

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

ARTHUR BANDEIRA DE MELLO GARCIA

**INFECÇÃO FÚNGICA EM *Drosophila melanogaster*: LEVANTAMENTO DE  
DADOS E ANÁLISE DE UMA NOVA METODOLOGIA**

ORIENTADORA: MARÍNDIA DEPRÁ  
COORIENTADOR: RÉGIS ZANETTE

Porto Alegre,  
2019.

Arthur Bandeira de Mello Garcia

**INFECÇÃO FÚNGICA EM *Drosophila melanogaster*: LEVANTAMENTO DE  
DADOS E ANÁLISE DE UMA NOVA METODOLOGIA**

Trabalho de Conclusão de curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas na Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maríndia Deprá

Coorientador: Prof. Dr. Régis Zanette

Porto Alegre,  
2019.

Arthur Bandeira de Mello Garcia

**INFECÇÃO FÚNGICA EM *Drosophila melanogaster*: LEVANTAMENTO DE DADOS E ANÁLISE DE UMA NOVA METODOLOGIA**

Trabalho de Conclusão de curso apresentado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas na Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Porto Alegre, 2019.

Banca examinadora:

---

Simone Merkel, Doutoranda em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica, UFRGS.  
E-mail: simerkel58@gmail.com

---

Vera Lucia Da Silva Valente Gaiesky, Professora Titular - Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UFRGS. E-mail: vera.gaiesky@ufrgs.br

## AGRADECIMENTOS

Meu primeiro agradecimento vai para a minha mãe, Neila, que sempre me apoiou em todas minhas decisões, me colocou para cima quando eu precisava e sonhou todos os meus sonhos junto comigo. Agradeço por ser sempre a melhor amiga que qualquer filho poderia ter. E a nossa família, mais conhecida como Fat Family – Dema, Joana, Júlia, Bel, Felipe, Neila e Júlio –, que me apoiaram sempre na escolha da minha profissão, mesmo sabendo que não iria ser nada fácil. E que sempre me fortaleceram para ser quem eu sou e chegar aonde eu cheguei. Meu agradecimento também vai para minha orientadora, Maríndia, e meu coorientador, Régis, que sempre encontraram um tempo para dar suporte ao meu trabalho, me dando muitas ideias e me auxiliando muito. Esse ano aprendi muito com eles e sempre vou carregar esse aprendizado. A todos os laboratórios que já tive prazer de frequentar, principalmente o Laboratório de Experimentação em Drosófila e seus integrantes, especialmente a Simone e o Régis com quem tive privilégio de ter convívio durante um tempo da minha graduação. Também ao Laboratório de Drosophila, o qual vou sempre levar com muito carinho na minha vida. Todos os integrantes do laboratório – Vera, Maríndia, Berenice, Helena, Dani, Marcos, Henrique, Anelise, Carol, Natasha, Thais, Rebeca, Vitor e Pâmela - sempre foram muito receptivos comigo desde o primeiro momento que entrei lá e queria agradecer de coração por todos os momentos de aprendizado, mas também por nossas conversas, almoços e festinhas do laboratório. A meus colegas de curso que estão vivenciando esse momento comigo. Minha namorada, Júlia, que atura minhas ansiedades com o fim do curso e que a ajuda dela está sendo determinante nessa etapa da minha vida. E por último, mas não menos importante, meus amigos que sempre estão sempre me motivando e apoiando minhas decisões. Agradeço por todos os momentos em que dei muita risada. Pelas muitas festas, muitas conversas e muito companheirismo durante todos os anos que convivo com eles.

## RESUMO

Mucormicose é uma infecção causada por fungos da ordem Mucorales, principalmente por *Rhizopus oryzae*, e afeta essencialmente indivíduos imunossuprimidos e/ou diabéticos, com altas taxas de mortalidade quando em infecção disseminada. *Candida albicans* é o fungo oportunista mais comum em humanos; *Aspergillus fumigatus* é uma espécie de fungo que tem como característica de sua patogênese a dispersão de conídios, aumentando sua virulência em diversos hospedeiros. Portanto, é importante ter estudos em animais modelos para entender completamente a diversidade da patogênese e a resposta imune contra infecções de diferentes espécies de fungos. Por outro lado, a cienciometria auxilia a decisão mais adequada na escolha de metodologias em diferentes áreas de pesquisa. Neste estudo realizamos um levantamento de dados sobre infecções fúngicas em *Drosophila melanogaster* e avaliamos uma nova metodologia para a infecção de dois fungos patogênicos – *A. fumigatus* e *C. albicans* – em *D. melanogaster*. O levantamento de dados foi realizado em dois acervos digitais - Web of Science e Elsevier Scopus - onde foram coletadas informações como: a) a metodologia e a concentração mais utilizadas em infecções por fungos utilizando *D. melanogaster* como animal modelo, b) a revista mais escolhida para a publicação de trabalhos; e, também, c) região geográfica que está sendo mais pesquisada. Quanto à metodologia testada nesse trabalho, esta consiste na imersão de embriões de *D. melanogaster* diretamente em uma placa de Petri contendo o inóculo de células de cada fungo estudado em uma concentração de  $10^7$  esporos/ml e  $10^8$  esporos/ml para *A. fumigatus* e *C. albicans*, respectivamente. Posteriormente, os embriões foram alocados em tubos de ensaio contendo meio de cultura apropriado para eclosão e desenvolvimento até o estágio adulto. A taxa de eclosão foi avaliada para validação da metodologia. Os resultados das análises nos bancos de dados demonstram que a metodologia aplicada na infecção por *Rhizopus* e *Candida* é padronizada, consistindo na injeção no tórax de mosca adulta, que foi utilizada em 100% e 90% dos artigos com *Rhizopus* e *Candida*, respectivamente. Quanto aos testes em laboratório, a metodologia aplicada para infecção em embriões por *C. albicans* e *A. fumigatus* não demonstrou diferenças no desenvolvimento de *D. melanogaster* comparando-se com o grupo controle. No entanto, mais estudos são necessários para validar a metodologia.

