animais vertebrados, consiste no uso de insetos, como a *Galleria mellonella*, para diferentes testes pré-clínicos, como, por exemplo, os modelos de infecção experimental. O objetivo deste trabalho é apresentar um manual contendo aspectos relacionados à caracterização, viabilização, organização, manutenção e protocolos de cultivo e experimentação com *Galleria mellonella*. Foram consultadas as bases de dados eletrônicas PubMed/MEDLINE, Lilacs e Scielo, usando o descritor *Galleria mellonella*, sem restrição de data e idioma. Foram identificados vários trabalhos que utilizaram o modelo de *Galleria mellonella*, com destaque para os estudos com análises antifúngicas, antibacterianas, teste de toxicidade sistêmica e/ou efetividade de medicamentos. O modelo de *Galleria mellonella*, apresenta-se como uma alternativa viável, de custo relativamente baixo e de fácil implementação.

Palavras-chave: Modelos Animais. Bactérias. Virulência. Testes de Toxicidade.

ABSTRACT

Animal study models are widely used by science in preclinical tests, to analyze the effectiveness and safety of a certain product or drug, before being tested in humans. Experimental fungal infections, tests with substances of medical interest, creation of vaccines and new therapies, for example, are commonly performed on small mammals such as rodents or rabbits. However, the use of mammals has disadvantages, since it requires a more complex infrastructure, higher costs, longer periods of experimentation and ethical issues. Therefore, an ethically viable option, replacing the use of vertebrate animal models, is the use of insects, such as *Galleria mellonella*, for different pre-clinical tests, such as, for example, experimental infection models. The objective of this work is to present a manual containing aspects related to the characterization, feasibility, organization, maintenance and protocols for cultivation and experimentation with *Galleria mellonella*. The electronic databases PubMed / MEDLINE, Lilacs and Scielo were consulted, using the descriptor *Galleria mellonella*, without restriction of date and language. Several works were identified that used the *Galleria mellonella* model, with emphasis on studies with antifungal, antibacterial analyzes, systemic toxicity test and / or drug effectiveness. The *Galleria mellonella* model presents itself as a viable alternative, with relatively low cost and easy implementation. **Keywords:** Models, Animal. Bacteria. Virulence. Toxicity Tests.

Sumário

1. Considerações iniciais.....	8
2. <i>Galleria mellonella</i>	10
3. Cultivo da <i>Galleria mellonella</i>	13
Protocolo 1 (JORJÃO <i>et al</i> , 2018):	14
Protocolo 2 (RAMARAO, NIELSEN-LEROUX, LERECLUS, 2012):	15
Protocolo 3.....	17
3.1 Dietas e rações	18
4. Modelos experimentais com a <i>Galleria mellonella</i>	22
4.1 Análises de atividade antifúngica.....	22
4.1.1 Protocolo para avaliação da atividade de agentes antifúngicos em infecção por <i>Candida albicans</i> , descrito por Li <i>et al</i> , (2013):	23
a) Preparação do inóculo:	23
b) Viabilidade larval:.....	23
4.1.2 Protocolo para avaliação da atividade de agentes antifúngicos em infecção por <i>Candida albicans</i> , descrito por Fallon, Kelly, Kavanagh, (2012):	24
a) Preparação do inóculo:	24
b) Viabilidade larval:.....	24
c) Determinação da densidade de hemócitos da <i>Galleria mellonella</i>	25
d) Determinação da carga fúngica de <i>Galleria mellonella</i> inoculada com <i>Candida albicans</i>	25
e) Avaliação da atividade <i>in vivo</i> de caspofungina em <i>Galleria mellonella</i> infectada com <i>Candida albicans</i>	25
f) Extração de RNA da <i>Galleria mellonella</i> e análise da expressão gênica antimicrobiana	26
g) Análise de alterações proteômicas em larvas infectadas por meio de Eletroforese 2D em Gel e LC/MS	28
h) Extração e análise de peptídeos das larvas de <i>Galleria mellonella</i>	30
5. Análise de toxicidade.....	32
6. Análise histológica	33
6.1 Protocolo apresentado por Scorzoni (2013).....	33
6.2 Protocolo apresentado por Vilela (2015).....	33
7. Análises com bactérias.....	34
7.1 Patogenicidade de bactérias periodontais.....	34
7.2 Extração e análises com a hemolinfa da <i>Galeria mellonella</i>	36
a) Extração da hemolinfa	36
b) Determinação da viabilidade do hemócito.....	37
c) Processamento de hemócitos extraídos para microscopia de imunofluorescência	38

d) Quantificação de UFC bacteriana.....	39
7.3 Modelo de infecção por <i>Porphyromonas gingivalis</i> do tipo selvagem e mutante cas 3.....	40
Protocolo apresentado por Solbiati <i>et al</i> , (2020) para avaliar a virulência da <i>Porphyromonas gingivalis</i>	40
7.4 Interação entre <i>Candida albicans</i> e <i>Streptococcus mutans</i> em modelo experimental de <i>Galleria mellonella</i>	41
a) Grupos experimentais.....	41
b) Seleção das larvas.....	41
c) Verificação da susceptibilidade de <i>Galleria mellonella</i> à infecção por <i>Streptococcus mutans</i>	42
d) Preparo da suspensão padronizada de <i>Candida albicans</i> e <i>Streptococcus mutans</i>	42
e) Preparo do sobrenadante da cultura de <i>Streptococcus mutans</i>	42
f) Injeção dos microrganismos em <i>Galleria mellonella</i>	43
g) Determinação da curva de sobrevivência de <i>Galleria mellonella</i>	44
Considerações Finais.....	44
Referências.....	44

1. Considerações iniciais

Os modelos de estudo com animais são frequentemente utilizados pela ciência em testes pré-clínicos, para analisar a eficácia e segurança de um determinado produto ou fármaco, antes de serem testados em seres humanos, com o objetivo de mimetizar ao máximo as condições clínicas e de tratamento no ser humano. Infecções fúngicas experimentais, ensaios com substâncias de interesse médico, criação de vacinas e de novas terapias, por exemplo, são comumente realizados em pequenos mamíferos como roedores ou coelhos (HENDRIKSEN, 2009; HOHL, 2014). No entanto, o uso de mamíferos apresenta desvantagens, uma vez que exigem uma infraestrutura mais complexa, custos mais elevados, períodos de experimentação maiores e envolve questões éticas (DOKE, DHAWALE, 2015).

Nos últimos anos, a busca pela redução de uso de modelos animais vertebrados e o desenvolvimento de modelos alternativos têm recebido fortes incentivos. Esse processo é conhecido como princípios dos 3Rs, ou, do inglês, refinement, reduction e replacement, equivalente em português aos termos Substituição, Redução e Refinamento. Substituição, indica evitar o uso de animais. Redução, busca reduzir a quantidade de animais em pesquisa e, Refinamento, visa diminuir o desconforto e aumentar o bem-estar dos animais, durante os protocolos de pesquisa (CHAMILOS *et al*, 2007; RITSKES-HOITINGA, VAN LUIJK, 2019).

Uma opção eticamente viável, em substituição ao uso dos modelos animais vertebrados, consiste no uso de insetos, como a *Galleria mellonella*, para diferentes testes pré-clínicos, como, por exemplo, os modelos de infecção experimental. Esses modelos vêm crescendo em pesquisas que envolvem patógenos humanos, pois, esses insetos contam com um desenvolvido sistema de defesa antimicrobiana, que se assemelha ao dos humanos, tendo um sistema imune inato complexo e células na hemolinfa com potencial de fagocitar microrganismos invasores (RAMARAO, NIELSEN-LEROUX, LERECLUS, 2012; BROWNE, HEELAN, KAVANAGH, 2013).

Além da *Galleria mellonella*, o *Drosophila melanogaster* e *Caenorhabditis elegans* são alguns dos modelos de insetos que têm sido usados em pesquisas para desenvolvimento de novos fármacos, vacinas, estudos da fisiopatologia de

fungos e seus respectivos tratamentos (ARVANITIS, GLAVIS-BLOOM, MYLONAKIS, 2013; CANTERI, *et al*, 2018; CUTULI, *et al*, 2019). Destes, em especial, o modelo de *Galleria mellonella* mostra-se interessante por ser relativamente de menor custo, de fácil execução e requer infraestrutura simples (FLEMING, *et al*, 2017). Adicionalmente, o modelo de *Galleria mellonella* possui resistência à variações de temperatura entre 25 e 37°C, possibilitando condições semelhantes às quais vivem os microrganismos em circunstâncias naturais, em seres humanos, viabilizando estudar traços de virulência ligados à temperatura. Com esse modelo também é possível controlar a quantidade do produto teste e dos microrganismos inoculados (FUCHS *et al*, 2010; MYLONAKIS *et al*, 2005).

É válido ressaltar que o genoma da *Galleria mellonella* ainda não está totalmente sequenciado, e aspectos fundamentais da resposta humoral, como, coagulação, produção de espécies reativas do oxigênio (ERO) e imunidade primária foram pouco explorados, necessitando de estudos para maiores esclarecimentos e, limitando, por ora, sua aplicação a estudos de imunidade inata (PEREIRA, *et al*, 2018; JEMEL, *et al*, 2020). Todavia, apesar do modelo de *Galleria mellonella* apresentar certa disseminação e estabilidade no uso para modelos experimentais, rotinas laboratoriais padronizadas precisam ser melhor estabelecidas, bem como, ter seu potencial explorado (CUTULI, 2019; ANDREA, KROGFELT, JENSSEN, 2019).

Assim, este manual sobre a criação e experimentação com *Galleria mellonella*, desponta como uma iniciativa do grupo de pesquisa em terapias complementares, da Universidade Estadual da Paraíba, com o objetivo de abordar temas centrais envolvidos na caracterização, viabilização, organização, manutenção e protocolos envolvidos no cultivo e experimentação com *Galleria mellonella*, seguindo parâmetros existentes na literatura e de observações feitas pela equipe.

2. *Galleria mellonella*

Com distribuição geográfica global e vivendo naturalmente como pragas de colmeias, a *Galleria mellonella* passou a ser interesse de pesquisas devido aos seus danos e prejuízos causados na apicultura. A partir daí, inúmeros estudos sobre seu ciclo de vida, comportamento, fisiologia e controle, passaram a ser feitos, de maneira que, seu interesse foi extrapolou a indústria da apicultura (FUCHS *et al*, 2010; ELLIS, GRAHAM, MORTENSEN, 2013).

A *Galleria mellonella* pertence ao grupo de insetos lepidópteros, mais especificamente das traças, e, à família Pyralidae (SCORZONI *et al*, 2013). São insetos ovíparos e holometábolos, ou seja, sofrem total metamorfose durante seu desenvolvimento, separada em quatro estágios: ovo, larva, pupa e mariposa, conforme ilustrado na figura 1. Os ovos levam de três a oito dias, a depender da temperatura, para chegarem à fase de larva (CARDOSO, FURLONG, PREZOTO, 2007; RAMARAO, NIELSEN-LEROUX, LERECLUS, 2012). As larvas permanecem de seis a sete semanas nesse estágio. Quando a larva para de se alimentar e demonstra pouca mobilidade, caracteriza-se a fase de pré-pupa, período de formação do casulo e, logo em seguida, fase de pupa. As pupas ficam estáticas em seus casulos e podem levar de uma a oito semanas para transformarem-se em mariposas. Durante esse período o inseto não se alimenta (ELLIS, GRAHAM, MORTENSEN, 2013; BROWNE, HEELAN, KAVANAGH, 2013).

