



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

ADELINA LACERDA JORJÃO

**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

ADELINE LACERDA JORJÃO

**METODODOLOGIA 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***

Tese apresentada ao curso de Odontologia do Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP – Univ Estadual Paulista, Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área de Microbiologia e Imunologia.

Orientadora: Profa. Dra. Luciane Dias de Oliveira

São José dos Campos

2016

Apresentação gráfica e normatização de acordo com:
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para
Normalização de Trabalhos Acadêmicos do ICT. Rev. São José dos
Campos: ICT/UNESP; 2016.

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*. / Adeline Lacerda Jorjão. - São José dos Campos
: [s.n.], 2016.
93 f. : il.

Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal) - Pós-graduação em
Biopatologia Bucal - Instituto de Ciência e Tecnologia de São José
dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista, 2016.
Orientador: Luciane Dias de Oliveira.

1. *Galleria mellonella*. 2. Macrófagos. 3. Citocinas. 4. Óxido
Nítrico. I. Oliveira, Luciane Dias de, orient. II. Instituto de
Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual
Paulista. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita
Filho'. IV. UNESP - Univ Estadual Paulista. V. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Achille Bassi e Seção Técnica de Informática,
ICMC/USP com adaptações - STATi e STI do ICT/UNESP. Dados fornecidos pelo autor.

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer
meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, 20 de janeiro de 2016
E-mail: adelinejorjao@gmail.com

Assinatura: _____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Luciane Dias de Oliveira (Orientadora)

Instituto de Ciências e Tecnologia
UNESP – Univ Estadual Paulista
Campus de São José dos Campos

Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge

Instituto de Ciências e Tecnologia
UNESP – Univ Estadual Paulista
Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Mariella Vieira Pereira Leão

Instituto Básico de Biociências
UNITAU – Universidade de Taubaté

Profa. Dra. Juliana Ferreira Strixino

Faculdade de Ciências da Saúde
UNIVAP – Universidade do Vale do Paraíba

Profa. Dra. Renata de Azevedo Canevari

Faculdade de Ciências da Saúde
UNIVAP – Universidade do Vale do Paraíba

São José dos Campos, 20 de Janeiro de 2016.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, **Maria Terezinha das Graças Jorjão e Arnaldo Jorjão**, irmãs, **Camila Lacerda Jorjão e Loureine Lacerda Jorjão**, e a toda minha família que, com muito carinho e apoio, me ajudaram para que eu chegasse até esta etapa da minha vida.

A Deus que me deu saúde e sabedoria para concluir a pesquisa e por colocar somente pessoas maravilhosas em meu convívio durante essa caminhada.

AGRADECIMENTOS

À UNESP - Univ Estadual Paulista, na pessoa do diretor do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, Prof. Dr. Estevao Tomomitsu Kimpara Tomomitsu;

Ao Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, na pessoa da coordenadora à Profa. Dra. Juliana Campos Junqueira, também pelo convívio agradável e oportunidade de desenvolver a criação da *Galleria mellonella*, confiando no meu trabalho;

A minha orientadora Profa. Dra. Luciane Dias de Oliveira, não tenho nem palavras para agradecer. Uma pessoa muito dedicada, carinhosa e de convivência super agradável. Tenho um carinho enorme por você, sempre que foi preciso estive ao meu lado em todos os anos de trabalho dentro da universidade e espero que continue por muitos anos. Obrigada pela paciência e ajuda para concluir este doutorado;

Ao Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge pelo convívio fraterno, atenção e disposição para ajudar sempre que precisei. Uma pessoa admirável, que sempre estive disposto a ajudar. Tenho como exemplo de profissional e professor;

Agradeço a Profa. Dra. Mariella Vieira Pereira Leão que sempre estive presente e pronta para ajudar nos momentos que

precisei, que me presenteou com sua linha de pesquisa e confiou no meu trabalho desde o mestrado. Pessoa maravilhosa e que admiro muito;

As professoras Juliana Ferreira Strixino e Renata de Azevedo Canevari por aceitarem o convite para participar da minha banca;

A CAPES pela concessão de bolsa;

Á minha amiga, Doutora pelo programa, Ana Paula de Lima, quem me indicou o programa e me incentivou a fazer o mestrado, me apresentando à vida acadêmica;

A todos meus colegas de laboratório, sempre dispostos a ajudar, os quais quero levar para a vida toda. Graças a Deus só encontrei pessoas maravilhosas em todos estes anos no programa e tenho certeza que nasceram amizades para a vida inteira;

Aos técnicos do laboratório de microbiologia, Sérgio Alves e Domingos, que sempre estiveram dispostos a me ajudar e por contribuírem para fluidez nos experimentos.

SUMÁRIO

RESUMO.....	09
ABSTRACT.....	11
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 <i>Galleria mellonella</i>	16
2.2 Probióticos.....	21
3 PROPOSIÇÃO.....	31
3.1 Objetivos gerais.....	31
3.2 Objetivos específicos.....	31
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1 Criação de <i>Galleria mellonella</i> com diferentes dietas.....	33
4.1.1 Susceptibilidade à infecção experimental (Curva de sobrevivência).....	36
4.2 Efeitos de <i>L. rhamnosus</i> inativado pelo calor na resposta de <i>G. mellonella</i> desafiada com <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i>	37
4.2.1 Cultivo e preparação das suspensões de <i>L. rhamnosus</i> (morto pelo calor), <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i>	37
4.2.2 Curva de sobrevivência.....	38
4.2.3 Coleta da hemolinfa.....	39
4.2.3.1 Contagem total dos hemócitos.....	39
4.2.3.2 Análise da melanização da hemolinfa.....	40
4.2.3.3 Produção de óxido nítrico.....	41
4.3 Efeitos <i>in vitro</i> de <i>L. rhamnosus</i> inativado pelo calor em macrófagos (RAW 264.7) estimulado por <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i>	41
4.3.1 Cultura de macrófagos RAW 264.7.....	41
4.3.2 Preparação das suspensões de <i>L. rhamnosus</i> (morto pelo	