**Palavras-chave:** Cienciometria. Embrião. Infecção fúngica. *Drosophila melanogaster*.

## 1. LISTA DE FIGURAS E TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Revistas que publicaram sobre infecção fúngica de espécies do gênero <i>Candida</i> em <i>D. melanogaster</i> no período de 2004-2019.....	15
<b>Tabela 2.</b> Revistas que publicaram sobre infecção fúngica de espécies do gênero <i>Rhizopus</i> em <i>D. melanogaster</i> no período de 2004-2019.....	16
<b>Figura 1.</b> Método de infecção fúngica em embriões.....	12
<b>Figura 2.</b> Artigos publicados por ano utilizando a <i>D. melanogaster</i> como modelo de infecção fúngica de <i>Rhizopus oryzae</i> e <i>Candida albicans</i> .....	13
<b>Figura 3.</b> Artigos publicados por país do primeiro autor utilizando a <i>D. melanogaster</i> como modelo de infecção fúngica de <i>Rhizopus</i> e <i>Candida</i> .....	14
<b>Figura 4.</b> Estudos que utilizaram diferentes métodos para infecção de espécies do gênero <i>Candida</i> em <i>D. melanogaster</i> .....	17
<b>Figura 5.</b> Contagem de pupas. Desenvolvimento até a fase da pupa de embriões submetidos a infecção fúngica.....	19
<b>Figura 6.</b> Contagem de moscas adultas. Desenvolvimento até o 17º dia de embriões submetidos a infecção fúngica.....	19
<b>Figura 7.</b> Contagem de moscas adultas. Desenvolvimento até o 20º dia de embriões submetidos a infecção fúngica.....	20

# SUMÁRIO

1. LISTA DE FIGURAS E TABELAS _____	5
2. INTRODUÇÃO _____	7
2.1 <i>Rhizopus oryzae</i> _____	7
2.2 <i>Aspergillus fumigatus</i> _____	7
2.3 <i>Candida albicans</i> _____	8
2.4 <i>Drosophila melanogaster</i> como animal modelo _____	8
2.5 Cienciometria _____	9
2.6 Objetivos _____	9
3. MATERIAIS E MÉTODOS _____	10
3.1 Cienciometria _____	10
3.2 Experimentos com <i>Drosophila melanogaster</i> _____	10
3.2.1 Estoque de <i>D. melanogaster</i> _____	10
3.2.2 Crescimento de Fungos _____	10
3.2.3 Preparação do inóculo _____	11
3.2.4 Inoculação de fungos em embriões _____	11
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO _____	12
4.1 Cienciometria _____	12
4.1.1 Publicações relacionadas ao tema _____	12
4.1.2 Metodologia para infecção e concentração empregada _____	16
4.2 Infecção fúngica em embrião _____	17
5. REFERÊNCIAS _____	20

## 2. INTRODUÇÃO

### 2.1 – Mucormicose e *Rhizopus oryzae*

A mucormicose é uma infecção invasiva que afeta principalmente indivíduos imunossuprimidos e/ou diabéticos, porém, já foi relatada em pessoas imunocompetentes (CHAMILOS et al., 2008). Essa infecção é causada por fungos oportunistas da classe Zigomicetos, ordem Mucorales, principalmente por *Rhizopus* – gênero mais frequente encontrado na mucormicose. A reprodução assexuada da maioria das espécies dessa classe tem relevância para a patogênese, pois ela produz um vasto número de esporos. Sendo assim, aumenta a possibilidade de serem dispersos e, se caso forem inalados - que é o principal modo de infecção - poderá causar a mucormicose pulmonar, que contém alta taxa de mortalidade. Entretanto, a infecção disseminada carrega um maior risco de morte, com taxas de mortalidade de 76% e 96%, respectivamente (FARMAKIOTIS & KONTOYIANNIS, 2016; HASSAN & VOIGT, 2019; PETRIKKOS et al., 2012).

### 2.2 *Aspergillus fumigatus*

*Aspergillus* é um gênero de fungo abundante, com uma ampla dispersão em diferentes habitats, e pode ser patógeno para plantas e para animais (SAMSON et al., 2014). A patogênese dessa espécie é devido à inalação de conídios dispersos no ar, seguido do crescimento de hifas, principalmente nos tecidos pulmonares. Os conídios são estruturas geradas pela reprodução assexuada do indivíduo, que são resistentes a ambientes hostis por sua baixa atividade metabólica. *Aspergillus fumigatus* é um dos fungos oportunistas mais comuns, conjuntamente com *Candida albicans*, em infecções em pacientes imunossuprimidos, causando infecção essencialmente no pulmão (KRIJGSHELD et al., 2013; LAMARRE et al., 2008).



### **2.3 – *Candida albicans***

*Candida albicans* é um fungo, da ordem Cryptococcales, que pode ser encontrado na forma filamentosa ou como levedura. A transição de células de levedura para o crescimento de uma estrutura filamentosa – formação de pseudo-hifas e hifas - está relacionada com a patogênese por sua maior área de adesão nas células hospedeiras e subsequente à liberação de enzimas que contribuem com a invasão no hospedeiro (CALDERONE & FONZI, 2001; SUDBERY et al., 2004). Além disso, são formadores de biofilmes. Essa estratégia aumenta a eficácia de sobrevivência de células, podendo originar resistência a antifúngicos (GULATI & NOBILE, 2016). *C. albicans* é um organismo da microbiota de humanos, no entanto, é o fungo oportunista mais comum em infecção fúngica em humanos, encontrado em 70-90% de todas infecções invasivas em humanos, originando alta taxa de mortalidade em indivíduos de diferentes faixas etárias (CALDERONE, R., 2002; MCCARTY & PAPPAS, 2016; MONIKA et al, 2017; PFALLER & DIEKEMA, 2007). Mesmo sendo muito estudada, a patogênese e a interação com hospedeiro não são totalmente conhecidas.

### **2.4 – *Drosophila melanogaster* como animal modelo:**

A mosca *Drosophila melanogaster* é um modelo animal utilizado em diversas áreas de estudo; no entanto, os estudos genéticos foram os pioneiros, realizados por Thomas Morgan, no início do século XX. O ciclo de vida é curto – entre 8 a 12 dias para alcançar a fase adulta - e a prole é abundante, viabilizando estudos com número amostral elevado, aumentando a confiança dos resultados estatísticos obtidos (CHYB & GOMPEL, 2013).

Nos últimos anos, a drosófila vem sendo utilizada como modelo de doenças humanas, incluindo doenças crônicas como o Alzheimer (MOLONEY et al, 2010) e o diabetes Mellitus (ECKER et al., 2017), tal como para estudar a patogênese e a resposta imune contra fungos, por exemplo, usando *Beauveria bassiana* (LE BOURG et al., 2009), *Candida* spp. (CHAMILOS et al., 2006), *R. oryzae* (CHAMILOS et al., 2008) e *Aspergillus fumigatus* (AL-MALIKI et al., 2017).

A metodologia utilizada para a infecção fúngica em *D. melanogaster* é determinada pelo estágio do ciclo de vida que será testado. Sendo que diversas metodologias vêm sendo aplicadas e descritas na literatura.

## 2.5 - Cienciometria

A cienciometria é conhecida como a pesquisa quantitativa da produção científica e tem foco em um levantamento de dados quantitativos da ciência (HOOD & WILSON, 2001; SILUO & QINGLI, 2017). É importante para uma determinada área de pesquisa analisar: em qual região está sendo mais estudada; em qual período há pico de estudos publicados; e também a metodologia aplicada mais comum na pesquisa. A partir desse conhecimento, pesquisadores de determinada área de estudo podem optar por metodologias padronizadas e também para originar uma nova metodologia de estudo, como é o foco deste trabalho. Neste sentido, o primeiro passo desse trabalho foi fazer um levantamento de dados da literatura sobre infecção fúngica empregando o modelo drosófila, bem como determinar as metodologias mais utilizadas para isso. Posteriormente, esses dados foram empregados para o estabelecimento de uma nova metodologia para testar a infecção fúngica em embriões de drosófila.

