

DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO EXPERIMENTAL DE INFECÇÃO POR *CANDIDA ALBICANS* EM LARVAS DE *TENEBRIO MOLITOR*.

DEVELOPMENT OF AN EXPERIMENTAL MODEL OF *CANDIDA ALBICANS* INFECTION IN *TENEBRIO MOLITOR* LARVAE.

Isadora Borges Magalhães¹
Rodrigo Scaliante de Moura²

Resumo

Este subprojeto tem como objetivo criar um modelo experimental de infecção pelo fungo *Candida albicans* em larvas de *Tenebrio molitor*. Trata-se de um estudo quantitativo experimental realizado no laboratório de microbiologia da Universidade Evangélica de Goiás – UniEVANGÉLICA. As larvas foram selecionadas e divididas em 3 grupos com 15 larvas cada sendo um grupo (1) controle; (2) *Candida* sem tratamento; e (3) *Candida* com tratamento. Cada grupo foi alojado em um béquer com a identificação adequada e contendo substrato. O grupo 1 recebeu 5 µL de PBS estéril, o grupo 2 foi inoculado com a concentração de 5×10^5 UFC de *C. albicans* e o grupo 3 foi inoculado com a mesma concentração de fungos, e ainda recebeu Fluconazol a 16mg/kg. A concentração do fungo foi obtida por meio da contagem em Câmara de Neubauer e a inoculação foi realizada com microseringa Hamilton de 25µL. Após a infecção foram realizadas contagens sucessivas para determinar a mortalidade de cada grupo das larvas. Os resultados dos experimentos mostraram maior mortalidade no grupo infectado com *C. albicans* que recebeu tratamento com fluconazol, seguido pelo grupo infectado que não recebeu o tratamento, e menor mortalidade no grupo controle. Portanto, novos experimentos ainda serão necessários para se ajustar a dosagem correta do fungo infectante e a medicação utilizada para resgate das larvas infectadas.

Palavras-Chave: *Candida albicans*. Modelo experimental. *Tenebrio molitor*.

1. Introdução

O uso de insetos como modelo experimental apresenta vantagens éticas, logísticas e econômicas em comparação ao uso de outros animais como roedores e coelhos (Trevijano-Contador & Zaragoza, 2014). Além de não haver restrições éticas no uso de insetos, o custo de cultivo é menor, se comparado a roedores e outros vertebrados, não requerendo laboratórios sofisticados ou mão de obra especializada. O ciclo biológico é rápido, permitindo experimentos em larga escala em períodos curtos. O *T. molitor* apresenta certas vantagens diante de outros modelos alternativos, como a possibilidade de ser incubado a 37 °C, temperatura que para muitos patógenos é crítica para a expressão de fatores de virulência e ampla disponibilidade comercial (CANTERI DE SOUZA, CUSTÓDIO CALONI, et al., 2018, DE SOUZA, MOREY, et al., 2015, LI, DENG, et al., 2013, WILSON-SANDERS, 2011; DESALERMOS, FUCHS, et al., 2012).

¹ Discente do curso de medicina da Universidade Evangélica de Goiás - UniEVANGÉLICA, Brasil. isabmagalhaes22@gmail.com

² Professor doutor do curso de medicina da Universidade Evangélica de Goiás - UniEVANGÉLICA, Brasil. rodrigoscaliante@gmail.com

2. Objetivo

Criar um modelo experimental de infecção pelo fungo *Candida albicans* em larvas *Tenebrio molitor*.