calor), <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i>	42
4.3.3 Exposição das células à bactéria.....	42
4.3.4 Detecção e quantificação de citocinas pró e anti-inflamatórias.....	43
4.3.5 Detecção e quantificação de óxido nítrico.....	44
4.3.6 Contagem de UFC/mL de <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> , após contato do <i>L. rhamnosus</i> com macrófagos.....	45
4.4 Análise estatística	46
5 RESULTADOS	47
5.1 Criação de <i>Galleria mellonella</i> com diferentes dietas	47
5.1.1 Duração da fase larval.....	47
5.1.2 Viabilidade das lagartas (% de pupas no último instar).....	47
5.1.3 Peso no último estágio larval.....	48
5.1.4 Volume da hemolinfa e contagem total dos hemócitos.....	48
5.1.5 Susceptibilidade à infecção experimental (Curva de sobrevivência).....	48
5.2 Efeitos de <i>L. rhamnosus</i> inativado pelo calor na resposta de <i>G. mellonella</i> desafiada com <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i>	50
5.2.1 Determinação da concentração sub-letal de <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> nesses animais.....	50
5.2.2 Curva de sobrevivência.....	52
5.2.3 Contagem total dos hemócitos.....	53
5.2.4 Melanização da hemolinfa.....	54
5.2.5 Óxido nítrico.....	55
5.3 Efeitos <i>in vitro</i> de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> inativado pelo calor em macrófagos (RAW 264.7) estimulado por <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i>	56
5.3.1 Detecção e quantificação de citocinas.....	56
5.3.2 Óxido nítrico.....	61
5.3.3 Contagem total de unidades formadoras de colônia.....	62
6 DISCUSSÃO	64

7 CONCLUSÃO	78
8 REFERÊNCIAS	79
ANEXO	90

Jorjão AL. 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* [tese]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2016.

RESUMO

Galleria mellonella é utilizada para estudar a virulência de micro-organismos e a potência de antimicrobianos. Este estudo buscou estabelecer criação de lagartas utilizadas em ensaios *in vivo* e avaliar o efeito do probiótico *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469, inativado pelo calor, no modelo e *in vitro*. Os objetivos foram: a) desenvolver uma metodologia de criação de *G. mellonella*, avaliando quatro dietas diferentes sobre crescimento larval, volume da hemolinfa, quantidade de hemócitos e resposta à infecção por meio da curva de sobrevivência b) avaliar os efeitos de *L. rhamnosus* sobre *G. mellonella* analisando: curva de sobrevivência; contagem de hemócitos, melanização da hemolinfa, produção de óxido nítrico na hemolinfa e os efeitos de *L. rhamnosus* sobre macrófagos RAW 264.7 desafiados por *S. aureus* ou *E. coli*, analisando o perfil de indução de citocinas e óxido nítrico. Os resultados foram analisados estatisticamente (ANOVA e Tukey, 5%) e a curva de morte e estimativa das diferenças na sobrevivência foram determinadas por Log-rank (Mantel-Cox, 5%). As rações a base de fubá e pólen apresentaram os melhores resultados, sendo semelhantes entre si e diferentes das demais rações ($p < 0,05$), sendo a ração a base de fubá escolhida por apresentar resultados semelhante ao pólen e menor custo. Os resultados *in vivo* demonstraram diminuição na mortalidade das lagartas no grupo com inoculação de *L. rhamnosus*, entretanto, sem diferença estatística. Houve aumento na contagem de hemócitos quando *G. mellonella* foi inoculada com *S. aureus* e *E. coli*, com ou sem inoculação de *L. rhamnosus*, além de haver melanização da hemolinfa, demonstrando que o *L. rhamnosus* melhorou a resposta de *G. mellonella* quando desafiada por bactérias. Os resultados *in vitro* demonstram que *L. rhamnosus* induziu alta produção de TNF- α , igualmente aos demais grupos ($p \leq 0,05$), não havendo produção de IL-1 β e IL-6 no grupo estimulado apenas por *L. rhamnosus*. Nos grupos que receberam o segundo estímulo ou apenas o contato com *S. aureus* ou *E. coli*, houve produção de IL-1 β , IL-6 e IL-10. As maiores produções de óxido nítrico foram observadas nos grupos estimulados com *S. aureus*. Houve diminuição na contagem de UFC/mL de *S. aureus* e *E. coli*, quando os

macrófagos foram estimulados com lactobcilos. Isso sugere que *L. rhamnosus* inativado foi capaz de modular produção de citocinas e óxido nítrico quando as células foram desafiadas por *S. aureus* e *E. coli*, além de diminuir a contagem de CFU/mL, sugerindo melhorar a capacidade fagocitária dos macrófagos.

Palavras-chave: *Galleria mellonella*. *Lactobacillus rhamnosus*. Macrófagos. Citocinas. Óxido nítrico.

Jorjão AL. Methodology for creation of Galleria mellonella for use as infection model and effects of inactivated Lactobacillus rhamnosus *in vivo* and *in vitro* challenged by Staphylococcus aureus and Escherichia coli [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): Institute of Science and Technology, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2016.