## 2.6 - Objetivos

- Realizar análises cienciométricas, em dois acervos digitais, para levantamento de dados sobre infecções fúngicas utilizando *Drosophila melanogaster* como modelo de infecção; Testar uma metodologia para infecção de *A. fumigatus* e *C. albicans* em embriões de *D. melanogaster*.

## **3 – Materiais e Métodos**

### **3.1 Cienciometria:**

A literatura foi consultada no dia 17 de agosto de 2019, em dois acervos de biblioteca eletrônica: Web of Science ([www.webofknowledge.com](http://www.webofknowledge.com)) e Elsevier Scopus ([www.scopus.com](http://www.scopus.com)). Os dados foram consultados a partir da combinação das palavras “rhizopus” e “drosophila”, “candida” e “drosophila”; consultando as metodologias aplicadas ao gênero *Rhizopus* e *Candida*, respectivamente. A pesquisa foi filtrada para encontrar em títulos, palavras-chaves e resumos. Posteriormente, para selecionar somente trabalhos com infecção desses dois gêneros de fungos, a leitura do texto completo foi realizada.

Os dados coletados foram: a) a metodologia utilizada para infectar *D. melanogaster* com fungos; b) a concentração usada para a infecção; c) a revista na qual foi publicada; d) o ano da publicação e d) o país onde foi realizado o trabalho. Todos os dados foram agrupados em planilhas no Microsoft Excel.

### **3.2 Experimentos com *Drosophila melanogaster*:**

#### **3.2.1 Estoque de *D. melanogaster*:**

O estudo foi realizado com moscas do tipo selvagem (*wild-type*), da linhagem Oregon R. Estas estão alocadas em meio de cultura padrão contendo aveia, açúcar, água destilada, fermento biológico e ágar; em temperatura de 21°C em câmara de temperatura controlada, no Laboratório de *Drosophila* da UFRGS.

#### **3.2.2 Crescimento de Fungos:**

As espécies usadas foram *C. albicans*, linhagem ATCC 10231, e *A. fumigatus*, linhagem ATCC 16913. A linhagem de *Rhizopus oryzae* foi excluída do projeto, pois apresentou problemas de contaminação. *C. albicans* foi mantida para seu crescimento em ágar Sabouraud por 3 dias à 35 °C. Por outro lado, *A. fumigatus* foi alocado em ágar batata por 7 dias à 35 °C.

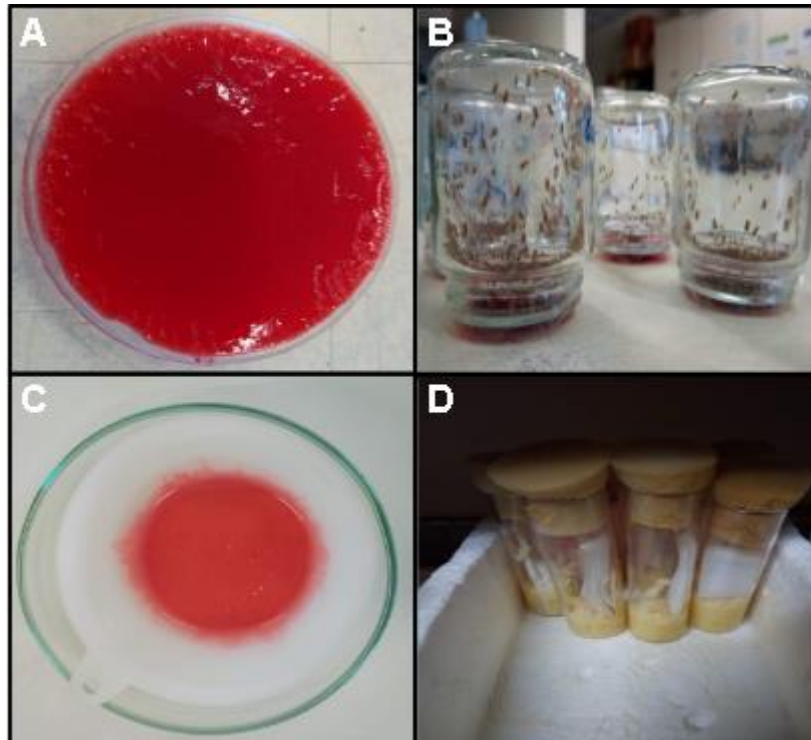
### 3.2.3 Preparação de inóculo:

O inóculo foi feito a partir de tampão fosfato-salina (PBS), em pH 7,4. Para preparar o inóculo, as células foram contadas utilizando câmara de Neubauer para alcançar a concentração de  $10^7$  esporos/mL e  $10^8$  esporos/mL para *A. fumigatus* e *C. Albicans* (CHAMILOS et al., 2008; LEMAITRE et al., 1996; STROCHEIN et al., 2006).

### 3.2.4 Infecção de embriões por fungos:

Para a coleta de ovos foi utilizado um meio para oviposição composto por água destilada, fermento, açúcar cristal, ágar, ácido propiônico e Ponceau - corante vermelho (Figura 1A). Estes dois últimos foram utilizados para estimular a oviposição e facilitar a visualização dos embriões, respectivamente. Moscas adultas foram colocadas no meio de oviposição durante 30 minutos. Os ovos desta primeira postura foram descartados para evitar a coleta de ovos anteriormente armazenados no ovipositor. Os embriões usados foram coletados na próxima postura (Figura 1B).

Após essa segunda postura, os embriões foram colocados em uma peneira, com auxílio de uma agulha histológica esterilizada, e imersos em uma solução de inóculo - 10ml em uma placa de Petri - de cada fungo por três minutos (Figura 1C). Posteriormente os embriões foram alocados em tubos de ensaio contendo meio de cultura apropriado para eclosão e desenvolvimento (Figura 1D). Foram utilizados três grupos experimentais: 1) onde os embriões foram imersos em tampão salino PBS (grupo controle), 2) onde os embriões foram imersos em um inóculo de *A. fumigatus* ( $10^7$  esporos/mL) e 3) onde os embriões foram imersos em um inóculo de *C. albicans* ( $10^8$  esporos/mL). Cada um desses grupos foi testado em sete frascos contendo vinte embriões em cada um deles. No total, foram 140 embriões testados por grupo experimental, sendo realizadas duas experimentações (280 embriões no total). O teste estatístico de ANOVA de uma via foi empregado para comparar se houve diferença estatisticamente significativa no desenvolvimento de embriões submetidos à infecção em relação ao grupo controle.