Os ovos da *Galleria mellonella* são ásperos e apresentam coloração perolada, variando da cor branca ao rosa claro. Na maior parte dos casos, as fêmeas fazem a oviposição em aglomerados de 50 a 150 ovos. Durante o desenvolvimento, os ovos vão do branco para o amarelado e, em aproximadamente quatro dias antes da incubação, um anel escuro dentro do ovo pode ser visto. Nas doze horas que precedem a eclosão é possível observar as larvas completamente formadas através da membrana serosa que reveste o ovo, o córion (PADDOCK, 1918).

Logo após a eclosão, as larvas apresentam uma coloração esbranquiçada medindo de 1 a 3 mm, e logo iniciam a alimentação e teagem de teias. A fase larval da *Galleria mellonella* passa por cerca de sete instares, ou seja, mudas. Grande parte do crescimento e ganho de peso acontece nos últimos dois instares. No último

instar, prestes a entrar na fase de pupa, as larvas medem aproximadamente 20 mm, pesam cerca de 200 a 300 mg, e apresentam coloração cinza com escudo castanho no protórax, sendo essa a fase ideal para utilização das larvas em análises (PADDOCK, 1918).

Alcançado o último instar, as larvas convertem-se em pupas. Dentro do casulo, a pupa recém-formada apresenta coloração branca e torna-se amarela após aproximadamente 24 horas. Logo após quatro dias a pupa torna-se castanha clara e vai escurecendo gradualmente até ao final. As pupas de *Galleria mellonella* variam entre 5 mm a 7 mm de diâmetro, e 12 mm a 20 mm de comprimento. O estágio de desenvolvimento da pupa varia de acordo com as estações do ano a temperatura, de seis a 55 dias (PADDOCK, 1918).

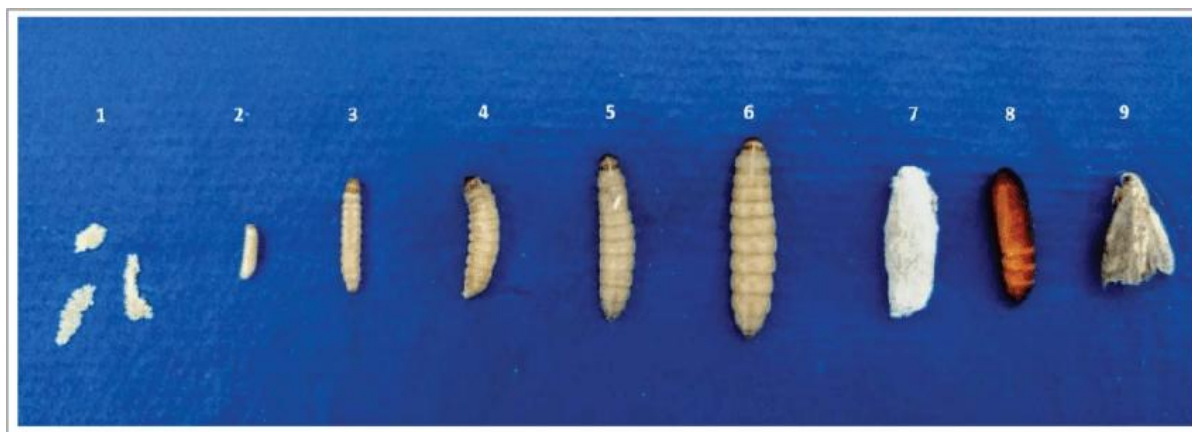
Na fase adulta, as mariposas do sexo masculino são menores que as fêmeas, têm coloração mais clara e asas dianteiras menores e repartidas. As fêmeas têm asas maiores e retilíneas. Os adultos movem-se rapidamente de um lado para outro, em voos curtos. As antenas das fêmeas são cerca de 10-20% mais longas. As fêmeas nessa fase vivem aproximadamente 12 dias, os machos, cerca de 21 dias. A coloração e o tamanho dos adultos, a depender da composição e demanda de alimento, podem variar consideravelmente. Em média, os machos têm 21 mm de comprimento e as fêmeas 32 mm. Nessa fase, não se alimentam, pois, seus aparelhos bucais são atrofiados (PADDOCK, 1918; TUCKER, 1978; BRIGHENT *et al*, 2005).

O tamanho da larva da *Galleria mellonella* é considerado uma vantagem (SALAMITOU *et al*, 2000; MICHAUX, *et al*, 2013), uma vez que facilita o seu manuseio e permite, em modelos de infecção, por exemplo, inocular o patógeno de diferentes maneiras, tópica, oral ou injetável, sendo esta última a mais precisa. Com uma seringa de Hamilton, com uma agulha de calibre 26, é possível injetar inóculos diretamente na hemolinfa (FUCHS *et al*, 2010; TREVIJANO-CONTADOR, ZARAGOZA, 2014).

A resposta imune da *Galleria mellonella* funciona através de um sistema de cooperação entre diferentes componentes celulares e é composta de um sistema inato, formado pela imunidade celular e humoral. A hemolinfa dos insetos contém células semelhantes aos fagócitos presentes na corrente sanguínea dos mamíferos,

como, plasmócitos, granulócitos, pró-hemócitos, coagulócitos, esferulócitos e enocitóides, constituindo a imunidade celular. Quando patógenos invadem o organismo, esse sistema atua direcionando estes hemócitos, que, respondem encapsulando e fagocitando os invasores. Já a imunidade humoral, é constituída por proteínas tipo complemento, especificamente, melanina e peptídeos antimicrobianos (PRICE, RATCLIFFE, 1974; BOMAN, HULTMARK, 1987; KAVANAGH; REEVES, 2004; TSAI *et al*, 2016). Poucos minutos após a infecção, a larva começa a apresentar melanização, tornando-se acinzentada e com mobilidade reduzida. Quando param de responder aos estímulos motores ao toque, são dadas como mortas (FUCHS *et al*, 2010). A taxa de mortalidade larval é frequentemente o parâmetro mais usado para avaliação dos processos infecciosos (MORELO, TRENTIN 2016).

Figura 1. Diferentes estágios de desenvolvimento de *Galleria mellonella*. Ovos (1), larva de aproximadamente 10 dias (2), larva de aproximadamente 20 dias (3), larva de 25 a 35 dias (4 e 5), larva de aproximadamente 40 dias (último estágio larval) (6), pré-pupas e pupas (7 e 8), mariposas adultas (9).



Fonte: Jorjão *et al*, 2018.

3. Cultivo da *Galleria mellonella*

O cultivo criação da *Galleria mellonella* em laboratório pode ser iniciada a partir de qualquer fase do ciclo, porém, é mais comum a partir da disposição de mariposas adultas em um recipiente de plástico ou vidro com tampa perfurada, contendo papéis dobrados e sem ração, em incubadora BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio) para que haja a deposição dos ovos. O cultivo também pode ser iniciado a partir dos ovos depositados em papéis dobrados em formato de “sanfona”, distribuídos em um recipiente de plástico ou vidro com tampa perfurada, contendo ração específica, detalhada mais adiante, em incubadora BOD.

Quando o cultivo é iniciado pelas mariposas, há necessidade de ambos os sexos no recipiente. As fêmeas depositarão os ovos nas bordas dos papéis dobrados, ou, entre as dobras. Após dois dias, os papéis com os ovos devem ser retirados e colocados em um recipiente plástico de tampa perfurada contendo ração. No período de três a oito dias os ovos eclodem e as larvas alimentam-se da ração contida no recipiente. As larvas irão se alimentar e crescer até o estágio de pupa, permanecendo nessa fase por uma ou duas semanas e então se transformam em mariposas adultas. Após isso, todo o ciclo se reinicia (VILLAS, 2006; RAMARAO, NIELSEN-LEROUX, LERECLUS, 2012; ELLIS *et al*, 2013).

As mariposas fêmeas são diferentes dos machos na aparência. A mariposa macho mede cerca de 10 a 15 mm quando adulta e apresenta um tom bege com leves marcas claras e escuras. As mariposas fêmeas são ligeiramente maiores, medem cerca de 20 mm, e apresentam uma coloração mais escura, variando entre marrom e cinza. Além disso, são mais ativas do que os machos durante a noite.

Considerando que a dieta, as condições e protocolos de cultivo podem influenciar diretamente no ciclo de crescimento e resposta imunológica da *Galleria mellonella*, é fundamental que haja uma padronização desses protocolos, tornando possível a reprodução experimental em diferentes laboratórios sem que haja interferências indevidas nos resultados, possibilitando comparações entre eles e garantindo a implementação do modelo de *Galleria mellonella* em maior escala (COOK, MCARTHUR 2013; KRAMS *et al*, 2015; JORJÃO 2016; JORJÃO *et al*, 2018). A seguir serão apresentados alguns protocolos de cultivo para a *Galleria mellonella*:

Protocolo 1 (JORJÃO *et al*, 2018):

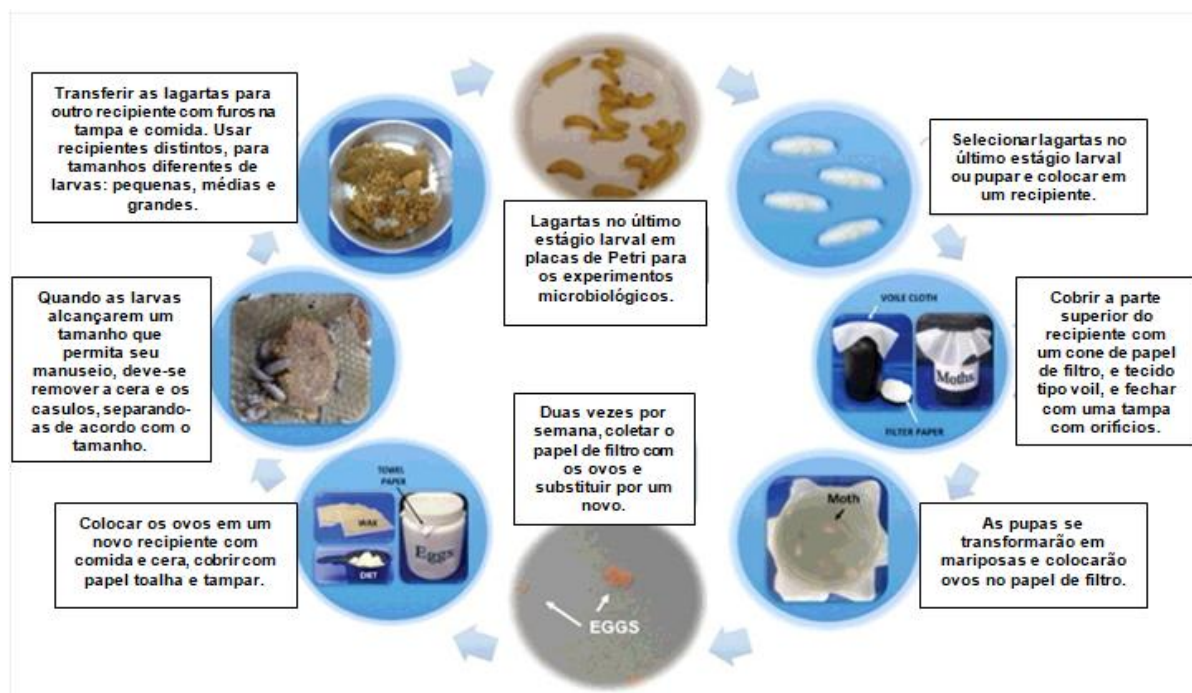
Protocolo de criação da *Galleria mellonella* sugerido por Jorjão *et al*, (2018), esquematizado na figura 2:

- Um total de 10 a 30 larvas no último estágio larval, ou pupas devem ser colocadas em recipiente de plástico ou vidro, medindo cerca de 30 cm de altura, e com tampa perfurada;
- Deve-se optar por recipientes escuros ou protegidos da luz;
- 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 sem impedir a entrada e saída de ar;
- Esses recipientes devem ser incubados à temperatura ambiente por uma a três semanas, para deposição dos ovos, a depender da duração do ciclo de vida, quando a maioria das mariposas envelhece ou morre;
- Embora as pupas e as mariposas não precisem ser alimentadas, deve-se adicionar um pouco de ração no recipiente, pois, alguns ovos podem eclodir e dar origem as larvas, antes da remoção dos papéis contendo os ovos;
- Duas vezes por semana, o papel de filtro com os ovos precisa ser transferido para um recipiente de plástico com tampa perfurada e substituído por um novo;
- Uma toalha de papel deve ser colocada sob a tampa perfurada para impedir que pequenas larvas escapem (as larvas recém-nascidas medem em torno de 1 mm). Dentro deste recipiente deve haver ração e pedaços de cera;
- 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. Os ovos são muito frágeis e podem estourar facilmente, requerendo muito cuidado durante o manuseio;
- Cerca de 20 dias depois, quando as larvas atingem tamanho suficiente para o manuseio, o recipiente deve ser higienizado e, as teias e casulos removidos;
- As larvas 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;
- As larvas devem ser mantidas a 28°C.

Observações:

- O fornecimento de ração a cada dois ou três dias é suficiente;
- No recipiente contendo ovos e/ou larvas pequenas, colocar em torno de 5g de ração e, para larvas médias e grandes, 8 a 10g;
- Para evitar fuga de larvas pequenas em decorrência da eclosão dos ovos, trocar o papel com os ovos com mais frequência, transferindo-o para um recipiente limpo e com ração;
- Não é necessário remover os ovos do papel, pois estes são muito frágeis e podem estourar. Transferir o papel contendo os ovos, conforme já descrito anteriormente.

Figura 2. Processo de criação da *Galleria mellonella* sugerido por Jorjão *et al*, (2018).



Fonte: Jorjão *et al*, 2018.

Protocolo 2 (RAMARAO, NIELSEN-LEROUX, LERECLUS, 2012):

Protocolo sugerido por Ramarao, Nielsen-Leroux, Lereclus (2012), cujo ciclo do ovo até a larva no último estágio dura cerca de cinco semanas, a 25°C, sendo

necessárias entre uma e duas semanas adicionais para se obter as mariposas adultas:

- Colocam-se cerca de 100 pupas ou mariposas adultas de *Galleria mellonella* recém-eclodidas e de ambos os sexos, em gaiola de malha de arame, com capacidade de aproximadamente cinco litros;
- Colocam-se na gaiola, duas folhas de papel, dobradas em quatro camadas para a postura dos ovos, que provavelmente ocorrerá após dois dias;
- Duas vezes por semana, as folhas de papel com ovos devem ser colocadas em caixas plásticas com telas nas tampas, que permitam circulação de ar, contendo pólen e cera de abelha;
- Os ovos geralmente eclodem em três dias e as larvas pequenas começam a se desenvolver alimentando-se de cera e pólen;
- Alternativamente, as larvas podem ser colocadas em um recipiente contendo dieta artificial composta por uma mistura de 500 g de mel líquido, 400 g de glicerina, 100 g de levedura de cerveja seca, 250 g de farinha de trigo, 200 g de leite em pó desnatado e 400 g fubá de milho;
- Para fornecer uma proporção apropriada de alimento por larva, separar regularmente as larvas por tamanho em novas caixas e trocar a ração a cada dois dias;
- Quando as larvas atingem o último estágio antes da fase de pupa, elas cessam a alimentação e iniciam a construção do casulo, restando apenas esperar que ela conclua seu ciclo;
- Após a formação do casulo, as larvas descansam e transformam-se em pupas, permanecendo nessa fase por cerca de uma a duas semanas, quando emergem em mariposas adultas, estas não bebem nem comem;
- A partir disso, inicia-se o acasalamento e o ciclo de vida da *Galleria mellonella* é reiniciado com a postura dos ovos;

Observações:

Para padronização dos experimentos, selecionar as larvas durante o último estágio larval. Nesse estágio, elas param de se alimentar e vão em direção à tampa

do recipiente, dando início a produção de seda. Permanecem nessa fase por cerca de cinco dias.

No geral, os recipientes para cultivo das larvas podem ser de metal, vidro ou plástico. Os recipientes de madeira, papel e papelão devem ser evitados, pois podem ser mastigados pelas larvas (SINGKUM *et al*, 2019).

Protocolo 3

A seguir será apresentado o protocolo de criação da *Galleria mellonella*, no Laboratório de Análises e Diagnóstico, do Departamento de Odontologia, da Universidade Estadual da Paraíba.

De modo geral, os potes podem ser de vidro ou plástico e a tampa deve ser sempre perfurada para todos os estágios. Os furos não precisam ser grandes e os potes devem ser limpos constantemente e bem secos, eliminando a umidade no seu interior.

- Iniciar o processo de criação adicionando larvas em um pote limpo com tampa perfurada, ração e pedaços de cera;
- Limpar o pote com as larvas de uma a duas vezes por semana. A finalidade da limpeza é prolongar a fase larval e diminuir a contaminação;
- A limpeza consiste em retirar todas as larvas do pote, lavar o pote com esponja e detergente e secar bem sem deixar qualquer umidade;
- Antes de retirar as larvas do pote, devem-se remover os fios de seda com muito cuidado;
- Trocar a ração antiga por nova, independente de as larvas terem consumido tudo;
- A troca da ração velha por ração nova diminui o risco de contaminação para as larvas;
- Ao final da limpeza adicionar as larvas ao pote limpo com nova ração e guardar na incubadora. Se necessário colocar papel na tampa para não fugirem, avaliar o tamanho da larva;
- À medida que as larvas crescem, elas se transformam em pupa e se envolvem em um casulo, este casulo branco deve ser retirado com auxílio de pinça e tesoura para facilitar a saída das mariposa;

- As mariposas devem ser mantidas no recipiente apenas com os papéis sanfonados, não sendo necessário adicionar ração;
- Após o surgimento das mariposas, os papéis dobrados devem ser trocados em média duas vezes por semana, e transferidos para novos potes contendo ração (os papéis geralmente apresentam manchas amareladas, indicando a presença de ovos). Novos papéis devem ser dobrados em forma de sanfona e colocados no pote com as mariposas. O processo se repete até o fim do ciclo vital das mariposas, ou até que não tenham mais manchas nos papéis.
- Após a transferência dos papéis manchados para os potes com ração, esperam-se alguns dias e os ovos irão eclodir em larvas muito pequenas. Nessa fase é importante colocar a folha de papel na tampa do pote para evitar que elas fujam. Em algumas semanas elas crescem e o ciclo reinicia.

Observações:

Em condições ideais, terão na incubadora, três classes de potes: um com larvas viáveis para experimento, um com pupas/mariposas e papéis e um com papéis com ovos mais ração;

Quando a produção estiver em uma escala possível de realizar experimentos é ideal separar as larvas por pesos. Como o peso de larva para experimento é entre 200 e 300 mg, é indicado separar as que estão acima do peso para que seja o futuro pote de pupas.

Todas as etapas de manipulação das larvas devem ser feita com luva e máscara a fim de evitar contaminação das mesmas com patógenos humanos.

3.1 Dietas e rações

Considerando que a *Galleria mellonella* tem como habitat natural as colônias de abelhas e que se alimentam de seus componentes e detritos, as dietas reproduzidas em laboratórios devem buscar suprir essas características naturais e ser livres de contaminantes. Além disso, devem ter propriedades físicas e químicas que estimulem um adequado desenvolvimento, fornecendo nutrientes essenciais e não essenciais em proporções bem definidas, que possibilitem ao inseto realizar seu ciclo biológico sem sofrer prejuízos (PARRA, 2001). Caso as dietas ofertadas não

apresentem uma alta qualidade nutricional, as larvas apresentarão redução de tamanho e perda de peso, além de uma fase precoce de pupação (KRAMS *et al*, 2015).

No estudo de Nomura, Chaud-netto, Gobbi (2006), quando a *Galleria mellonella* foi submetida à dieta artificial de Guerra (1973), apresentou viabilidade larval de 87,33% e, pupar de 96,94%. Desses, 97% eclodiram para fase adulta, mariposa. Esses valores, inclusive, foram maiores do que quando comparados a uma dieta tida como natural, a base de favo e pólen.

Os espécimes de *Galleria mellonella* alimentam-se apenas em seu estágio larval. Um dos métodos usados para alimentar suas larvas, é fornecer insumos que comumente estariam disponíveis em seu habitat, por exemplo, cera. No entanto, a produção e uso da cera costuma ser um processo oneroso e insustentável para abastecer um grande número de larvas. Por esses motivos, inúmeras variações de dietas artificiais foram e vêm sendo desenvolvidas (ELLIS *et al*, 2013). A seguir serão apresentadas algumas dietas artificiais utilizadas no cultivo da *Galleria mellonella*.

- Dieta 1 (GUERRA, 1973)

94 g de levedo de cerveja
80,2 g de farinha de soja
192,6 g de fubá
48,2 g de leite em pó desnatado
236 ml de mel
208 ml de glicerina
20 ml de água destilada

- Dieta 2 (EMBRAPA, por JORJÃO 2016; JORJÃO *et al*, 2018)

20g de açúcar mascavo
80g de glicerol
400g de leite em pó
120g de extrato de levedura
200g de farinha de trigo integral
200g de farelo de trigo
200g de gérmen de trigo
Blocos de cera de abelha

- Dieta 3 (MEAD, RATCLIFFE, RENWRANT, 1986 - MODIFICADA)

300g de flocos de aveia
300g de farinha de trigo integral
60g de fermento seco
120 ml de glicerol
120 ml de mel
Blocos de cera de abelha

- Dieta 4 (BRIGHENTI, CARVALHO, CARVALHO, BRIGHENTI, 2005 - MODIFICADA)

250g de farinha de milho
150g de extrato de levedura
100g de farinha de soja
100g de leite em pó
200g de mel
200g de glicerol
Blocos de cera de abelha

- Dieta 5 (FERNANDES *et al*, 2017)

Simples	Duplo
120g de Mel	120g de Mel + 120g de Melado
120g de Glicerol	130g de Glicerol
200g de Leite	400g de Leite
60g de Levedo ou levedura de cerveja	120g de Levedo de cerveja
100 g de Gérmen de trigo	200g de Gérmen de trigo
100 g de Farinha de trigo	200g de Farinha de Trigo
120 g de Farelo de trigo	200g de Farelo de trigo

- Dieta 6 (Faculdade de Odontologia de Piracicaba, por SILVA *et al*, 2019)

Meia Receita
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
100ml de H2O

- Dieta 7 (RAMARAO, NIELSEN-LEROUX, LERECLUS, 2012)

500g de mel
400g de glicerina
100g de levedura de cerveja seca
250g de farinha de trigo
200g de leite em pó desnatado
400g de fubá de milho

No estudo de Jorjão *et al*, (2018) foram testadas e comparadas as dietas: 2, 3, 4 e uma dieta a base apenas de pólen e cera. O estudo classificou a dieta 4 (BRIGHENTI *et al*, 2005 – MODIFICADA) como padrão, devido a seus ótimos resultados e baixo custo.