ABSTRACT

Galleria mellonella is used to study microorganisms virulence and antimicrobial power. This study aimed to standardize the creation of worms used in *In vivo* assays and evaluate the effect of heat-killed probiotic, Lactobacillus rhamnosus ATCC 7469, on this model and in *in vitro* studies. The objectives were: a) developing a methodology for breeding G. mellonella with four different diets influence on larval growth, hemolymph volume, quantity of hemocytes and infection response by means of survival curve; b) evaluating the effects of L. rhamnosus on G. mellonella by means of the following analyzes: survival curve, hemocytes counting, hemolymph melanization, nitric oxide release, and the effects of L. rhamnosus on macrophages RAW 264.7 challenged by S. aureus or E. coli by means of cytokines and nitric oxide production. Results were statistically analyzed (ANOVA and Tukey, 5%). Death curve and estimation of differences in survival were determined by Log-rank (Mantel-Cox, 5%). Cornmeal and pollen-based rations showed the best results, being similar to each other and different from the other ones ($p < 0.05$). Cornmeal ration was chosen since it presents results similar to pollen and lower cost. *In vivo* results showed reduction in mortality of caterpillars in the group inoculated with L. rhamnosus, with no statistical difference. Hemocyte counting increased when G. mellonella was inoculated with S. aureus and E. coli, with or without inoculation of L. rhamnosus, add to that hemolymph melanization, showing that L. rhamnosus improved G. mellonella response challenged by bacteria. *In vitro* results show that L. rhamnosus induced high production of TNF- α , like other groups ($p = 0.05$), with no production of IL-1 β and IL-6 in the group stimulated only by L. rhamnosus. The groups which received only the second stimulus or only the contact with S. aureus or E. coli, there was IL-1 β , IL-6 and IL-10 production. The highest nitric oxide production was observed in the groups challenged with S. aureus. S. aureus and E. coli CFU/mL counting decreased when macrophages were stimulated with lactobacilli. This suggests that heat-killed L. rhamnosus was capable of modulating cytokine and nitric oxide production when cells were

challenged with S. aureus and E. coli and reduce the CFU/mL counting, suggesting that there was enhancement in the phagocytic capacity of macrophages.

Keywords: Galleria mellonella. Lactobacillus rhamnosus. Macrophages. Cytokines. Nitric oxide.

1 INTRODUÇÃO

O uso de insetos como modelos de infecção experimental tem apresentado grande crescimento nas pesquisas envolvendo patógenos humanos, sendo uma alternativa valiosa em relação aos modelos animais, que atualmente são mais caros e envolvem conflitos éticos. Os insetos têm um sistema relativamente avançado de defesas antimicrobianas, pois possuem sistema imune inato complexo e células na hemolinfa que são capazes de encapsular ou fagocitar invasores microbianos, além de respostas adaptativas que incluem a produção induzida de lisozima e pequenos peptídeos antimicrobianos (Ramarao et al., 2012). Assim, os insetos são ferramentas polivalentes para a identificação e caracterização de fatores de virulência microbianos envolvidos em infecções de mamíferos (Hoffmann J, 2007) e as lagartas da traça da cera, *Galleria mellonella*, vêm sendo utilizadas como modelo experimental de infecção por apresentar várias vantagens, como baixo custo, possibilidade de criação em larga escala, e ainda, os ensaios são relativamente rápidos, de fácil execução e interpretação. Estudos demonstraram que as lagartas *G. mellonella* são um modelo experimental ideal para fornecer visão útil da patogênese de uma grande variedade de infecções microbianas em mamíferos (Achterman et al., 2011; Junqueira, 2012; Diago-Navarro et al., 2014; Alghoribi et al., 2014; Arvanitis, Mylonakis, 2015; Scorzoni et al., 2015; Maekawa et al., 2015)

Embora o modelo de *G. mellonella* já esteja bem desenvolvido para uso em infecção experimental, a criação deste inseto pode variar nos diferentes centros de pesquisa, de modo que a padronização de um protocolo de criação destas lagartas é fundamental para minimizar interferências externas nos resultados dos estudos, uma

vez que a própria alimentação das lagartas pode influenciar no seu desenvolvimento e possivelmente na resposta imunológica (Banville et al., 2012)

Poucos estudos têm utilizado esse modelo para estudos dos efeitos de bactérias probióticas (Vilela et al., 2015; Köhler, 2015). Probióticos são micro-organismos vivos que exercem efeitos benéficos no hospedeiro, quando administrados em quantidades adequadas, e têm atraído interesse crescente por seus efeitos benéficos, sendo comumente administrados em produtos lácteos fermentados (Nakayama et al., 2014; WHO, 2001). Os efeitos dos probióticos têm sido estudados ao longo dos anos em diversas áreas, no tratamento e prevenção de doenças e como alimentos funcionais. Acredita-se que o consumo desses alimentos possa favorecer o metabolismo da lactose, aumentar a digestão dos alimentos e modular do sistema imune (Nagpal et al., 2012), sendo que as bactérias mais comumente utilizadas como probióticos são as ácido lácticas, das espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, uma vez que evidências científicas demonstraram seus efeitos sobre a saúde humana por meio da modulação da atividade do sistema imune (Yasuda et al., 2008; Ashraf, Shah, 2014).