**Figura 1:** Método de infecção fúngica em embriões. **A.** Meio de oviposição **B.** Indivíduos adultos de *D. melanogaster* dispostos para oviposição. **C.** Imersão de embriões, com auxílio de uma peneira, em inóculo de fungo contido em uma placa de petri. **D.** Meio de cultura para o desenvolvimento dos embriões.

## 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

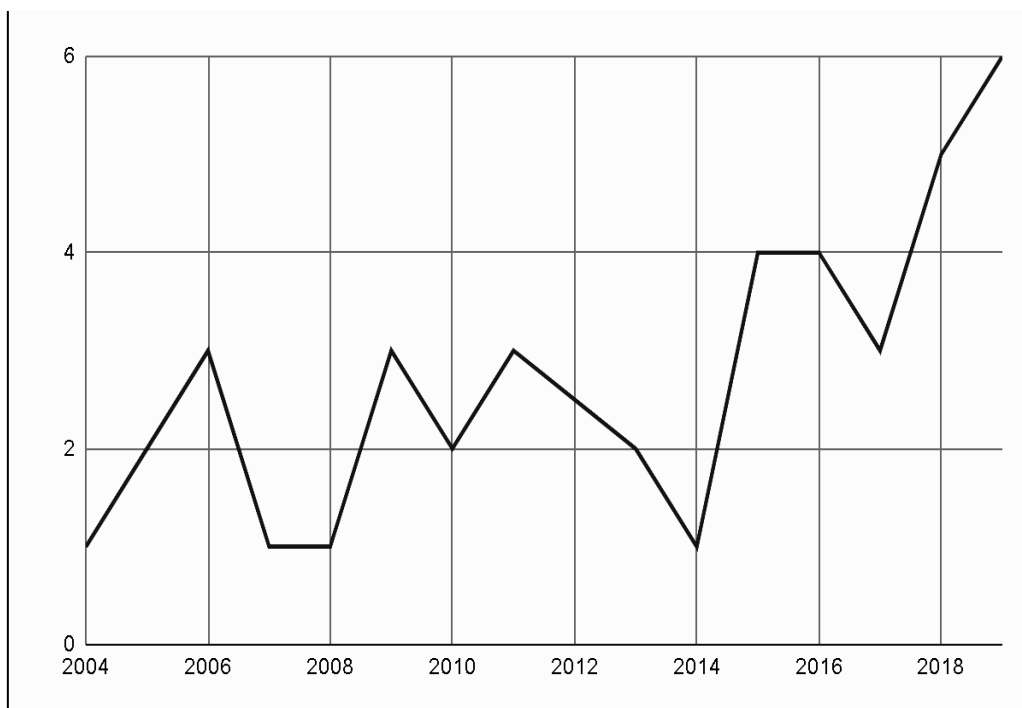
### 4.1 Ciênciometria

#### 4.1.1 Publicações relacionadas ao tema:

A busca na literatura resultou em 199 artigos científicos - 162 e 37 com a busca do gênero *Candida* e do gênero *Rhizopus*, respectivamente. Alguns artigos foram revisados com a leitura do texto completo para não incluir artigos que não se tratam de infecção de fungo. Ao mesmo tempo, foram excluídos artigos encontrados nos dois sistemas de busca para não serem adicionados duplicados. Ao final, foram elencados 39 artigos, 30 com o gênero *Candida* e nove com o gênero *Rhizopus*.

Desses artigos, os resultados demonstram que *Drosophila melanogaster* está cada vez mais sendo utilizada para o estudo de patogênese de fungos, pois no

período de 2015-2019 foram publicados 64,1% dos estudos encontrados (Figura 2). O primeiro estudo publicado foi no ano de 2004; no entanto, já se sabe que Lemaitre et al. 1996 é o pioneiro nessa área de pesquisa, obtendo resultados importantes para o entendimento de vias do processo de imunidade inata, que são conservados em diferentes espécies - inclusive em humanos. O emprego de *Drosophila* como organismo modelo para o estudo de doenças, também é algo recente. Embora o potencial da espécie como organismo modelo já venha de longa data, para a área médica ou da saúde, recentemente tem emergido como modelo de estudos toxicológicos, endócrinos e neurodegenerativos. A importância em utilizar a *D. melanogaster* nesses estudos é devido ao metabolismo da mosca ser análogo ao metabolismo de humanos em diversos aspectos como a secreção e a recaptação de hormônios, a desintoxicação celular e as vias de sinalização (ABOLAGI et al., 2013).

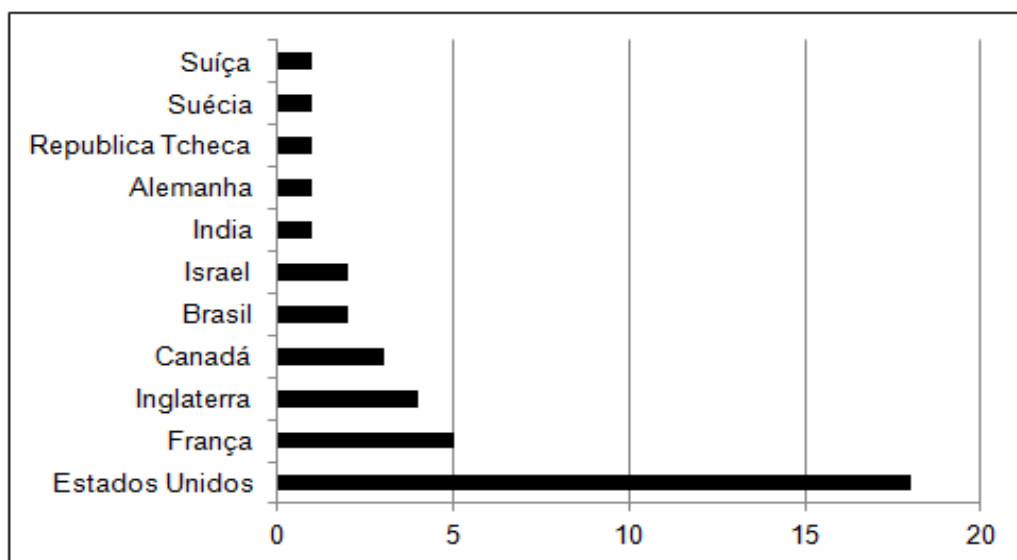


**Figura 2:** Artigos publicados por ano utilizando a *D. melanogaster* como modelo de infecção fúngica de *Rhizopus oryzae* e *Candida albicans*.

Há países que pesquisam mais nessa área, como os Estados Unidos (EUA), somando 18 estudos no total, aproximando-se da metade dos artigos revisados. França e Inglaterra vêm logo em seguida, com cinco e quatro artigos publicados, respectivamente (Figura 3). Os estudos utilizando o gênero *Candida* para infecção

mostra a prevalência dos EUA em produção nessa área totalizando 11 publicações. Os trabalhos com infecção de *Rhizopus* restringem-se a dois países, Estados Unidos e Israel, com sete e dois artigos publicados, respectivamente.