3. Método

Trata-se de um estudo quantitativo experimental realizado no laboratório de microbiologia da Universidade Evangélica de Goiás – UniEVANGÉLICA. Larvas foram agrupadas em 3 grupos diferentes, sendo o grupo (1) Controle; (2) infectado com *Candida* sem tratamento e; (3) *Candida* com tratamento. Foram infectadas 15 larvas em cada grupo estudado, sendo que cada uma recebeu 5µl da suspensão fúngica na concentração de 5×10^5 UFC de *C. albicans* ou PBS no grupo controle. O grupo 3 recebeu ainda 5 µL de Fluconazol a 16mg/kg. Os grupos 1 e 2 ainda receberam 5 µL de PBS estéril. Cada grupo foi alojado em um béquer com a identificação adequada e contendo substrato. A concentração do fungo foi obtida por meio da contagem em Câmara de Neubauer e a inoculação foi realizada por microseringa Hamilton de 25µL, a fim de melhorar a precisão. Após a infecção foram realizadas contagens sucessivas para determinar a mortalidade de cada grupo das larvas.

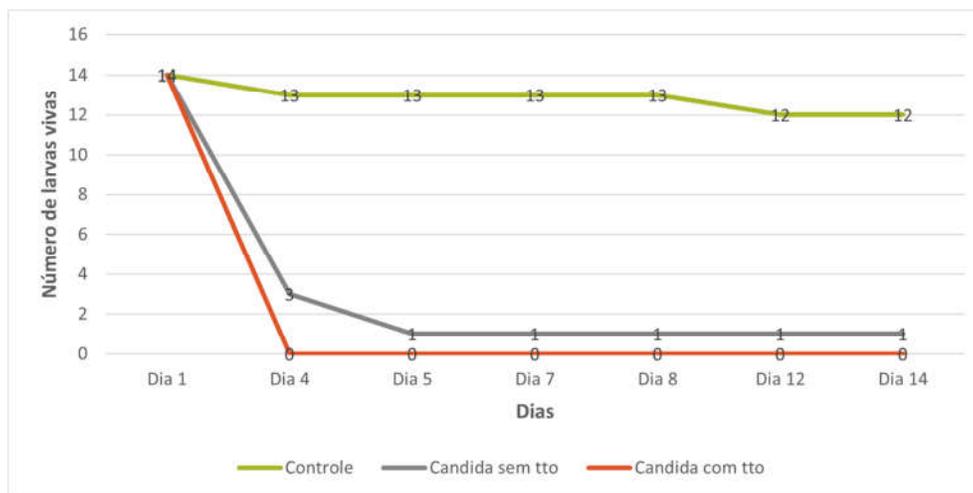
4. Resultados

No primeiro experimento realizado o grupo 3 paradoxalmente foi o que apresentou maior mortalidade. Neste experimento uma seringa de insulina de 100 UI foi utilizada e o grupo 3 foi o único que recebeu 2 injeções. Nos experimentos seguintes foi padronizado inocular os demais grupos com uma injeção de PBS estéril para eliminar este viés. Além disso, a seringa de insulina foi substituída por uma microseringa Hamilton de 25µL com o objetivo de evitar dano às larvas e superdosagens.

Após repetidos experimentos, a mortalidade dos grupos infectados permanecia semelhante ao grupo controle, sugerindo que a dose infectante talvez não estivesse suficiente. Conforme a literatura demonstrou, realmente a dose de 5×10^5 UFC de *C. albicans* não é inteiramente tóxica para *T. molitor*.

No último experimento realizado, a concentração de fungos foi ajustada para 6×10^8 UFC conforme revisão da literatura e cada grupo contou com 14 larvas. O grupo controle apresentou a menor mortalidade, enquanto os grupos infectados com *Candida* apresentaram rápida mortalidade, sem que o grupo tratado pudesse ser recuperado.

Gráfico 1 – Mortandade no experimento final



Fonte: próprio autor

Legenda: tto: tratamento

5. Conclusão

A utilização de larvas de *Tenebrio molitor* como um modelo alternativo experimental para a infecção com *Candida albicans* se mostrou efetivo, sendo possível analisar a eficácia de medicamentos contra o fungo. Entretanto, novos experimentos ainda serão necessários para se ajustar a dosagem correta do fungo infectante e a medicação utilizada para resgate das larvas infectadas. Estes experimentos estão sendo realizados por equipes diferentes orientadas pelo Dr. Rodrigo Scaliante de Moura.