No entanto, hoje em dia há uma grande discussão sobre a definição de probióticos, já que estudos demonstram que os micro-organismos mesmo não viáveis, bem como os seus componentes, ainda podem ser utilizados, pois mantém seus efeitos (Dash et al., 2015). Este efeito foi observado também em estudos anteriores, no qual *L. rhamnosus* inativado pelo calor foi capaz de induzir produção de citocinas por macrófagos, igualmente a bactéria viável (Jorjão et al., 2015). Como os probióticos exercem essa função não está totalmente esclarecido, de modo que há um de grande interesse em avaliar seu efeito sobre o modelo *G. mellonella*, a fim de verificar a influência da bactéria probiótica inativada sobre resposta imune, através de um desafio bacteriano e *in vitro* sobre células do sistema imune, como os macrófagos, por exemplo,

a fim de tentar compreender melhor como atuam na ativação dessas células, influenciando sua capacidade de fagocitose e produção de citocinas pró e anti-inflamatórias. Com isso nosso estudo busca demonstrar o efeito da bactéria probiótica inativada pelo calor sobre *G. mellonella* e macrófagos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Galleria mellonella*

Galleria mellonella é uma espécie de insetos lepidópteros, mais especificamente de traças, pertencente à família *Pyralidae*. Os Lepidópteros são insetos holometabólicos, ovíparos. Dos ovos saem larvas, chamadas lagartas, as quais, depois de uma série de transformações, cada uma se evidenciando após uma ecdise, atingem o completo desenvolvimento, realizando-se, então, a primeira metamorfose, da qual resulta a pupa e desta após uma segunda metamorfose, o inseto adulto ou mariposa. Esse lepidóptero ocorre naturalmente em colmeias de abelhas e têm vasta distribuição geográfica, alimentam-se de material presente nelas como cera velha, pólen e mel. O período de desenvolvimento larval da *G. mellonella* é de 40 dias podendo variar devido a condições ambientais e a velocidade de crescimento que é diretamente proporcional à temperatura e ao suprimento alimentar. Em condições ideais de temperatura e alimentação, o peso das lagartas pode dobrar diariamente nos primeiros dez dias (Charrière, Imdorf, 1999).

Na apicultura, *G. mellonella*, também conhecida como traça maior da cera, é globalmente considerada praga das colônias de mel de abelha (*Apis mellifera*). As lagartas fazem galerias nos favos, alimentando-se de cera, pólen e mel, podendo destruí-los totalmente, impedindo sua reutilização, além da destruição dos favos os adultos da traça podem, através das fezes, ser responsáveis pela transmissão de importantes patógenos para as larvas das abelhas. A importância econômica de traças de cera levou a uma série de investigações sobre

seu ciclo de vida, biologia, comportamento, ecologia, biologia molecular, fisiologia e controle (Vandenberg, Shimanuki, 1990). Com isso começaram a surgir criatórios dessa lagarta para melhorar o estudo em relação a genética molecular e fisiologia ou também para simplesmente alimentação de réptil, comida de passarinho e isca de peixe (Ellis et al., 2013).

Para iniciar um programa de criação, as mariposas podem ser obtidas a partir de colônias de abelhas infestadas ou adquiridos de outro criatório, e estas podem ser criadas de modo natural, em colmeia de abelhas contendo mel e pólen (Hood et al., 2004) ou criação *in vitro*, utilizada pela maioria dos laboratórios. A criação em laboratório de *G. mellonella* segue série de eventos, sendo eles: a) colocar os ovos de traça da cera sobre a nova dieta; b) coletar lagartas ou pupa e colocar em um segundo recipiente; c) deixar que a larva em último instar transforme-se em pupa ou pupa para emergir como adultos; d) acasalamento dos adultos; e) depois permitir que as fêmeas ponham ovos e colocar os ovos novamente na nova dieta (Ellis et al., 2013).

Um método para a alimentação de lagartas de traça da cera é simplesmente fornecer favo de mel, mas isso pode ser caro e insustentável, se são desejados um grande número de lagartas. Assim foram desenvolvidas diferentes dietas artificiais, sempre com base na alimentação natural, mel, cera e pólen (Coskun et al., 2006). Com a crescente utilização de insetos como modelo experimental em laboratórios, houve a necessidade de se criar esses animais para obtenção de quantidade padronizada para os estudos. As lagartas *G. mellonella* foram desenvolvidas como um modelo experimental de infecção e a procura no Brasil por esse modelo aumentou, entretanto, havia pouca oferta para esse fim. Desta forma, observou-se a necessidade de se realizar a criação dentro do nosso laboratório para uso específico como modelo de infecção experimental. Com isso surgiu o

interesse de desenvolver uma criação onde se consiga obter animais de bom tamanho, mais claros, padronizados e em grandes quantidades.

Modelos de mamífero de infecção são fundamentais para elucidar os mecanismos da patogênese bacteriana e também são usados para avaliar a eficácia de novos agentes antimicrobianos, antes do início de testes em humanos. Um trabalho pioneiro para determinar os parâmetros farmacocinéticos dos antibióticos clinicamente relevantes no modelo experimental de *G. mellonella* demonstrou que este modelo é útil para uma resposta aproximada a observada em humanos e os resultados apoiam a hipótese de que *G. mellonella* pode ser utilizado para pesquisar a eficácia de antimicrobianos (Thomas et al., 2013).

As lagartas *G. mellonella* possuem características que as tornam particularmente útil para o estudo de agentes patogênicos humanos. Elas são relativamente grandes em tamanho (12 -20 mm), o que permite uma manipulação fácil e fácil obtenção de tecido e amostras de hemolinfa para análise, além do sistema imunológico com um elevado grau de estruturas, sendo parecido estrutural e funcionalmente com sistema imune inato de vertebrados (Lionakis, 2011). A resposta celular dos insetos inclui fagocitose, nodulação, e encapsulamento e a resposta imune humoral consiste em diversos processos, incluindo a melanização, coagulação da hemolinfa, e a produção de inúmeros peptídeos antimicrobianos potentes em grande escala (Hoffman JA, 1995). Além disso, as lagartas *G. mellonella* podem ser mantidas a 37 °C, um atributo importante quando se estuda agentes patogênicos humanos. O desenvolvimento de organismos modelo como ferramentas de investigação em pesquisas tem sido crucial para o avanço do conhecimento em várias áreas e para o sucesso de qualquer modelo experimental como uma ferramenta de pesquisa, sendo necessária a padronização do modelo e das condições de manutenção para produzir organismos com a menor variação possível (Ankeny et al., 2011).