Esse predomínio de artigos publicados por pesquisadores dos Estados Unidos pode estar relacionado ao alto número de incidência de transplantes – 36 mil transplantes em 2018 (OPTN, 2018) -, além de ser o terceiro país com mais diabéticos, segundo a Federação Internacional de Diabetes (IDF). Infecções invasivas e oportunistas, como as desencadeadas predominantemente por fungos do gênero *Rhizopus* e com menor incidência do gênero *Candida*, são comuns em situações de transplantes e afetam principalmente pacientes que apresentam quadros de diabetes *Mellitus* (IBRAHIM et al., 2012; RODRIGUES, et al., 2019; SINGH, et al., 2012).



**Figura 3:** Artigos publicados por país do primeiro autor utilizando a *D. melanogaster* como modelo de infecção fúngica de *Rhizopus* e *Candida*.

Nos estudos que utilizaram a infecção espécies do gênero *Candida* não é demonstrado preferência na escolha da revista para a publicação, a maior parte dos artigos foram publicados em diferentes revistas. A *Plos Pathogens* e a *Disease Models & Mechanisms* somaram três artigos publicados em cada (Tabela 1). Por outro lado, trabalhos que utilizaram *Rhizopus* foram mais seletivos na escolha da

revista, a revista *Journal of Infectious Diseases* e a revista *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* atingiram três artigos publicados em cada (Tabela 2).

**Tabela 1:** Revistas que publicaram sobre infecção fúngica de espécies do gênero *Candida* em *D. melanogaster* no período de 2004-2019.

Revista	Artigo publicado	Porcentagem
Disease Models & Mechanisms	3	10 %
Plos Pathogens	3	10 %
Antimicrobial Agents and Chemotherapy	2	6,6 %
Journal of Immunology	2	6,6 %
Journal of Infection Diseases	2	6,6 %
Scientific Reports	2	6,6 %
Cell	1	3,3 %
Elife	1	3,3 %
European Journal of Immunology	1	3,3 %
Eukaryotic Cell	1	3,3 %
G3: Genes, Genomes, Genetics	1	3,3 %
Genetics	1	3,3 %
Immunity	1	3,3 %
International Journal of Medical Microbiology	1	3,3 %
International Journal of Pharmaceuticals Sciences and Research	1	3,3 %
Journal of Antimicrobial Chemotherapy	1	3,3 %
Journal of Biological Chemistry	1	3,3 %
Journal of Innate Immunity	1	3,3 %
Methods In Molecular Biology	1	3,3 %
Molecular Oral Microbiology	1	3,3 %
Mycoses	1	3,3 %
Plos One	1	3,3 %



**Tabela 2:** Revistas que publicaram sobre infecção fúngica de espécies do gênero *Rhizopus* em *D. melanogaster* no período de 2004-2019.

Revista	Artigo
Antimicrobial Agents and Chemotherapy	3
Journal of Infection Diseases	3
Journal of Antimicrobial Chemotherapy	1
Plos One	1
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America	1

#### 4.1.2 Metodologia para infecção e concentração empregada:

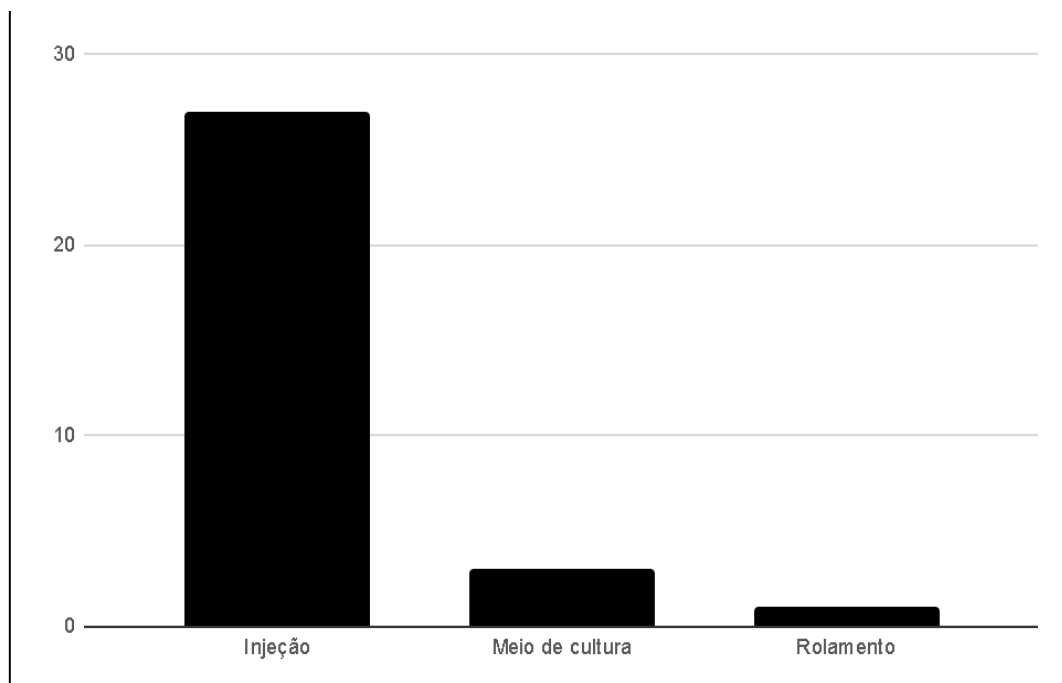
A análise da metodologia dos artigos encontrados demonstra que há preferência na escolha do método utilizado para infecção de *D. melanogaster*. Na infecção de *Rhizopus*, 100% dos artigos utilizaram o método de injeção de inóculos no tórax de moscas adultas; e, do mesmo modo, 90% dos estudos realizados com o gênero *Candida* usaram a mesma metodologia. O método de rolamento foi utilizado somente por um estudo de CAMEJO et al. (2017), já o método de inoculação no meio de cultura foi utilizado em três estudos (GLITTENBERG et al., 2011; KOUNATIDIS et al., 2018; YANG et al., 2018) (Figura 4).

A principal metodologia utilizada, como já foi citado, é por meio de injeção de uma agulha previamente mergulhada em solução com esporos de determinado fungo (CHAMILOS et al., 2008; LIONAKIS et al., 2005). O método de rolamento é baseado em revestir a superfície da mosca com conídios, podendo ser utilizada em espécies grandes produtoras de conídios, tais como do gênero *Aspergillus* (LIONAKIS & KONTOYIANNIS, 2010). Por outro lado, o método de inoculação no meio de cultura é embasado na injeção do inóculo de fungos do gênero *Candida* diretamente no meio de cultura. Trabalhos que utilizam esse método têm como objetivo infectar larvas, pois alimentam-se do inóculo contido no meio (KOUNATIDIS et al., 2018).