Observações:

- O favo de mel, quando usado, deve ser colocado à parte, junto com a ração.
- A cera deve ser derretida em micro-ondas, por cerca de 12 minutos ou até que se derreta completamente.
- O mel é adicionado à parte seca da receita, até formar uma massa. Depois acrescenta a cera derretida e mistura novamente até se tornar uma massa homogênea e consistente.
- Independente da dieta, os ingredientes devem ser sempre bem misturados.
- O recipiente para armazenar a ração deve ser de vidro, ser limpo com etanol e mantido na geladeira, por no máximo 15 dias, visto que, passando desse período, a ração fica ressecada.

4. Modelos experimentais com a *Galleria mellonella*

4.1 Análises de atividade antifúngica

A infecção pode ser induzida nas larvas por meio de três métodos diferentes: aplicação tópica, oral e injeção (SCULLY, BIDOCHKA, 2005). O método mais usado é a injeção, feita por meio de uma agulha específica, com inoculação de uma dose exata de células na hemolinfa do inseto (TZOU, DE GREGORIO, LEMAITRE, 2002; FUCHS *et al*, 2010; TREVIJANO-CONTADOR, ZARAGOZA, 2014).

A *Candida albicans* é um dos principais fungos responsáveis por infecções locais e sistêmicas em humanos, e, vem sendo bastante explorado no modelo de infecção experimental de *Galleria mellonella* (BRENNAN, *et al*, 2002; GARCIA-CUESTA, SARRION-PÉREZ, BAGÁN, 2014). Por exemplo, no estudo de Scorzoni *et al*, (2013), constatou-se o benefício desse modelo para avaliação de virulência e eficácia de antifúngicos contra infecções por *Candida krusei*.

No entanto, ressalta-se que o método de injeção do inóculo pode desprezar o curso natural das infecções e acarretar respostas imunes diferentes do esperado (TZOU, DE GREGORIO, LEMAITRE, 2002). Um método mais fisiológico e próximo daquele que ocorre naturalmente, refere-se à indução dessas infecções por meio da dieta ou do contato, inserindo os insetos sobre superfícies com esporos de fungos frescos. Isso permite que os patógenos atravessem o exoesqueleto dos espécimes, gerando uma infecção de maneira mais lenta e similar ao natural, mas apresentam a desvantagem de não controlar as doses exatas de infecção (VODOVAR, 2004; KAVANAGH; REEVES, 2004; MYLONAKIS *et al*, 2005). Nos modelos de infecção por *Candida albicans*, por exemplo, um inóculo de 5×10^5 unidades formadoras de colônias (UFC) por larva é considerado adequado, a fim de se avaliar a ação de agentes antifúngicos (LI *et al*, 2013).

Quando a Infecção das larvas de *Galleria mellonella* se dá por fungos não patogênicos, uma alta concentração de hemócitos pode ser constatada na hemolinfa. No entanto, quando essa infecção ocorre por fungos patogênicos, como, por exemplo, pela *Candida albicans*, acontece uma redução notável no número de hemócitos. Por isso, a mensuração das concentrações de hemócitos pode atuar como marcador de patogenicidade dos invasores fúngicos no modelo de *Galleria mellonella* (HUSAIN, WAGENER, SINGH, 2001). Os pró-hemócitos, coagulócitos,

esferulócitos, enocitóides, plasmócitos e granulócitos são hemócitos já bem caracterizados e que participam ativamente da resposta imune da *Galleria mellonella*, através de processos especializados, como, fagocitose, nodulação e melanização (GILLESPIE, KANOST, TRENCZEK, 1997; KAVANAGH; REEVES, 2004), sendo os plasmatócitos e granulócitos as células predominantes no processo de fagocitose (HUSAIN, WAGENER, SINGH, 2001).

Diante disso, serão apresentados a seguir, alguns protocolos encontrados na literatura, ressaltando que todas as recomendações descritas em cada protocolo, estão de acordo com o método de cada autor.

4.1.1 Protocolo para avaliação da atividade de agentes antifúngicos em infecção por *Candida albicans*, descrito por Li et al, (2013):

a) Preparação do inóculo:

Cultivar a *Candida albicans* em meio líquido YPD a 30°C (1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 2% dextrose), em uma incubadora com agitação, por 24h. Após esse período, colônias de *C. albicans* são utilizadas para preparar suspensões em diferentes concentrações, a depender do experimento.

b) Viabilidade larval:

- Selecionar as larvas de *Galleria mellonella*, que se encontram no final do último estágio larval, pesando cerca de 330 mg e sem presença de marcas cinzas;
- Compor cada grupo com 16 larvas selecionadas aleatoriamente;
- Antes das inoculações, limpar a região das últimas pró-patas com algodão embebido em álcool;
- Injetar a suspensão do inóculo diretamente na última pró-pata esquerda, com auxílio de uma seringa de Hamilton (MYLONAKIS et al, 2005), respeitando o volume de 5 μ L;
- Após a injeção do inóculo, incubar as larvas a 37°C em recipiente de plástico e, contar o número de larvas mortas diariamente, até que todas estejam mortas;

- Os agentes antifúngicos devem ser administrados usando a mesma técnica e nas seguintes concentrações: fluconazol (FLC) 1, 4 e 16 mg/kg; anfotericina B (AMB) a 0,4, 1,6 e 6,4 mg/kg, e flucitosina (5-FC) a 1,25, 5 e 20 mg/kg;
- Um grupo controle deve receber 5 μ L de solução tampão fosfato-salina (PBS) em substituição ao inóculo de *Candida albicans*, para monitorar mortes por lesão física ou infecção por patógenos contaminantes;
- Plotar as curvas de morte e examinar usando o método de Kaplan-Meier (KAPLAN & MEIER, 1958);
- Determinar as diferenças realizando análise estatística.

4.1.2 Protocolo para avaliação da atividade de agentes antifúngicos em infecção por *Candida albicans*, descrito por Fallon, Kelly, Kavanagh, (2012):

a) Preparação do inóculo:

- Crescer uma cultura de *Candida albicans* para a fase estacionária ($1-2 \times 10^9$ /ml) em caldo YEPD a 30 °C, sob agitação em 200 rpm e coletar as células após centrifugação ($2.056 \times g$ por 5 min), lavar em PBS e ressuspender em PBS em várias densidades celulares, variando de 5×10^5 , 1×10^6 , $2,5 \times 10^6$ a 5×10^6 por 20 μ L.

b) Viabilidade larval:

- Colocar larvas saudáveis em placas de Petri estéreis de 9 cm, forradas com papel de filtro *Whatman*; Para cada grupo selecionar 10 larvas.
- Injetar 20 μ L da suspensão do inóculo na última pro-pata esquerda da larva, usando uma seringa Myjector;
- Incubar as larvas a 30°C, no escuro, por até 96h;
- Incluir na análise dois grupos para controle, um com larvas intocadas e outro com larvas injetadas com 20 μ L de água ou PBS;
- Avaliar as larvas em intervalos regulares (a cada 24 horas) quanto à viabilidade e progressão da doença, até o fim dos experimentos;

- Para avaliação da viabilidade, sondar as larvas suavemente com uma agulha e, quando nenhuma resposta for observada, considerar as larvas como mortas. Além disso, considerar as alterações na cutícula e melanização.

c) Determinação da densidade de hemócitos da *Galleria mellonella*

- Escolher três larvas aleatoriamente e perfurar seu dorso na extremidade anterior (cabeça) com uma agulha estéril;
- Coletar a hemolinfa amarela (sangue);
- Reunir em um único tubo eppendorf pré-resfriado contendo uma pequena quantidade de 1-fenil-3- (2-tiazolil) -2-tioureia, para evitar a melanização da hemolinfa;
- Diluir a hemolinfa na proporção 1:10 em solução PBS resfriada, contendo 0,37% (v/v) 2-mercaptoetanol, para reduzir a coagulação e melanização;
- Homogeneizar suavemente pipetando;
- Usar um hemocitômetro para contar os hemócitos e calcular a densidade original nas larvas.

d) Determinação da carga fúngica de *Galleria mellonella* inoculada com *Candida albicans*

- Inocular 10 larvas de *Galleria mellonella* com inóculos de *Candida albicans* (5×10^5 células / 20 μ L) e as incubar por 24 h a 30°C;
- Selecionar três larvas aleatórias e triturá-las em um pilão estéril com 3 mL de PBS até formar uma pasta;
- Diluir o conteúdo em PBS e homogeneizar;
- Plaquear 100 μ L das amostras em placas de YEPD-eritromicina;
- Incubar as placas a 30°C por 24 h para contagem das UFC;
- Calcular a carga fúngica larval multiplicando o número de UFC pelo fator de diluição;

e) Avaliação da atividade *in vivo* de caspofungina em *Galleria mellonella* infectada com *Candida albicans*

- Infectar três grupos de 10 larvas de *Galleria mellonella*, com *Candida albicans*, e separar cada grupo em uma placa de Petri;

- Uma hora após a infecção, inocular as larvas com um volume de 20 µL de caspofungina (por exemplo, 0,2, 0,1, ou 0,05 µg/ml) ou PBS (como controle) e as manter a 30°C por até 96 h;
- Avaliar a viabilidade larval em intervalos de 24 horas, até o fim do experimento;
- Os medicamentos antimicrobianos podem induzir uma resposta imune nas larvas da *Galleria mellonella*, e, por isso, grupos controle devem ser incluídos para avaliar atividade antimicrobiana do agente de teste;
- Como alternativa para avaliar a eficácia da caspofungina frente a infecção, por *Candida albicans*, pode-se injetar a caspofungina nos grupos de larvas, no período de 1 ou 4 h antes da infecção por *C. albicans*.

f) Extração de RNA da *Galleria mellonella* e análise da expressão gênica antimicrobiana

Para extrações de RNA, materiais livres de RNase devem ser usados e as precauções tomadas para minimizar a contaminação.