Na literatura pode-se observar a utilização desse modelo para testar e avaliar terapias antimicrobianas, terapias alternativas para serem utilizadas contra micro-organismos resistentes a drogas. Jander et al. (2000) analisaram 32 diferentes cepas de *Pseudomonas aeruginosa* em camundongos e inseto (*G. mellonella*), os resultados mostraram uma correlação positiva nos padrões de virulência e os autores concluíram que *G. mellonella* é um bom modelo experimental para a identificação de fatores de virulência de *P. aeruginosa*. Também Mylonakis et al., em 2005, utilizaram o modelo para avaliar genes de *Cryptococcus neoformans*, que demonstraram em estudos anteriores estar envolvidos na virulência desta levedura e observaram que também em *G. mellonella* esses genes (CAP 59, GPA1, RAS1 e pKA1) desempenharam um papel na morte da lagarta. Além disso foi testada uma terapia de combinação antifúngica (anfotericina B +flucitosina), administrada antes ou após a inoculação das lagartas e os autores destacaram que *G. mellonella* pode ser um substituto para modelos de infecção de mamíferos para *C. neoformans* e pode facilitar os estudos *in vivo* da virulência do fungo e a eficácia de terapias antifúngicas.

Outro estudo (Chibebe et al., 2013), utilizando TFD (terapia fotodinâmica) antimicrobiana demonstrou que o azul de metileno injetado no inseto seguido de iluminação de todo o corpo, prolongou a sobrevivência da *G. mellonella* e a terapia (TFD), de lagartas infectadas com *E. faecium* resistente, combinando a vancomicina prolongou significativamente a sobrevivência das lagartas em comparação aos tratamentos sozinhos. Os autores concluíram que *G. mellonella* fornece um modelo de hospedeiro invertebrado útil para estudar TFD antimicrobiana e para explorar melhores tratamentos combinados com TFD. Também testaram *C. albicans* resistente ao fluconazol em combinação com TFD e observaram que a administração de fluconazol, antes ou após a exposição das lagartas a APDT prolongou significativamente a sobrevivência delas em comparação com qualquer

um dos tratamentos isoladamente, concluindo que *G. mellonella* é um modelo *in vivo* útil para avaliar TFD como um regime de tratamento para infecções por *Candida* (Chibebe et al., 2013).

Galleria mellonella é largamente utilizada como um modelo de infecção, Li DD et al. (2013) sugeriram que 5×10^5 unidades formadoras de colônias (UFC) /larva foi um inóculo adequado para otimizar o uso de *G. mellonella* como modelo de infecção para *C. albicans*, com o objetivo de avaliar os agentes antifúngicos. Estes autores relataram que este modelo fornece uma maneira rápida, barata e confiável para avaliar antifúngicos *in vivo*. Outro trabalho também avaliando eficácia de antifúngicos durante a infecção por *C. krusei* em *G. mellonella*, também demonstrou que esse modelo não-mamífero é uma ferramenta útil para investigar a eficácia antifúngica *in vivo* e virulência de *C. krusei* (Scorzoni et al., 2013). Esses estudos demonstram o crescente interesse por esse modelo de infecção, e indica uma necessidade de padronização de criação desses animais.

Na literatura encontra-se vários estudos utilizando *G. mellonella* como modelo de infecção, não somente em estudos de infecção por fungos, mas também para uma variedade de bactérias (Hornsey et al., 2013; Wand et al., 2013; Beeton et al., 2015). Richards et al. (2015) utilizaram o modelo para avaliar alterações genéticas e características fenotípicas específicas associadas a bacteremia por *S. aureus* resistente e conseguiram identificar novas características, observando a virulência das diferentes cepas no modelo de infecção. Benthall et al. (2015) recentemente utilizaram o modelo para determinar da eficácia dos antibióticos disponíveis contra culturas planctônicas e biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* em comparação com a determinação *in vitro* de concentração inibitória mínima (CIM). Os autores relataram que, em geral, a análise *in vitro* concordaram com os estudos *G. mellonella* e que o estudo fornece

informações importantes sobre a adequação de *G. mellonella* como modelo para testes de eficácia de antibióticos.

Banville et al. (2012) mostraram que as lagartas privadas de nutrição durante sete dias antes da infecção foram mais suscetíveis à infecção por *C. albicans*. As lagartas não alimentadas demonstraram reduzida expressão de uma variedade de peptídeos antimicrobianos e proteínas do sistema imune. Como visto no estudo, a privação de *G. mellonella* de alimentos durante o experimento causou redução nas respostas imunitárias e um aumento da susceptibilidade à infecção, o que sugere que a incubação de lagartas na presença ou ausência de nutrição pode afetar os resultados e as comparações entre os diferentes laboratórios. Esta constatação tem implicações para comparações interlaboratoriais, já que essas lagartas representam um útil modelo de sistema *in vivo*, mas a duração da fase de pré-incubação (1, 3 ou 10 semanas), que vem sendo utilizada em estudos, pode afetar significativamente a sua susceptibilidade a agentes microbianos patogênicos, possivelmente como resultado do metabolismo alterado (Browne et al., 2015).

Para *G. mellonella* ser amplamente aceita como um organismo modelo para estudo da patogênese microbiana, um número de procedimentos de normalização precisa ser implementado para garantir comparabilidade experimental entre diferentes laboratórios de pesquisa (Cook, McArthur, 2013). Com isso, torna-se de grande importância melhorar os métodos de criação destas lagartas, padronizando rações que favoreçam seu desenvolvimento, bem como seu sistema imunológico, a fim de minimizar variações interlaboratoriais deste importante modelo experimental.