A concentração empregada para a infecção de *Rhizopus* é padronizada em inóculos mais concentrados - como  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  esporos/mL - que foram utilizados

em todos os estudos. Três trabalhos utilizaram mais de uma concentração, acrescentando inóculos menos concentrados, como  $10^4$  esporos/mL e  $10^5$  esporos/mL.

Alguns estudos - que usaram a infecção de *Candida* - não citaram a concentração utilizada, isto prejudicou a análise correta do levantamento de concentrações utilizadas em infecções deste gênero. Entretanto, 73% dos estudos continham essa informação, e o inóculo mais utilizado foi a concentração de  $10^8$  esporos/mL, usado em 27% desses. Em contraponto, 40% dos estudos empregaram concentrações consideradas baixas -  $10^2$ ,  $10^3$  e  $10^4$  esporos/mL. Estes estudos utilizam moscas Toll-deficientes, mutantes para o gene Toll, o qual sintetiza uma proteína receptora relacionada com a resposta imune contra fungos, drosomicina é o principal produto resultante da ativação do receptor Toll. Estas moscas são mais suscetíveis à infecção fúngica, por isso são injetadas com inóculo menos concentrado (ALARCO et al., 2004).



**Figura 4:** Estudos que utilizaram diferentes métodos para infecção de espécies do gênero *Candida* em *D. melanogaster*.

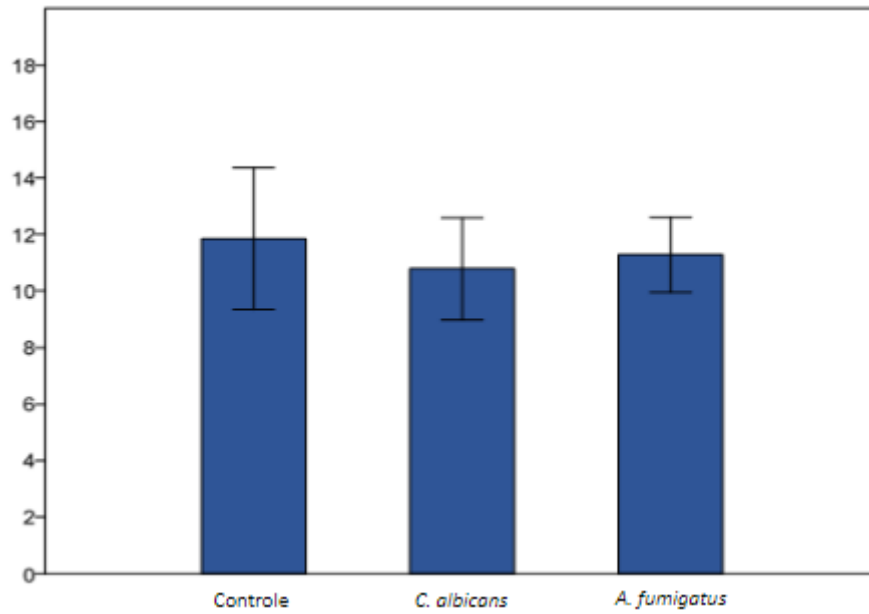
## 4.2 Infecção fúngica em embrião:

A partir dos dados obtidos por cienciometria foi possível observar que a aplicação da infecção por fungos em *D. melanogaster* é padronizada por injeção no tórax em moscas adultas. Por outro lado, larvas são infectadas pela sua alimentação. No entanto, não há registro de metodologia empregando diretamente embriões. Em função disso, um novo método de infecção baseado na imersão de embriões foi testado. Não apenas para validar uma nova metodologia, mas também por ser mais prático do que o método de injeção e não carecer de muita prática para realização da mesma.

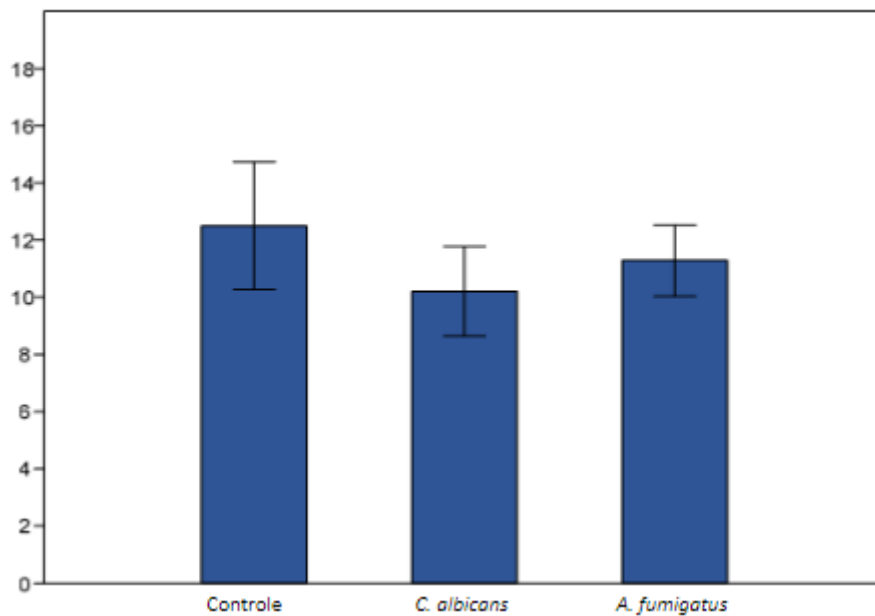
Dos 20 embriões acondicionados em cada um dos 7 frascos, o desenvolvimento foi acompanhado por inspeção visual diariamente. No 10º dia, foi realizada a contagem de pupas. A contagem de pupas desenvolvidas até o 10º dia indicou que não houve efeito do contato do patógeno com o embrião no seu desenvolvimento até a fase da pupa, resultando em 166 pupas desenvolvidas no grupo controle, 151 no grupo testado com *C. albicans* e 158 pupas desenvolvidas no grupo testado com *A. fumigatus*. (Figura 5).

A soma de moscas adultas no 17º dia foi semelhante à contagem anterior. Foram contadas 175, 143 e 158 moscas adultas do grupo controle, *C. albicans*, *A. fumigatus*, respectivamente (Figura 6). Essa contagem incluiu tanto moscas vivas quanto moscas mortas, pois o objetivo desta contagem foi avaliar o efeito da infecção fúngica no desenvolvimento e eclosão até a fase adulta. No 20º dia, com a finalidade de analisar a morte prévia causada pelo contato com o patógeno, a avaliação foi similar aos resultados previamente citados (Figura 7).