- Colocar três larvas de *Galleria mellonella* em um pilão, cobri-las com nitrogênio líquido (cerca de 5 ml) e moendo-as até que se assemelhem a um pó fino;
- Adicionar 3 mL de reagente TRI ® e misturar;
- Deixar subir ligeiramente a temperatura até que o líquido se torne menos viscoso;
- Transferir o líquido para tubos de 1,5 mL (1 mL em cada) e centrifugar a 12.000 × g por 10 min a 4°C;
- Transferir cada sobrenadante para um novo tubo, sem juntá-los;
- Para cada tubo, adicionar 200 µL de clorofórmio e agitar no vórtex por 15 s;
- Deixar repousar à temperatura ambiente durante 10 min;
- Centrifugar os tubos como antes e transferir a camada superior para um tubo novo adicionado de 500 µL de isopropanol;
- Agitar os tubos várias vezes e deixar repousar à temperatura ambiente durante 10 minutos;

- Centrifugar os tubos como antes, descartar o sobrenadante e lavar o pelet em 100 μ L de etanol a 75% no vórtex;
- Centrifugar os tubos novamente para remover o etanol completamente;
- Deixar os tubos secar naturalmente na câmara de fluxo laminar;
- Suspender novamente o sedimento em 80 μ L de água tratada com DEPC;
- Remover o DNA contaminado usando a desoxirribonuclease I (AMP-D1), de acordo com as instruções do fabricante, para tratar as amostras de DNase;
- Determinar a concentração de RNA usando o espectrofotômetro Nanodrop 1000;
- Armazenar as alíquotas de RNA a -80°C ;
- Antes do uso, deve-se lavar as plataformas de gel e o tanque, com SDS a 0,5% (p/v), enxaguar com água tratada com DEPC, seguida de etanol e deixar secar ao ar;
- Para visualizar o RNA, deve-se preparar 100 mL de agarose a 1% (p/v) em solução tampão de corrida FA 1x;
- Aquecer a mistura até dissolver e deixar esfriar naturalmente;
- Adicionar 1,8 mL de formaldeído a 37% (v/v) mais 1 μ L de 10 mg/ml de brometo de etídio imediatamente antes de colocar na cuba para formar o gel;
- Antes da corrida, equilibrar o gel em tampão de corrida FA 1x por pelo menos 30 min;
- Adicionar 4 μ L de RNA a 4 μ L de corante de carregamento de gel 5 \times RNA;
- Deixar aquecer a 65°C por 5 min e posteriormente resfriar no gelo;
- Distribuir as amostras nos poços do gel e programar a corrida a 50 V em tampão FA 1x, por aproximadamente 40 min;
- Visualizar as bandas usando um transiluminador UV;
- Sintetizar o cDNA usando 1 μ g de RNA e o Superscript III First-Strand Synthesis System para kit RT-PCR, de acordo com as instruções do fabricante;
- Armazenar o cDNA a -20°C ;
- Analisar a expressão dos genes antimicrobianos de *Galleria mellonella* por qRT-PCR usando iniciadores e condições de ciclo de PCR;
- Usar o gene de limpeza da actina como controle;

- Cada reação de PCR (volume de 20 μL) deve conter 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ cDNA, 2 μL de tampão 10 \times LA, 0,4 μL de DMSO, 1 μL 10 mM mistura dNTP, 14,6 μL de água, 0,4 μL 10 μM de iniciador direto, 0,4 μL de 10 μM de iniciador reverso e 0,2 μL de DNA AccuTaq™ LA polimerase;
- Misturar as soluções por pipetagem e colocar imediatamente no termociclador;
- Misturar 4 μL de produto do PCR com 4 μL de carga de tintura azul/laranja 6 \times ;
- Visualizar os produtos de PCR correndo as amostras em gel de agarose a 1% (p/v) (1g de agarose em 100ml de TAE x1) com a adição de 2 μL de 10 mg/ml de brometo de etídio;
- Correr o gel a 50 V por 30 min e visualizar usando um transiluminador UV.

g) Análise de alterações proteômicas em larvas infectadas por meio de Eletroforese 2D em Gel e LC/MS

- Coletar a hemolinfa amarela (sangue) de dez larvas de *Galleria mellonella* infectadas por fungos e, colocar em um tubo de 1,5 mL pré-resfriado e centrifugar a 800 \times g por 2 min, a 4°C, para granulação dos hemócitos;
- Transferir o sobrenadante celular para um tubo novo;
- Fazer uma diluição de 1:50 da hemolinfa livre de células brutas em água deionizada e, quantificar o conteúdo de proteínas usando o método de Bradford;
- Calcular a concentração proteica da hemolinfa pura e livre de células;
- Diluir 350 μg de proteína em 100 μL de tampão de Focalização Isoelétrica (IEF), e manter durante cerca de 15 minutos à temperatura ambiente;
- Adicionar 2 μL de anfólitos, pipetando de quatro a cinco vezes para homogeneizar e deixar repousar à temperatura ambiente durante 15 min;
- Adicionar mais 150 μL de tampão IEF e alguns grãos de azul de mofenol na solução, e pipetar para misturar;
- Pipetar 250 μL da amostra IEF em um caixão/bandeja, inclinando para garantir uma distribuição uniforme e, em seguida, colocar uma tira IEF de 13 cm dentro e cobrir a tira com o fluido de cobertura de fita, PlusOne;

- Colocar os caixões na com as tiras na máquina IEF, aplicando o seguinte método de focagem de tira por tira: 12 h a 50 V, 15 min a 250 V, aumentar para 8.000 V com aumento de gradiente ao longo de 5 h, e então manter as 8h a 8.000 V;
- Quando a focagem for concluída, armazenar a -70°C com o lado do gel da tira IEF voltado para cima;
- Fazer uma alíquota de 10 mL de tampão de equilíbrio em dois tubos de ensaio separados;
- Dissolver 0,2 g de ditioneitol (DTT) no primeiro tubo de equilíbrio, e 0,4 g iodoacetamida no segundo tubo de equilíbrio, adicionando alguns grãos de azul de bromofenol para o segundo tubo de equilíbrio (usar tubos de ensaio com tamanho mínimo de 13 cm);
- Transferir a tira IEF para a primeira solução de equilíbrio, selar com filme de parafina e incubar horizontalmente em uma mesa de balanço por 15 min;
- Transferir para a segunda solução de equilíbrio e deixar equilibrar como na etapa anterior;
- Quando o equilíbrio for completado, lavar brevemente com água deionizada e colocar sobre o gel de separação;
- Preparar um gel para eletroforese 2D;
- Colocar um pedaço de papel de filtro embebido em SDS-PAGE ladder no canto do gel e selar com uma solução de agarose a 1%, feita com tampão de execução 1x SDS-PAGE;
- Correr o gel a 80 V durante a noite e corar com Coomassie;
- Cortar pedaços de gel a partir de géis 2D e transferir para tubos siliconados individuais, certificando-se que os pedaços não possuem mais de 2mm de espessura, facilitando a descoloração e a absorção de tripsina;
- Lavar o gel usando tampão descolorante (200 µL) à temperatura ambiente e agitar no vórtex, ocasionalmente;
- Repetir esta etapa, quando necessário, para remover todo excesso de corante;
- Remover o tampão descolorante e ressuspender o gel em 100% de acetonitrila, suficiente para cobrir o pedaço de gel;
- Remover a acetonitrila;

- Armazenar os pedaços de gel a -20°C ;
- Adicionar $60\ \mu\text{L}$ de tampão de digestão com tripsina a cada tubo que contiver peças de gel e, manter todos os tubos no gelo por 30 min, induzindo a penetração do tampão de digestão da tripsina nas fatias de gel e evitando autodigestão da tripsina;
- Adicionar tampão de tripsina suficiente para cobrir os pedaços de gel e manter em gelo por aproximadamente 60 min;
- Inspeccionar todos os tubos para garantir que todos os pedaços de gel permaneçam cobertos;
- Adicionar 10 mM de AmBic: 10% v/v de tampão, garantindo que o gel permaneça hidratado durante a clivagem enzimática;
- Incubar o gel a 37°C por 4-24 h, permitindo a digestão trípica da proteína;
- Centrifugar as digestões trípicas a $5.000 \times g$ por 5 min e transferir o sobrenadante para um tubo limpo;
- Adicionar aproximadamente $100\ \mu\text{L}$ de tampão de extração ao gel restante, mantendo-os incubados a 37°C por 15 min para extração dos peptídeos;
- Centrifugar o sobrenadante e transferir para a digestão trípica do sobrenadante da etapa anterior;
- Secar os sobrenadantes a vácuo e reuni-los até a conclusão;
- Armazenar a -20°C até a análise por LC/MS;
- Antes da análise por LC/MS, ressuspender sobrenadantes secos em $15\ \mu\text{L}$ de ácido fórmico a 0,1%, removendo quaisquer detritos por meio de um filtro de acetato de celulose de $0,22\ \mu\text{m}$, centrifugando o tubo em $20.000 \times g$ por 3 min;
- Transferir $10\ \mu\text{L}$ de cada amostra para um frasco de LC/MS para análise.

h) Extração e análise de peptídeos das larvas de *Galleria mellonella*

- Sangrar 10 larvas por meio de uma incisão entre as duas últimas propatas e colocar em um tubo de 1,5 mL pré-resfriado e, centrifugar a $800 \times g$ por 2 min a 4°C para granulação dos hemócitos;
- Transferir o sobrenadante sem células para um tubo novo;

- Fazer uma diluição 1:10 da hemolinfa livre de células no peptídeo tampão de extração e deixar repousar no gelo por 30 minutos para captação de proteínas de alto peso molecular;
- Centrifugar a 20.000 × g por 30 minutos a 4°C;
- Transferir o sobrenadante para um tubo fresco e liofilizar em um congelamento mais seco, até secar;
- Ressuspender o material liofilizado em 200 µL de ácido trifluoroacético (TFA) a 0,1%;
- Adicionar um volume igual de n-hexano e misturar bem para remover lipídios;
- Centrifugar a 20.000 × g por 10 min;
- Remover a fração superior contendo lipídios, adicionando um volume de acetato de etila para a fração de água mais baixa;
- Centrifugar a 20.000 × g por 10 min;
- Remover a camada aquosa inferior para um tubo limpo de 1,5 mL;
- Quantificar o conteúdo de proteínas pelo teste de Bradford;
- Equalizar a concentração de proteína em um volume de 100 µL para permitir as análises comparativas entre diferentes tratamentos;
- Analisar as amostras em Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC) usando 220 nm como comprimento de onda de referência para detecção de ligações peptídicas, onde análise de múltiplos comprimentos de ondas é possível;
- Usar comprimentos de onda de 254 e 280 nm para detecção de ligações dissulfeto e aromas resíduos orgânicos, respectivamente.
- Usar os gradientes de HPLC detalhados abaixo:

Tempo (min)	Solvente	
0–5	5% acetonitrile	Step and hold
5–40	5–100% acetonitrile	Gradient
40–42	100% acetonitrile	Step and hold
42–44	100–5% acetonitrile	Gradient

- Caso seja possível, fracionar picos individuais de HPLC, de acordo com as diretrizes do fabricante;
- Liofilizar picos individuais durante a noite, armazenando a -20°C até a digestão trípica e a caracterização por MALDI-TOF ou análise de LC / MS.