2.2 Probióticos

Em 1907, Elie Metchnikoff, que hoje é considerado o pai dos probióticos, observando que populações de camponeses búlgaros apresentavam maior longevidade e saúde do que as demais, associou isso ao consumo regular de bactérias ácido lácticas nos produtos fermentados, como iogurtes por exemplo e então sugeriu que por meio da alimentação é possível modificar a microbiota intestinal, substituindo micro-organismos patogênicos por micro-organismos benéficos. Desde então usava-se o termo terapia microbiana, que anos mais tarde começou a ser utilizado o termo probióticos (Lilly, Stillwell, 1965; Fuller et al., 1989; Huis in't Veld et al., 1994). Atualmente, utiliza-se o termo para designar micro-organismos vivos, comensais que produzem efeito benéfico sobre a saúde do hospedeiro por diferentes mecanismos.

Os efeitos benéficos dos probióticos tem sido estudados ao longo dos anos em diversas áreas, no tratamento e prevenção de doenças e como alimentos funcionais. Em uma revisão, Hemarajata e Versalovic (2013) descreveram os principais mecanismos de ação dos probióticos no trato gastrointestinal do hospedeiro, onde demonstraram que os probióticos são capazes de modificar as comunidades microbianas do intestino e suprimir o crescimento de patógenos, devido a indução da produção de β -defensina e IgA pelo hospedeiro. Podem ser capazes de fortalecer a barreira intestinal através da manutenção das junções celulares e induzindo a produção de mucina e ainda a imunomodulação mediada por probiótico pode ocorrer por intermédio da mediação da secreção de citocinas por meio de vias de sinalização, tais como NF- κ B e MAPKs, que também podem afetar a proliferação e diferenciação de células do sistema imune (tais como as células T) ou células epiteliais.

Os probióticos também demonstram capacidade de aumentar a resposta imune celular não específica caracterizada por ativação de macrófagos e células Natural Killer (NK). No sistema imune do intestino, os macrófagos desempenham um papel importante na

manutenção da saúde, mediante sua capacidade em eliminar microorganismos invasores, células defeituosas, e substâncias tóxicas, além disso são responsáveis por secretar um grande número de citocinas e quimiocinas, responsáveis por modular a respostas imunes do hospedeiro. Acredita-se que os probióticos sejam capazes de estimular essas células a desempenhar suas funções, por meio da modulação do perfil de indução de liberação de citocinas e também estimulando a fagocitose (Hardy et al., 2013). Os macrófagos são importantes no que diz respeito a ambas respostas imunes inata e adaptativa e os fenótipos pró-inflamatória (M1) ou anti-inflamatória (M2) se diferenciam após a ativação. Estudos vem demonstrando que lactobacilos vivos e/ou mortos são capazes de estimular as funções dos macrófagos, afetando a polarização dessas células, sendo que esta atividade pode variar entre as cepas probióticas (Matsuguchi et al., 2003; Italiani, Boraschi, 2014). Christoffersen et al. (2014), demonstraram como as diferentes bactérias afetam a polarização dos macrófagos. Os autores cultivaram uma linhagem de macrófagos (RAW 264.7) com 16 diferentes cepas probióticas (comensais e de origem alimentar) e quantificaram a produção de óxido nítrico (NO) e expressão de genes que indica polarização para M1 ou M2. Cepas de *Escherichia* e *Salmonella* elevaram a expressão de NO mais do que cepas de *Enterococcus*, *Lactobacillus* e *Lactococcus*, sugerindo que cepas Gram-negativas são mais potentes indutores M1 e que as respostas foram específicas para cada cepa, isto é, dentro de cada espécie houve diferença nas expressões.

O uso de probióticos representa uma estratégia alternativa potencialmente eficaz para a prevenção e tratamento de doenças inflamatórias ou alérgicas. Contudo, existe uma preocupação em relação a problemas de segurança decorrentes do uso extensivo de células microbianas vivas, com isso surge o interesse em microorganismos não viáveis ou extratos de células microbianas, podendo eliminar os problemas com transportes, fabricação, prazo de validade,

além de reduzir os riscos de infecção microbiana (Taverniti, Guglielmetti, 2011). Como a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO) e a Organização Mundial de Saúde (OMS). sugere que a palavra “probiótico” deve ser restringida somente a produtos que contenham micro-organismos vivos, e considerando evidências científicas indicando que os micro-organismos inativados possam afetar positivamente a saúde do hospedeiro, podemos encontrar na literatura os termos “paraprobiotic” ou “*ghost probiotic*” (probiótico fantasma) para indicar o uso de células microbianas inativadas ou frações celulares que possam conferir benefício para a saúde do hospedeiro (Taverniti, Guglielmetti, 2011; Dash et al., 2015)

Muitas vezes as doses eficazes podem ser diferentes daquelas encontradas no probiótico imediatamente após a preparação, já que muitas vezes pode diminuir durante a armazenagem e o produto final pode conter bactérias mortas. Assim os efeitos benéficos exercidos pelos probióticos podem ser gerados tanto pelas células vivas quanto pelas mortas (Soccol et al., 2010). Adams (2010) sugere que células probióticas vivas podem influenciar a microbiota gastrointestinal e a resposta imunológica, enquanto os componentes de células mortas exercem uma resposta anti-inflamatória no trato gastrointestinal e que isso tem várias implicações para a produção e aplicação de probióticos, sendo que quantidades variáveis de células mortas podem contribuir para a variação das respostas o que é frequentemente visto na utilização de culturas probióticas vivas, sendo a utilização de probióticos mortos mais seguro.