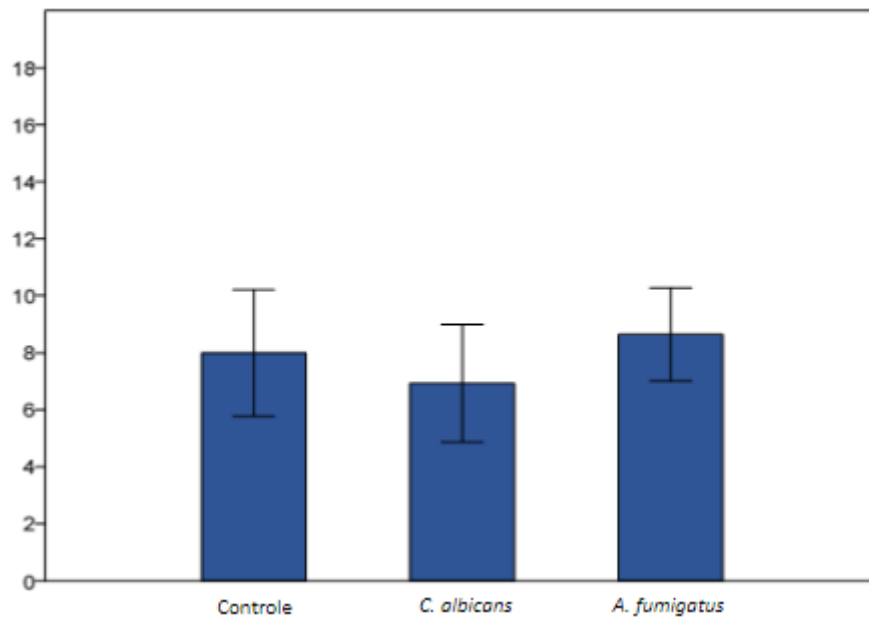
A metodologia aplicada para infecção de *C. albicans* e *A. fumigatus* em embriões não demonstrou diferenças no desenvolvimento até a fase pupa e a eclosão da mesma comparando-se com o grupo controle. No entanto, não podemos concluir que não houve infecção nos embriões. Para validar a metodologia mais processos serão necessários, como técnicas moleculares - PCR e ELISA -, histológicas ou microbiológicas - crescimento microbiano. A validação da metodologia de infecção fúngica em embriões de *D. melanogaster* é importante para futuros estudos na investigação para melhor compreensão de efeitos de uma infecção causada por fungos no desenvolvimento de embriões.



**Figura 5:** Contagem de pupas. Desenvolvimento até a fase da pupa de embriões submetidos a infecção fúngica. ANOVA de uma via ( $p$ -valor  $> 0,05$ ).



**Figura 6:** Contagem de moscas adultas. Desenvolvimento até o 17<sup>o</sup> dia de embriões submetidos a infecção fúngica. ANOVA de uma via ( $p$ -valor  $> 0,05$ ).



**Figura 7:** Contagem de moscas adultas. Desenvolvimento até o 20<sup>o</sup> dia de embriões submetidos a infecção fúngica. ANOVA de uma via (p-valor > 0,05).

A validação de uma metodologia de infecção fúngica em embriões, como essa mostrada nesse trabalho, é de grande importância para futuros trabalhos devido a sua acessível realização. Abre portas para estudos como efeitos da infecção fúngica no desenvolvimento de embriões; possíveis tratamentos alternativos - como proteínas de choque térmico, que estão sendo alvo de pesquisa pelo seu possível efeito antifúngico (MAYER et al, 2013). Igualmente pode ampliar o conhecimento sobre tratamentos de primeira escolha para infecções com fungos, e, por final, é importante para a integração de diferentes áreas de pesquisa - como a genética e a farmacologia -, podendo entender não só efeitos da infecção fúngica em nível molecular, identificando possíveis genes relacionados com resposta imune contra fungos, mas também genes de resistência a fármacos antifúngicos em *D. melanogaster*.

## 5. REFERÊNCIAS

ABOLAGI, A., KANDEM, JP., FAROMBI, A., ROCHA, JB. *Drosophila melanogaster* as a Promising Model Organism in Toxicological Studies: A Mini Review. *Archives of Basic and Applied Medicine*. v. 1, n. 6, p. 33-38, 2013.

ALARCO, A., MARCIL, A., CHEN, J., SUTER, B., THOMAS, D., WHITEWAY, M. Immune-Deficient *Drosophila melanogaster*: A Model for the Innate Immune Response to Human Fungal Pathogens. *The Journal of Immunology*. v. 172, n. 9, p. 5622-5630, 2004.

AL-MALIKI, H., MARTINEZ, S., PISZCZATOWSKI, P., BENNETT, J. *Drosophila melanogaster* as a model for studying *Aspergillus fumigatus*. v. 45, n. 6, p. 233-239, 2017.

CALDERONE, R. *Candida* and Candidiasis. *Emerging Infectious Diseases*. V, 8, n. 8, p. 876-884, 2002.

CALDERONE, R & FONZI, W. Virulence factors of *Candida albicans*. *CellPress*. v. 9, n. 8, p. 327-335, 2001.

CAMEJO, L., GARCIA-ALICEA, M., MALDONADO, G., BAYMAN, P. Probiotics may protect *Drosophila* from infection by *Aspergillus flavus*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. v. 8, n. 8, p. 1624-1632, 2017.

CHAMILOS, G., LIONAKIS, M., LEWIS, R., LOPEZ-RIBOT, J., SAVILLE, S., ALBERT, N., HALDER, G., KONTOYIANNIS, D. *Drosophila melanogaster* as a facile model for large-scale studies of virulence mechanisms and antifungal drug efficacy in *Candida* species. *The Journal of Infectious Diseases*. v. 193, p. 7, n. 1014-1022, 2006.

CHAMILOS, G., LEWIS, R., HU, J., XIAO, L., ZAL, T., GILLIET, M., HALDER, G., KONTOYIANNIS, P. *Drosophila melanogaster* as a model host to dissect the immunopathogenesis of zygomycosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 105 (27), 2008.

CHYB, S. & GOMPEL, N. Atlas of *Drosophila* Morphology: Wild-type and classical mutants. Oxford, UK: Academic Press, 2013.

ECKER A., GONZAGA, T., SEEGER, R., DOS SANTOS, M., LORETO, J., BOLIGON, A., MEINERZ, D., LUGOKENSKI, T., DA ROCHA, J., BARBOSA, N. High-sucrose diet induces diabetic-like phenotypes and oxidative stress in *Drosophila melanogaster*: Protective role of *Syzygium cumini* and *Bauhinia forficata*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. v. 89, n. 11, p 605-616, 2017.

ELSEVIER SCOPUS. Página Inicial. Disponível em: < <https://www.scopus.com/home.uri> > Acesso em: 17 de Agosto de 2019.

FARMAKIOTIS, D. & KONTOYIANNIS, D. Mucormycoses. *Infectious Disease Clinics of North America*. v. 30, n. 1, p. 143-163, 2016.