5. Análise de toxicidade

Em Puppín (2018) foi utilizado o protocolo de Scorzoni *et al*, (2013), com modificações, para avaliar a toxicidade do óleo essencial de *Elionurus muticus* (capim-limão brasileiro) em larvas de *Galleria mellonella*

- Usar 10 larvas para cada concentração testada do óleo essencial e para o controle;
- Selecionar larvas que pesem entre 0,3 e 0,5 g;
- Alocar as larvas em placas de Petri incubar a 37°C , no escuro;
- Descartar as larvas com alterações de cor, como manchas escuras ou com melanização aparente;
- Monitorar a morte larval por inspeção visual da cor (marrom - marrom escuro) e pela ausência de movimento ao toque;
- Antes de qualquer procedimento, lavar a pró-pata com etanol 70%;
- Aplicar 10 μL da suspensão de várias concentrações do óleo essencial (125 – 12500 $\mu\text{g/ml}$) na hemocoele, na última pró-pata esquerda das larvas usando a seringa de Hamilton de 1 mL;
- Após a inoculação, incubar as larvas a 37°C e monitorar a morte por 72 horas.

6. Análise histológica

6.1 Protocolo apresentado por Scorzoni (2013)

O objetivo desse estudo foi caracterizar a interação entre *Galeria mellonella* e *Candida krusei* para obter *insights* sobre traços de virulência desta levedura patogênica e, investigar se a eficácia antifúngica *in vivo* se correlaciona com o perfil de suscetibilidade mostrado por *C. krusei in vitro*.

- Coletar três larvas em diferentes dias de infecção para compor os diferentes grupos (não infectados, infectados e/ou tratados com antifúngicos);
- Preservar as larvas em etanol a 70% e fazer incisões longitudinais com bisturi na parte dorsal;
- Fixar as amostras com formalina tamponada a 10% por 24 horas;
- Em seguida, desidratar as amostras com concentrações crescentes de etanol, lavar com xilol e incorporar em parafina;
- Corar as seções de tecido (5 microns) com solução de ácido periódico Schiff (PAS) e observar com um microscópio óptico.

6.2 Protocolo apresentado por Vilela (2015)

No estudo de Vilela (2015) analisaram-se histologicamente os efeitos do *Lactobacillus acidophilus* na filamentação de *Candida albicans* tecido adiposo da larva usando o seguinte protocolo:

- Formação dos grupos: grupo controle com PBS, grupo controle com caldo De Man, Rogosa e Sharpe (MRS), grupo celular *Candida albicans* + *Lactobacillus acidophilus*, grupo filtrado da cultura *C. albicans* + *L. acidophilus*, e grupo controle não inoculado com nenhum dos microrganismos, utilizando cinco larvas por grupo;
- Dezoito horas após a infecção, fazer uma incisão na linha média da parte ventral do animal, descartar a hemolinfa e remover o corpo gordo;
- Colocar o corpo gordo em formalina a 10% e armazenar por 24 horas a 4°C;
- Imergir o tecido em diferentes concentrações de álcool (50, 70 e 90% por 1h, 100% por 3h), incubar em xilol por 3h e montar em blocos de parafina;

- Cortar os blocos e corar com hematoxilina-eosina (HE) e ácido periódico Schiff (PAS);
- Visualizar as hifas e leveduras sob um microscópio de luz.
- Para análise da filamentação, fotografar todas as áreas da seção histológica que contem hifas e levedura com uma ampliação original de 1.000x;
- Determinar a área ocupada por células de hifas e leveduras (em μm) para cada imagem usando o programa ImageJ;
- Somar todas as áreas de células de hifas e leveduras.

7. Análises com bactérias

O modelo de *Galleria mellonella* foi muito usado ao longo dos anos em estudos sobre a resposta imune dos insetos. Pesquisas mais recente revelaram a presença de uma grande variedade de peptídeos antimicrobianos com diferentes propriedades bioquímicas e antimicrobianas na hemolinfa de suas larvas, quando desafiadas por bactérias. Grande parte dessa variedade de peptídios antimicrobianos (AMPs) está relacionada à resposta humoral, como as cecropinas, que, são ativas contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e, outros membros dos peptídeos lineares-helicoidais, como, peptídeos do tipo moricina, defensinas, peptídeos ricos em prolina, peptídeos ricos em glicina, e a lisozima, essencialmente presente na hemolinfa (HULTMARK, 1996; CYTRYŃSKA *et al*, 2001; CYTRYNSKA *et al*, 2007; LEE *et al*, 2004; WOJDA, 2017).

7.1 Patogenicidade de bactérias periodontais

O protocolo de Santos *et al*, (2020) utilizou o modelo de *Galleria mellonella* para avaliar a patogenicidade de bactérias periodontais, mais especificamente; *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*:

- Cultivar as bactérias em ágar *Brucella*, suplementado com 5% de sangue de ovelha desfibrinado e 1% de solução de hemina e menadiona;
- Incubar por cinco dias em uma câmara anaeróbica a 37°C;
- Preparar as suspensões para os ensaios, nas concentrações de 10^7 , 10^8 e 10^9 células/mL, com um espectrofotômetro a 660 nm, 550 nm e 600 nm

para *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, respectivamente;

- Selecionar larvas de cor clara (Figura 3.b), sem manchas e com peso entre 190–230 mg;
- Obter as curvas de sobrevivência inoculando 10 µL da suspensão bacteriana na última propata esquerda das larvas, nas concentrações de 10^7 , 10^8 e 10^9 células/mL (FIGURA 3. a);
- Usar solução salina tamponada com fosfato para inoculação de um grupo controle, com micro seringas;
- Usar doze larvas para cada avaliação de cada concentração de periodontopatógeno;
- Após a inoculação, incubar as larvas a 37°C no escuro, sem alimentos;
- Avaliar a sobrevivência diariamente, por sete dias, observando o processo de melanização (Figura 3. c) e morte (Figura 3.d);
- Usar as seguintes concentrações subletais: *P. gingivalis* (10^7 células/mL), *F. nucleatum* (10^8 células/mL), e *A. actinomycetemcomitans* (10^8 células/mL) para avaliar a concentração de hemócitos e UFCs da hemolinfa;
- Após a infecção, incubar as larvas a 37°C por 3 h;
- Para determinar a concentração de hemócitos, coletar uma amostra de hemolinfa de três larvas e diluir com uma solução anticoagulante (NaCl 2%, glicose 0,1 M, citrato de sódio 30 mM, ácido cítrico 26 mM e EDTA 10 mM);
- Estimar a concentração por meio de uma câmara de Neubauer;
- Para cada tratamento, analisar quatro grupos de três larvas cada, totalizando 12 larvas por tratamento;
- Para determinar as UFCs de periodontopatógenos recuperadas das larvas, coletar a hemolinfa e diluir em PBS, semear em ágar sangue Brucella suplementado com hemina 1% e menadiona e incubar em condições anaeróbias (37°C por cinco dias).

Figura 3. Modelo experimental da *Galleria mellonella*; (a) Inoculação das bactérias periodontopatógenas na última propata esquerda das larvas; (b) Larvas vivas após 1h da inoculação com PBS; (c) Larvas vivas e melanizadas após 1h da infecção com *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; (d) Larvas melanizadas e mortas após 24h da infecção.



Fonte: Santos *et al*, 2020.

7.2 Extração e análises com a hemolinfa da *Galleria mellonella*

Segue o protocolo utilizado por Harding *et al*, (2013) para extração e análises com a hemolinfa da *Galleria mellonella*, com detalhamento das técnicas experimentais utilizadas para infectar larvas, análise da mortalidade larval, extração de hemócitos para contagem e imunofluorescência e determinação da replicação por contagens viáveis de UFC de larvas infectadas.

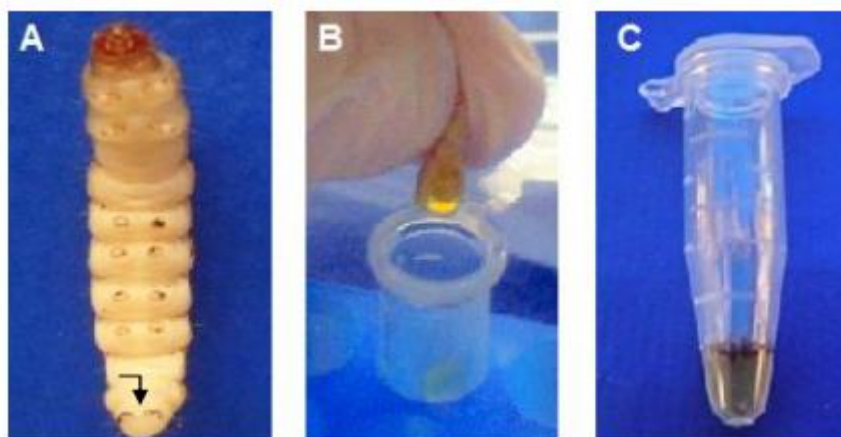
a) Extração da hemolinfa

- Selecionar aleatoriamente três larvas e coloca-las em um tubo Falcon de 14 ml nos momentos selecionados, como, 5 e 18 horas pós infecção;
- Manter este tubo no gelo por 5 a 10 minutos, até que não se observe nenhum movimento das larvas;
- Colocar as larvas anestesiadas em uma placa de Petri e, usando um bisturi, fazer uma incisão entre os dois segmentos próximos à cauda das larvas (Figura 4.a);
- Espremer as larvas em um tubo de centrifuga estéril de 1,5 ml para coleta da hemolinfa (Figura 4.b);

- Coletar e juntar a hemolinfa de pelo menos três larvas, por tubo (Figura 4.c);
- Uma larva fornece entre 15-50 μL de hemolinfa, dependendo do tamanho;
- Durante a extração da hemolinfa, é muito fácil romper o intestino e resultar na contaminação das amostras;
- Para reduzir a contaminação, deve-se cortar as larvas perto da cauda (longe do intestino);
- No entanto, a seleção de antibióticos sempre será necessária ao plaquear as bactérias;
- Para evitar que a hemolinfa fique marrom e coagule, deve-se processar a hemolinfa em até 10 minutos após a coleta;
- Descartar o corpo larval em um novo tubo Falcon de 14 ml, selado e colocado a 20 °C durante a noite, garantindo que as larvas estejam mortas;

As larvas mortas devem ser autoclavadas e descartas de acordo com as regras locais.