Outro fator essencial para a funcionalidade do probiótico é a sua capacidade de chegar e colonizar o trato gastrointestinal do hospedeiro suportando a condição adversa criado pelas enzimas digestivas, sistema imune do hospedeiro e a camada de muco intestinal, além de ter que competir com a microbiota já estabelecida no local. Com isso, torna-se difícil para o probiótico recentemente introduzido competir com a microbiota normal, isso faz com que doses mais elevadas sejam

utilizadas levando a uma prevalência temporária da bactéria probiótica (Vieira et al., 2008). Além disso, muitas bactérias podem não resistir a essas condições e também aos processos de fabricação do produto, criando assim a possibilidade de que alguns dos efeitos benéficos exercidos por tais probióticos possam ter sido efetivamente alcançado a partir da bactéria morta ou até mesmo dos componentes (Dash et al., 2015). Bernardeau et al. (2008) estudaram o potencial de adesão “*in vitro*” de cepas de *L. rhamnosus* e *Lactobacillus farciminis* inativados pelo calor e observaram que estes mantinham a capacidade de aderência no modelo de mucosa estudado. Os autores também relataram que os lactobacilos inativados podem melhorar a resposta dos animais aos patógenos entéricos, criando um efeito de barreira e estimulando respostas imunológicas devido a estabilidade das cepas inativadas e a preservação das estruturas da parede celular, sendo que a capacidade de aderência a mucosa intestinal é mantida em várias cepas probióticas estudadas, quando estas estão mortas.

Marin et al. (1997) avaliaram diversas cepas de bifidobactérias inativadas pelo calor e observaram que estas tinham uma atividade imunomoduladora em macrófagos (RAW 264.7) e também em uma linhagem de células T. As bactérias inativadas pelo calor foram capazes de induzir produção de TNF- α e IL-6 em comparação com o grupo controle. Estes autores concluíram que a interação dos macrófagos com as células de bifidobactérias foi capaz de reforçar a produção de citocinas pró-inflamatórias, podendo esse efeito ser benéfico na manutenção do equilíbrio imunológico, aumentando a resistência a infecções. Também em estudo anterior (Jorjão et al., 2015) utilizando a mesma linhagem celular, *L. rhamnosus* vivo, morto ou até mesmo somente suspensões mortas pelo calor foram capazes de induzir a síntese de diferentes citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-6) ou com funções de regulação (IL-10), sugerindo que a *L. rhamnosus* ATCC 7469 é capaz de exercendo efeito imuno-regulador sobre os macrófagos.

Em 2013, Harb et al. avaliaram o papel da bactéria probiótica *L. rhamnosus* GG (LGG) viva e seus derivados, após morte pelo calor, em inflamações alérgicas das vias respiratórias. Eles avaliaram a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias em camundongos recém-nascidos com inflamação alérgica aguda induzida por ovalbumina na quarta semana de vida. Os animais foram alimentados com LGG vivo e somente com seus derivados e os autores concluíram que LGG e também derivados exercem atividades imunomoduladoras, e a bactéria viável ou sobrenadante podem fornecer uma alternativa viável para reduzir respostas inflamatórias alérgicas. *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) vivos, tanto quanto mortos pelo calor, foram capazes de diminuir a produção de IL-8 quando uma resposta inflamatória foi gerada através de estimulação pelo fator de necrose tumoral (TNF- α) em linhagem celular Caco-2 (células epiteliais humana). Foi observado que o pré-tratamento com as duas formas da bactéria probiótica, viva ou morta, foi capaz de regular a resposta inflamatória ao TNF- α , porém os autores relataram a necessidade de altas doses da bactéria viva para o efeito ser alcançado, tornando assim, LGG morto pelo calor mais seguro e efetivo na atenuação da inflamação (Zhang L et al., 2005).

Jensen et al. (2014) em um estudo utilizando linhagem celular monocítica avaliou a produção de citocinas a partir da THP-1 e a ativação de NF-kB, tentando elucidar a capacidade estimulante dos lactobacilos *in vitro*. Neste estudo, foi utilizada duas cepas probióticas, comercialmente disponíveis. Foi observado que as cepas de *L. reuteri* induziu maior secreção de citocinas e maior ativação de NF-kB, enquanto culturas de *L. plantarum* e *L. rhamnosus* GG foram baixo indutores. Os autores observaram que uma das proteínas da superfície de *L. reuteri*, Hmpref0536_10802, pareceu ser importante para a estimulação das células. Esses resultados aumentam a complexidade da interação entre lactobacilos e células humanas e é provável que é a soma de proteínas de superfície das bactérias, seus metabólitos e/ou as proteínas

secretadas que podem induzir a secreção de citocinas em células THP-1 e ativação de NF- κ B. Fang et al. (2014) demonstraram que as estruturas de células bacterianas de *L. rhamnosus* GG, não foram danificadas pelo processo de calor para matar a bactéria e que suas estruturas externas permaneceram intactas e que por isso a morte pelo calor da bactéria, não minimizou o efeito modulador de *L. rhamnosus* GG sobre a expressão de citocinas.

Evidências sugerem que existe uma regulação da produção de citocinas por meio de um mecanismo intracelular que torna as células relativamente resistentes após exposições repetidas a estímulos pró-inflamatórios por meio de micro-organismos comensais ou patogênicos, desencadeando uma série de reações enzimáticas que irá alterar inibidor κ B, resultando em tolerância e auxiliando na prevenção de doenças. Os probióticos mortos pelo calor ou inativados por UV vêm demonstrando poder afetar essas vias de sinalização (Kataria et al., 2009). Li N et al. (2009) em conclusão relataram que tanto o vivo, quanto LGG morto pelo calor, fornecido por via enteral, foram capazes de diminuir a produção de mediadores pró-inflamatórios e aumentar mediadores anti-inflamatórios, em inflamação induzida por LPS (lipopolissacarídeo). Sendo assim, os mecanismos de ação dos micro-organismos probióticos mortos, assim como seus componentes microbianos na regulação intracelular dos mediadores inflamatórios são de grande interesse para estudos futuros.