GLITTENBER, M., KOUNATIDIS. I., CHRISTENSEN, D., KOSTOV, M., KIMBER, S., ROBERTS, I., LIGOXYGAKIS, P. Pathogen and host factors are needed to provoke a systemic host response to gastrointestinal infection of *Drosophila* larvae by *Candida albicans*. *Disease models & mechanisms*. v. 4, n. 10, p. 515-525, 2011.

GULATI, M. & NOBILE, C. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes and infection*. v. 18, n. 21, p 310-321, 2016.

HASSAN. M., VOIGT, K. Pathogenicity patterns of mucormycosis: epidemiology, interaction with immune cells and virulence factors. *Medical Mycology*. v. 57, n. 11, p. 245–256, 2019.

HOOD, W. W.; WILSON, C. S. The Literature of Bibliometrics, Scientometrics, and Informetrics. *Scientometrics*. v. 52, n. 2, p. 291, 1 out. 2001.

IBRAHIM, A., SPELLBERG, B., WALSH, T., KONTOYIANNIS, D. Pathogenesis of Mucormycosis. *Clinical Infectious Diseases*. v. 54, n. 7, p 16-22, 2012.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. Demographic and geographic outline. <<https://www.diabetesatlas.org/en/sections/demographic-and-geographic-outline.html> > Acesso em: 30 de novembro, 2019.

KOUNATIDIS, I., AMES, L., MISTRY, R., HO, HL., HAYNES, K., LIGOXYGAKIS, P. A Host-Pathogen Interaction Screen Identifies *ada2* as a Mediator of *Candida glabrata* Defenses Against Reactive Oxygen Species. *G3: Genes, Genomes, Genetics*. v. 8, n. 10, p. 1637-1647, 2018.

LAMARRE, C., SOKOL, S., DEBEAUPUIS, J., HENRY, C., LACROIX, C., G LASER, P., COPPEE, J., FRANÇOIS, J., LATGÉ, J. Transcriptomic analysis of the exit from dormancy of *Aspergillus fumigatus* conidia. *BMC Genomics*. v. 9, 2008.

LE BOURG, E., MASSOU, E., GOBERT, V. Cold stress increases resistance to fungal infection throughout life in *Drosophila melanogaster*. *Biogerontology*. 10, 2009.

LEMAITRE, B., NICOLAS, E., MICHAUT, L., REICHHART, J.M., HOFFMAN, J. The Dorsoventral Regulatory Gene Cassette *spätzle/Toll/cactus* Controls the Potent Antifungal Response in *Drosophila* Adults. *Cell*. v. 86, n. 6, p. 973-983, 1996.

LIONAKIS, M., LEWIS, M., MAY, G., WIEDERHOLD, N., ALBERT, N., HALDER, G., KONTOYIANNIS, D. *Toll*-deficient *Drosophila* flies as a fast, high-throughput model for the study of antifungal drug efficacy against invasive aspergillosis and *Aspergillus* virulence. *The Journal of Infectious Diseases*. v. 191, n. 7, p 1188–1195, 2005.



LIONAKIS, M. & KONTOYIANNIS, G. The growing promise of *Toll*-deficient *Drosophila melanogaster* as a model for studying *Aspergillus* pathogenesis and treatment. *Virulence*. v.1:6, n. 12, p.488-499, 2010.

MAYER, F., WILSON, D., HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*. v. 4, n. 9, p. 119-128, 2013.

MCCARTY, P. & PAPPA, P. Invasive Candidiasis. *Infectious disease clinics of North America*. v. 30, n. 21, p 102-124, 2016.

MOLONEY, A., SATTELLE, D., LOMAS, D., CROWTHER, D. Alzheimer's disease: insights from *Drosophila melanogaster* models. *Trends in Biochemical Sciences*. v. 35, n. 9, p. 225-234, 2010.

MONIKA, S., MALGORZATA, B., ZBIGNIEW, O. Contribution of Aspartic Proteases in *Candida* Virulence. Protease Inhibitors against *Candida* Infections. *Current Protein & Peptide Science*. v. 18, n. 10, p. 1050-1062, 2017.

ORGAN PROCUREMENT AND TRANSPLANTATION NETWORK. Organ transplants in United States set sixth consecutive record in 2018. <<https://optn.transplant.hrsa.gov/news/organ-transplants-in-united-states-set-sixth-consecutive-record-in-2018/>> Acesso em: 30 de Novembro, 2019.

PETRIKKOS, G., SKIADA, A., LORTHOLARY, O., ROILIDES, E., WALSH, T., KONTOYIANNIS, D. Epidemiology and Clinical Manifestations of Mucormycosis. *Clinical Infectious Diseases*. v. 54, n. 1, p. 23–34, 2012.

KRIJGSHELD, P., BLEICHRODT, R., VAN VELUW, G., WANG, F., MULLER, W., DIJKSTERHUIS, J., WOSTEN, H. Development in *Aspergillus*. *Studies in mycology*. v. 74, n. 29 , p. 1-29 , 2013.

PFALLER, M & DIEKEMA, D. Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. *Clinical Microbiology Reviews*. v. 20 (1), n. 31, p. 133-163, 2007.

RODRIGUES, C., RODRIGUES, ME., HENRIQUES, M. *Candida* sp. Infections in Patients with Diabetes Mellitus. *Journal of Clinical Medicine*. v. 8, 2019.

SAMSOM, R., VISAGEA, C., HOUBRAKEN, J., HONG, S., HUBKA, V., KLAASSEN, C., PERRONE, G., SEIFERT, K., SUSCA, A., TANNEY, J., VARGA, J., KOCSUBE, S., SZIGETI, G., YAGUCHI, T., FRISVAD., J. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Micology*. v. 78, n. 34, p. 141-173, 2014.

SILUO, Y. & QINGLI, Y. Are Scientometrics, Informetrics, and Bibliometrics different?. *Conference: the 16th International Conference on Scientometrics & Infometrics*. (ISSI2017).

SINGH, N., HUPRIKAR, S., BURDETTE, S., MORRIS, M., BLAIR, J., WHEAT, L., THE AMERICAN SOCIETY OF TRANSPLANTATION, INFECTIOUS DISEASES COMMUNITY OF PRACTICE, DONOR-DERIVED FUNGAL INFECTION WORKING GROUP. Donor Derived Fungal Infections in Organ Transplant Recipients: Guidelines of the American Society of Transplantation, Infectious Diseases Community of Practice. *American Journal of Transplantation*. v. 12, n. 14, p. 2414-2428, 2012.

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

WEB OF KNOWLEDGE. Página Inicial. Disponível em: < [www.webofknowledge.com](http://www.webofknowledge.com) > Acesso em: 17 de Agosto de 2019.

YANG, C., SCOFFIELD, J., DEIVANAYAGAM, C., ZOU, J., WU, H. Antigen I/II mediates interactions between *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. *Molecular oral microbiology*. v. 33, n. 8, p. 283-291 , 2018.