Figura 4 - Imagem da retirada de hemolinfa de *G. mellonella*. A) Seta representa a sequência de incisões para retirada da hemolinfa; B) Hemolinfa sendo retirada após a incisão; C) Tubo Eppendorf com a quantidade de hemolinfa referente ao pool de 3 larvas



Fonte: Barbosa, 2014.

b) Determinação da viabilidade do hemócito

- Misturar 20 μL de hemolinfa extraída com 20 μL de 0,02% (v/v) de azul de tripano em PBS, em um poço de uma placa de 96 poços;
- Incubar por 5 minutos em temperatura ambiente;
- Carregar 10 μL de hemolinfa em um hemocitômetro, contando as células viáveis (não azuis);
- Contar cada amostra em triplicata para reduzir o erro.

c) Processamento de hemócitos extraídos para microscopia de imunofluorescência

- Misturar a hemolinfa extraída de pelo menos três larvas, pipetando em lamínulas de vidro medindo de 10 a 15 mm e, separando-as nos poços de uma placa de 24 poços;
- As lamínulas não necessitam de tratamento, pois os hemócitos aderem facilmente ao vidro;
- Adicionar 0,5 mL de D-PBS e misturar bem pipetando para cima e para baixo;
- Centrifugar a placa por 10 min a 500 x g em temperatura ambiente (RT) usando um suporte de placa de centrifugação à prova de aerossol;
- Examinar cada poço usando um microscópio invertido para verificar se os hemócitos estão aderidos as lamínulas;
- Remover o sobrenadante e lavar as células cuidadosamente por três vezes adicionando 0,5 mL de D-PBS à parede do poço, agitando a placa 2 a 3 vezes e remover o D-PBS com uma pipeta;
- Fixar as células adicionando 0,5 mL de paraformaldeído a 4% (v/v) (PFA) em PBS;
- Incubar as células durante 20 a 30 minutos à temperatura ambiente;
- Lavar as células novamente, durante três vezes com D-PBS;
- Adicionar 0,5 mL de NH₄Cl 15 mM em PBS para extinguir o PFA residual e incubar à temperatura ambiente por 15 min;
- Lavar as células três vezes com D-PBS;
- Nesta fase, armazenar as lamínulas durante a noite a 4 °C;
- Adicionar 0,5 mL de Triton X-100 a 0,1% em PBS, e incubar por 5 minutos em temperatura ambiente para permeabilizar as células;
- Manter bloqueado por 1 hora com solução de bloqueio (2% (p/v) de BSA em PBS.
- Incubar por 1h à temperatura ambiente no escuro com o anticorpo primário diluído em solução de bloqueio, na diluição especificada pelo fabricante;
- Lavar três vezes com PBS;

- Incubar por 1 hora com o anticorpo secundário e DAPI (4, 6-diamidino-2-phenylindole) para visualização de bactérias;
- Lavar 3 vezes com PBS;
- Montar as lâminas usando uma gota de reagente de montagem nas lâminas de vidro;
- Manter incubado durante a noite no escuro à temperatura ambiente para secagem completa da solução de montagem;
- Visualizar a Imagem das lâminas em um microscópio de fluorescência.

d) Quantificação de UFC bacteriana

- Antes da extração da hemolinfa, pesar os tubos de centrífuga de 1,5 mL;
- Fazer a extração da hemolinfa como descrito anteriormente e colocar em tubos pesados, adicionados de 1 μ L de 5 mg /ml de digitonina, misturados bem e incubados por 5 min em temperatura ambiente;
- Lisar os hemócitos;
- Pesar os tubos novamente com a hemolinfa, determinando o peso da hemolinfa extraída;
- Realizar diluições em série de dez vezes a hemolinfa em caldo de extrato de levedura ACES (AYE) estéril;
- Usar uma caneta para demarcar a base de uma placa CYE em seis setores iguais e identificados;
- Colocar três gotas de 25 μ L de cada diluição (começando com a mais diluída) em cada seção da placa;
- Incubar as placas com as tampas viradas para cima durante a noite a 37°C;
- Depois que as gotas secaram completamente, virar as placas e incubar a 37°C por pelo menos mais dois dias;
- Quantificar as bactérias extraídas pela contagem das colônias a cada diluição e normalizadas com o peso da hemolinfa extraída.

7.3 Modelo de infecção por *Porphyromonas gingivalis* do tipo selvagem e mutante *cas 3*

Protocolo apresentado por Solbiati *et al*, (2020) para avaliar a virulência da *Porphyromonas gingivalis*.

- De início, separar as larvas mortas das larvas saudáveis;
- Pesar as larvas e formar grupos aleatórios;
- Manter as larvas em temperatura ambiente até o momento da infecção;
- Formar 7 grupos de 15 larvas, escolhidas aleatoriamente, com peso entre 200 a 300 mg, e sem sinais de melanização;
- Usar seringa de Hamilton de 25 µl para injetar alíquotas de 5 µl de inóculo bacteriano na hemocele de cada larva, na última pro-perna esquerda;
- Selecionar três grupos para receber *P. gingivalis* do tipo selvagem ($3,85 \times 10^8$, $7,7 \times 10^7$ e $3,85 \times 10^6$ CFU por larva), e três grupos para receber o mutante *cas 3* ($2,15 \times 10^8$, $4,3 \times 10^7$ e $2,15 \times 10^6$ CFU por larva);
- Incluir três grupos de controle com meio THSB sozinho, caldo de soja tríplica (TSB) (BD, Becton, Dickinson and Co.) mais *P. gingivalis* de tipo selvagem morta por calor (10 min a 75°C) e THSB mais $\Delta cas3$ mutante morta por calor (10 min a 75°C);
- Após a injeção, incubar as larvas a 37°C, no escuro;
- Registrar o aparecimento de melanização e sobrevivência em: 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 3,75, 4,25, 6,25, 22, 24, 28 e 42h;
- Classificar as larvas como mortas quando não realizarem nenhum movimento em resposta ao toque;
- Traçar as curvas de morte de Kaplan-Meier e estimar as diferenças na sobrevivência usando um teste de log-rank;
- Um valor de $P \leq 0,05$ é considerado significativo;
- Analisar os dados com os pacotes de 'sobrevivência' e 'sobrevivente' no software R;
- Repetir os experimentos três vezes;

7.4 Interação entre *Candida albicans* e *Streptococcus mutans* em modelo experimental de *Galleria mellonella*.

No estudo de Barbosa (2014), foi utilizada a metodologia descrita por Mylonakis *et al*, (2005) e Fuchs *et al*, (2010), para avaliar essa interação.

a) Grupos experimentais

A Figura 5 apresenta os grupos experimentais e número de larvas utilizadas para cada experimento no estudo de Barbosa (2014).

FIGURA 5. Testes, grupos experimentais e número de lagartas utilizadas por experimento

Grupos Experimentais	Curva de sobrevivência	Contagem de UFC/mL				Análise histológica
		0h	4h	8h	12h	
Infecção por <i>S. mutans</i>	64	-	-	-	-	-
Controle PBS	16	9	9	9	9	3
Controle BHI	16	-	-	-	-	3
Interação Célula	16	9	9	9	9	3
Interação Sobrenadante	16	9	9	9	9	3
PBS apenas	16	-	-	-	-	3
Sem injeção	16	-	-	-	-	-
TOTAL	160	108				15

FONTE: Barbosa, 2014

b) Seleção das larvas

- Utilizar larvas de *Galleria mellonella* em estágio final da fase larval e pesando aproximadamente 25 mg;
- Não é necessário fornecer alimentos as larvas.

c) Verificação da susceptibilidade de *Galleria mellonella* à infecção por *Streptococcus mutans*

- Antes da análise da interação entre *Candida albicans* e *Streptococcus mutans*, realizar análise da suscetibilidade de *Galleria mellonella* à infecção por *S. mutans* para determinar a concentração sub-letal para este microrganismo nesses animais;
- Para efetuar essa análise, inocular nas larvas, suspensões de *Streptococcus mutans* padronizadas em diferentes concentrações (10⁴ a 10⁷ células/mL);
- Cada grupo deve ser composto por 16 larvas, e cada uma deve receber um inóculo de 5 µL de cada suspensão padronizada, para determinação da curva de sobrevivência;

d) Preparo da suspensão padronizada de *Candida albicans* e *Streptococcus mutans*

- Cultivar a *Candida albicans* a 37°C por 24h em caldo YNB (Difco, Detroit, USA) suplementado com glicose na concentração de 100 mM;
- Cultivar a *Streptococcus mutans* em caldo Brain Heart Infusion (BHI) (Himedia, Mumbai, Índia) a 37°C, e incubar em microaerofilia (5% de CO₂) por 4h;
- Em seguida, centrifugar as células microbianas (1300 xg por 10 min);
- Descartar o sobrenadante e ressuspender o sobrenadante em 6 mL de solução fisiológica tamponada com fosfato (PBS);
- Repetir essa etapa novamente;
- Contar o número de células da suspensão através de espectrofotômetro (B582, Micronal, São Paulo, Brasil) na concentração de 10⁷ microrganismos/mL e com valores de comprimento de onda de 0,530 nm para *Candida albicans* e 0,398 nm para *Streptococcus mutans*;
- A densidade óptica deve ser de 0,381 para *Candida albicans* e 0,560 para *S. mutans*.

e) Preparo do sobrenadante da cultura de *Streptococcus mutans*

- Incubar a cepa em caldo Brain Heart Infusion (BHI) a 37°C por 24h em microaerofilia;
- Após isso, realizar a suspensão padronizada de 10⁷ células/mL, como descrito anteriormente;
- Transferir 1 mL da suspensão padronizada para tubo Falcon contendo 6 mL de caldo BHI suplementado com 5% de sacarose e incubar a 37°C por 4h em microaerofilia;
- Após o período de incubação, centrifugar o caldo (1300 xg por 10 min) e filtrar em membrana com poros de 0,22 µm de diâmetro (MFS, Dublin, EUA).

f) Injeção dos microrganismos em *Galleria mellonella*

- Injetar um inóculo de 5 µL da suspensão padronizada de *Candida albicans* na hemolinfa de cada larva, por meio da última propata esquerda, com uma seringa Hamilton de 10 µL;
- Inocular também 5 µL da suspensão de *Streptococcus mutans* ou 5 µL do seu sobrenadante na propata direita;
- Nos grupos com infecção por um único microrganismo, inocular 5 µL da suspensão na proleg esquerda, e 5 µL de PBS na propata direita;
- Inocular um grupo apenas com PBS, para comprovar que o trauma causado pela agulha não acarreta na morte das larvas;
- Um grupo de larvas íntegras, sem qualquer intervenção, deve ser usado para acompanhar o estado de saúde das larvas de *Galleria mellonella* durante todo o experimento;
- Antes das inoculações, esterilizar as seringas (Hamilton Inc, EUA), com ácido peracético (Henkel - Ecolab GmbH, Düsseldorf, Alemanha) como manda as instruções do fabricante;
- Realizar a limpeza da agulha e do interior da seringa a cada cinco injeções;
- Realizar a limpeza da seringa, lavando em uma sequência de quatro tubos Falcon com, respectivamente: 1º) 20 mL de hipoclorito de sódio, 2º) 20 mL de álcool absoluto, 3º) 20 mL de água destilada estéril e 4º) 20 mL de PBS estéril;

- Deve-se mergulhar a agulha e realizar 5 movimentos no êmbolo para cima e para baixo, em toda sequência dos tubos Falcon.

g) Determinação da curva de sobrevivência de *Galleria mellonella*

- Finalizadas as inoculações, armazenar as larvas em placas de Petri e incubar a 37°C em estufa bacteriológica;
- Anotar o número de larvas mortas, 18h após a inoculação das suspensões, e, após isso, a cada 24h, por sete dias após o início do experimento;
- Considerar as larvas como mortas quando estas não realizarem movimento ao toque.
- A morte de todas as larvas ou a transição para a forma de pupa determinará o término do experimento.

Considerações Finais

O modelo animal de *Galleria mellonella* é considerado uma alternativa viável ao modelo animal para realização e reprodutibilidade de inúmeros experimentos com bactérias e fungos, teste de toxicidade sistêmica e efetividade de medicamentos. Além disso, exige protocolos de cultivo e dietas de custo relativamente baixo e de fácil implementação.

Referências

ANDREA, Athina; KROGFELT, Karen Angeliki; JENSSEN, Håvard. Methods and challenges of using the greater wax moth (*Galleria mellonella*) as a model organism in antimicrobial compound discovery. **Microorganisms**, v. 7, n. 3, p. 85, 2019.