Referências

BENCHIMOL, J. L. **Manguinhos, do sonho à vida: a ciência na belle époque**. [S.l.], Casa de Oswaldo Cruz, Fiocruz, 1990. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?id=bsNfAAAAMAAJ>.

CANTERI DE SOUZA, P., CUSTÓDIO CALONI, C., WILSON, D., *et al.* "An Invertebrate Host to Study Fungal Infections, Mycotoxins and Antifungal Drugs: *Tenebrio molitor*", **Journal of Fungi**, v. 4, n. 4, p. 125, 12 nov. 2018. DOI: 10.3390/jof4040125. Disponível em: <http://www.mdpi.com/2309-608X/4/4/125>. Acesso em: 2 maio 2020.

DE SOUZA, P. C., MOREY, A. T., CASTANHEIRA, G. M., *et al.* "*Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) as an alternative host to study fungal infections", **Journal of Microbiological Methods**, v. 118, p. 182–186, 1 nov. 2015. DOI: 10.1016/J.MIMET.2015.10.004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701215300828>. Acesso em: 2 maio 2020.

DESALERMOS, A., FUCHS, B. B., MYLONAKIS, E. "Selecting an Invertebrate Model Host for the

Study of Fungal Pathogenesis", **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 2, 2012. DOI:

10.1371/JOURNAL.PPAT.1002451. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3271057/>. Acesso em: 2 maio 2020.

LI, D.-D., DENG, L., HU, G.-H., *et al.* "Using *Galleria mellonella*–*Candida albicans* Infection Model to Evaluate Antifungal Agents", **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 36, n. 9, p. 1482–1487, 2013. DOI: 10.1248/bpb.b13-00270. Disponível em: <http://jlc.jst.go.jp/DN/JST.JSTAGE/bpb/b13-00270?lang=en&from=CrossRef&type=abstract>. Acesso em: 2 maio 2020.

MANTEL, N. "Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration.", **Cancer Chemother Rep.**, v. 50, n. 3, p. 163–70, 1966.

OPPERT, B., DOWD, S. E., BOUFFARD, P., *et al.* "Transcriptome Profiling of the Intoxication Response of *Tenebrio molitor* Larvae to *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa Protoxin", **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, 2012. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0034624. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3338813/>. Acesso em: 2 maio 2020.

SUJEEWA C. PIYANKARAGE, †,‡, HRVOJE AUGUSTIN, ‡,§, YAEL GROSJEAN, ‡,§, *et al.*

"Hemolymph Amino Acid Analysis of Individual *Drosophila* Larvae", 2008. DOI: 10.1021/AC701785Z. Disponível em:

https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac701785z?casa_token=IORSn84b7RMAAAA%3AvHIMrhl0FWlyndbOloyiVygYr0zbX34oMj71I0wRPf3uHBAwnU4pr1-F8bla7q6-YD-QofNiO5vjzA8. Acesso em: 2 maio 2020.

TREVIJANO-CONTADOR, N., ZARAGOZA, O. "Expanding the use of alternative models to investigate novel aspects of immunity to microbial pathogens", **Virulence**, v. 5, n. 4, p. 454–456, 15 maio 2014. DOI: 10.4161/viru.28775. Disponível em:

<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/viru.28775>. Acesso em: 2 maio 2020.

WILSON-SANDERS, S. E. "Invertebrate Models for Biomedical Research, Testing, and Education", **ILAR Journal**, v. 52, n. 2, p. 126–152, 1 jan. 2011. DOI: 10.1093/ilar.52.2.126. Disponível em:

<https://academic.oup.com/ilarjournal/article-lookup/doi/10.1093/ilar.52.2.126>. Acesso em: 2 maio 2020.