ARVANITIS, Marios; GLAVIS-BLOOM, Justin; MYLONAKIS, Eleftherios. Invertebrate models of fungal infection. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1832, n. 9, p. 1378-1383, 2013..

BARBOSA, Júnia Oliveira. Avaliação dos efeitos de *Streptococcus mutans* sobre formação de biofilme e morfogênese de *Candida albicans* in vitro e estudo experimental em *Galleria mellonella*. 2014.

BOMAN, Hans G.; HULTMARK, Dan. Cell-free immunity in insects. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 103-126, 1987..

BRENNAN, Marc *et al.* Correlação entre a virulência de mutantes de *Candida albicans* em camundongos e larvas de *Galleria mellonella*. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 34, n. 2, pág. 153-157, 2002.

BRIGHENTI, Deodoro Magno *et al.* Eficiência do *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Berliner, 1915) no controle da traça da cera *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758)(Lepidoptera: Pyralidae). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 1, p. 60-68, 2005.

BROWNE, Niall; HEELAN, Michelle; KAVANAGH, Kevin. An analysis of the structural and functional similarities of insect hemocytes and mammalian phagocytes. **Virulence**, v. 4, n. 7, p. 597-603, 2013.

CANTERI DE SOUZA, Patrícia *et al.* An invertebrate host to study fungal infections, mycotoxins and antifungal drugs: *Tenebrio molitor*. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 4, p. 125, 2018.

CARDOSO, Aline C. *et al.* Exigências térmicas de estágios imaturos de *Galleria mellonella* L.(Lepidoptera: Pyralidae). **Neotropical Entomology**, v. 36, n. 5, p. 657-661, 2007.

CHAMILOS, Georgios *et al.* Role of mini-host models in the study of medically important fungi. **The Lancet infectious diseases**, v. 7, n. 1, p. 42-55, 2007.

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

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

CYTRYŃSKA, Małgorzata *et al.* Detection of antibacterial polypeptide activity in situ after sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis. **Analytical biochemistry**, v. 299, n. 2, p. 274-276, 2001.

CYTRYŃSKA, Małgorzata *et al.* Purificação e caracterização de oito peptídeos da hemolinfa imune de *Galleria mellonella*. **peptídeos**, v. 28, n. 3, pág. 533-546, 2007.

DOKE, S. K.; DHAWALE, S. C. Alternatives to animal testing: a review. *Saudi Pharm J* 23: 223–229. 2015. Ellis JD, Graham JR, Mortensen A. Standard methods for wax moth research. *J of Apicult Res*. 2013 Nov;52(1):1-17.

FALLON, John; KELLY, Judy; KAVANAGH, Kevin. *Galleria mellonella* as a model for fungal pathogenicity testing. In: **Host-Fungus Interactions**. Humana Press, 2012. p. 469-485.

FERNANDES, Caroline Mota *et al.* A reliable assay to evaluate the virulence of *Aspergillus nidulans* using the alternative animal model *Galleria mellonella* (Lepidoptera). **Bio. Protocol**, v. 7, p. e2329, 2017..

FLEMING, Irma D. *et al.* Modeling *Acinetobacter baumannii* wound infections: The critical role of iron. **The journal of trauma and acute care surgery**, v. 82, n. 3, p. 557, 2017.

FUCHS, B. B. *et al.* Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. *Virulence* 1: 475–482. 2010.

GARCIA-CUESTA, Carla; SARRION-PÉREZ, Maria-Gracia; BAGÁN, Jose V. Current treatment of oral candidiasis: A literature review. **Journal of Clinical and Experimental dentistry**, v. 6, n. 5, p. e576, 2014.

GILLESPIE AND, Jeremy P.; KANOST, Michael R.; TRENCZEK, Tina. Biological mediators of insect immunity. **Annual review of entomology**, v. 42, n. 1, p. 611-643, 1997.

GUERRA, M. de S. **Bionomia das traças da cera *Galleria mellonella* L. e *Achroia grisella* f.(Lepidoptera-galleriidae) no Município de Piracicaba, São Paulo.** 1973.

HARDING, Clare R. *et al.* Use of *Galleria mellonella* as a model organism to study *Legionella pneumophila* infection. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 81, p. e50964, 2013.

HENDRIKSEN, Coenraad FM. Replacement, reduction and refinement alternatives to animal use in vaccine potency measurement. **Expert review of vaccines**, v. 8, n. 3, p. 313-322, 2009.

HOHL, Tobias M. Overview of vertebrate animal models of fungal infection. **Journal of immunological methods**, v. 410, p. 100-112, 2014.

Husain S, Wagener MM, Singh N. *Cryptococcus neoformans* infection in organ transplant recipients: variables influencing clinical characteristics and outcome. *Emerg Infect Dis.* 2001;7(3):375-381. doi:10.3201/eid0703.010302

I VILLAS, Mar Irida Lloret. El ciclo biológico de la polilla grande de la cera.

JEMEL, Sana *et al.* *Galleria mellonella* for the Evaluation of Antifungal Efficacy against Medically Important Fungi, a Narrative Review. **Microorganisms**, v. 8, n. 3, p. 390, 2020..

JORJÃO, Adeline L. *et al.* From moths to caterpillars: Ideal conditions for *Galleria mellonella* rearing for in vivo microbiological studies. **Virulence**, v. 9, n. 1, p. 383-389, 2018.

JORJÃO, Adeline Lacerda. Metodologia da criação de *Galleria mellonella* para uso como modelo de infecção e efeitos de *Lactobacillus rhamnosus* inativado pelo calor in vivo e in vitro, desafiados por *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. 2016.

KAPLAN, Edward L.; MEIER, Paul. Nonparametric estimation from incomplete observations. **Journal of the American statistical association**, v. 53, n. 282, p. 457-481, 1958..

KAVANAGH, Kevin; REEVES, Emer P. Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens. **FEMS microbiology reviews**, v. 28, n. 1, p. 101-112, 2004.

KRAMS, Indrikis *et al.* Effects of food quality on trade-offs among growth, immunity and survival in the greater wax moth *Galleria mellonella*. **Insect science**, v. 22, n. 3, p. 431-439, 2015.

LEE, Y. S. *et al.* Purification, cDNA cloning and expression of an insect defensin from the great wax moth, *Galleria mellonella*. **Insect molecular biology**, v. 13, n. 1, p. 65-72, 2004.

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

MEAD, Graham P.; RATCLIFFE, Norman A.; RENWRANTZ, Lothar R. The separation of insect haemocyte types on Percoll gradients; methodology and problems. **Journal of Insect Physiology**, v. 32, n. 2, p. 167-177, 1986.

MICHAUX, Charlotte *et al.* Cold-shock RNA-binding protein CspR is also exposed to the surface of *Enterococcus faecalis*. **Microbiology**, v. 159, n. Pt_10, p. 2153-2161, 2013.

MORELO, Natáli; TRENTIN, Danielle. *Galleria mellonella*: um hospedeiro experimental alternativo para estudos de infecções por bactérias gram-positivas. *Revista Liberato*, Novo Hamburgo, v. 17, n. 28, p. 119-252, jul./dez. 2016..

MYLONAKIS, Eleftherios *et al.* *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. **Infection and immunity**, v. 73, n. 7, p. 3842-3850, 2005.

NOMURA, Erico; CHAUD-NETTO, José; GOBBI, Nivar. Efeito da dieta no ciclo biológico das lagartas das traças-da-cera *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758)(Lepidoptera, Pyralidae) e *Achroia grisella* (Fabricius, 1754)(Lepidoptera, Pyralidae). **Revista Brasileira de Zootecias**, v. 8, n. 1, 2006..

PADDOCK, Floyd B. **The beemoth or waxworm**. Texas Agricultural Experiment Stations, 1918.

PARRA, José Roberto Postali. **Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico**. ESALQ/FEALQ, 2001.

PEREIRA, Thais Cristine *et al.* Recent advances in the use of *Galleria mellonella* model to study immune responses against human pathogens. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 4, p. 128, 2018.

PRICE, C. D.; RATCLIFFE, NA. A reappraisal of insect haemocyte classification by the examination of blood from fifteen insect orders. **Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie**, v. 147, n. 4, p. 537-549, 1974.

PUPPIN, Daniele de Godoy Penteado Bragado *et al.* Ação antifúngica e toxicidade do óleo essencial de *Elionurus muticus* (Capim-limão brasileiro). 2018.

RAMARAO, Nalini; NIELSEN-LEROUX, Christina; LERECLUS, Didier. The insect *Galleria mellonella* as a powerful infection model to investigate bacterial

pathogenesis. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 70, p. e4392, 2012..

RITSKES-HOITINGA, Merel; VAN LUIJK, Judith. How Can Systematic Reviews Teach Us More about the Implementation of the 3Rs and Animal Welfare?. **Animals**, v. 9, n. 12, p. 1163, 2019.

SALAMITOU, S. *et al.* The plcR regulon is involved in the opportunistic properties of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* in mice and insects. **Microbiology**, v. 146, n. 11, p. 2825-2832, 2000.

SANTOS, Thaís Aguiar *et al.* *Galleria mellonella* as an experimental model for studying periodontopathogens. **Journal of Indian Society of Periodontology**, v. 24, n. 6, p. 593, 2020.

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

SCULLY, Lisa R.; BIDOCHKA, Michael J. Serial passage of the opportunistic pathogen *Aspergillus flavus* through an insect host yields decreased saprobic capacity. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 185-189, 2005.

SILVA, Diego Romário *et al.* *Anadenanthera Colubrina* vell Brenan: Anti-*Candida* and antibiofilm activities, toxicity and therapeutical action. **Brazilian oral research**, v. 33, 2019.

SINGKUM, Pantira *et al.* A powerful in vivo alternative model in scientific research: *Galleria mellonella*. **Acta microbiologica et immunologica Hungarica**, v. 66, n. 1, p. 31-55, 2019.

SOLBIATI, Jose *et al.* Virulence of the Pathogen *Porphyromonas gingivalis* Is Controlled by the CRISPR-Cas Protein Cas3. **Msystems**, v. 5, n. 5, 2020.

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

TSAI, Catherine Jia-Yun; LOH, Jacelyn Mei San; PROFT, Thomas. Modelos de infecção por *Galleria mellonella* para o estudo de doenças bacterianas e para testes de drogas antimicrobianas. **Virulence**, v. 7, n. 3, p. 214-229, 2016.

TUCKER, Kenneth W. **Honey bee pests, predators, and diseases**. Cornell University Press, Ithaca, NY, 1978.

TZOU, Phoebe; DE GREGORIO, Ennio; LEMAITRE, Bruno. How *Drosophila* combats microbial infection: a model to study innate immunity and host-pathogen interactions. **Current opinion in microbiology**, v. 5, n. 1, p. 102-110, 2002.

VILELA, Simone FG *et al.* *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 inhibits biofilm formation by *C. albicans* and attenuates the experimental candidiasis in *Galleria mellonella*. **Virulence**, v. 6, n. 1, p. 29-39, 2015.

VODOVAR, Nicolas *et al.* *Drosophila*: a polyvalent model to decipher host-pathogen interactions. **Trends in microbiology**, v. 12, n. 5, p. 235-242, 2004.

WOJDA, Iwona. Immunity of the greater wax moth *Galleria mellonella*. **Insect science**, v. 24, n. 3, p. 342-357, 2017.