Chuang et al. (2007) demonstraram que 3 cepas mortas por calor de *Lactobacillus* foram capazes de modular a resposta imune por meio da proliferação celular e produção de IL-10, IL-12, e IFN- γ . Estes resultados demonstram que os lactobacilos vivos ou mortos pelo calor, exercem um papel potencialmente importante na modulação das respostas imunes a reações alérgicas. Outro estudo utilizando cepas de lactobacilos (*L. rhamnosus* OLL2984, *L. delbrueckii* sp. *bulgaricus* OLL1073R-1) avaliou o efeito dessas bactérias sobre dermatite atópica,

desenvolvido pela aplicação tópica de antígeno de ácaro, em ratos. A ingestão oral de células mortas pelo calor OLL1073R-1 inibiu o desenvolvimento da dermatite, sendo que as células mortas de outra cepa bacteriana, *L. rhamnosus* OLL2984, não exerceu efeito inibitório sobre a dermatite. A ingestão oral de células mortas pelo calor OLL1073R-1 também atenuou a secreção de IL-6 e reduziu os níveis de IL-6 em tecidos inflamados. Os autores ressaltaram a questão de que o efeito do probióticos, até mesmo das células mortas, são cepa dependente e há necessidade de estudos adicionais para melhor aplicação da terapia, até mesmo utilizando bactérias mortas (Kano et al., 2013).

Os probióticos têm sido utilizados como alternativa terapêutica em doenças inflamatórias intestinais. Muitos estudos têm demonstrado que as diferentes cepas bacterianas probióticas possuem efeitos imunomoduladores, no entanto, há um interesse crescente pelo uso de bactérias não-viáveis para reduzir o risco de infecção microbiana e translocação. *L. rhamnosus* GR-1 é uma bactéria probiótica utilizada para manter a saúde urogenital. O suposto mecanismo para o seu efeito probiótico é mediante modulação da imunidade do hospedeiro. Infecções do trato urinário são frequentemente causadas por *Escherichia coli* uropatogênica. Avaliou-se o papel de *L. rhamnosus* GR-1 na ativação do NF-κB em células estimuladas por *E. coli*. *L. rhamnosus* GR-1 viável demonstrou potencializar a atividade de NF-κB em células estimulada por *E. coli*, enquanto que os lactobacilos mortos pelo calor demonstraram um pequeno aumento na atividade de NF-κB, sugerindo que os lactobacilos não viáveis possam ser uma nova estratégia para a prevenção ou tratamento de infecção urinária provocada por *E. coli* (Karlsson et al., 2012).

Rodríguez-Nogales et al. (2015) avaliaram se a viabilidade de *L. fermentum* CECT5716 era essencial para exercer o seu efeito anti-inflamatório intestinal. Foram comparados os efeitos preventivos de probiótico viáveis e não viáveis no modelo de colite por

TNBS em ratos e também em células (Caco-2 e RAW 264.7). Os autores avaliaram os efeitos dos probióticos na expressão, IL-1 β , IL-8 e produção de nitrito. Os resultados *in vitro* revelaram uma diminuição na produção de mediadores pró-inflamatórios, independentemente da viabilidade do probiótico. As duas formas do probiótico produziram uma redução significativa de IL-1 β , níveis TNF- α e expressão de iNOS (Óxido nítrico sintase indutível), também quando administrados aos ratos. Os autores concluíram que, tanto *L. fermentum* CECT5716 vivo quanto morto, foram capazes de atenuar o processo inflamatório e diminuir a produção de alguns dos mediadores inflamatórios. Sendo que, de fato, a viabilidade deste probiótico não afetou suas propriedades imunomoduladoras e anti-inflamatórias

O trato gastrointestinal em mamíferos e insetos está associado com os micro-organismos (coletivamente a microbiota), que são controlados pelo sistema imune do intestino. Micro-organismos patogênicos estão sempre presentes, podendo infectar as células epiteliais do intestino e causar doença. Existem cada vez mais evidências que há uma relação mútua entre bactérias benéficas e patogênicas no intestino e pelo sistema imune. Decifrar essas interações complexas entre a microbiota intestinal e o sistema imunológico requer sistemas ou modelo de infecção, como as lagartas *G. mellonella*. A exposição da microbiota de *G. mellonella* a antibióticos induz imunidade e expressão de genes relacionados ao estresse no intestino (Mukherjee et al., 2013). Vilela et al. (2015) demonstraram que a injeção de *L. acidophilus* em lagartas *G. mellonella* infectadas com *C. albicans* aumentou a sobrevivência destes animais. Além disso, o número de *C. albicans* UFC / mL recuperado a partir da hemolinfa de larvas foi menor no grupo inoculado com *L. acidophilus* em comparação com o grupo de controle. Em conclusão, os autores relataram que *L. acidophilus* ATCC 4356 foi capaz de proteger *G. mellonella* contra candidose experimental e que até mesmo somente seus produtos demonstraram este efeito.

Com isso busca-se demonstrar no presente estudo que *G. mellonella* pode ser um modelo útil para se estudar os efeitos dos probióticos sobre o hospedeiro. Como foi observado em estudos anteriores, *L. rhamnus* ATCC 7469 não viáveis foram capazes de induzir produção significativa de TNF- α , IL-6, IL-10 e óxido nítrico em células da linhagem RAW 264,7, de forma semelhante a bactéria viva (Jorjão et al., 2015). Também quando estas células foram desafiadas por moléculas microbianas (LPS, LTA, manana), pode-se observar que os lactobacilos vivo ou morto, foram capazes de modular a produção das citocinas (TNF- α , IL-6, IL-10 e IL-12) de modo semelhante (Oliveira, 2013). Com isso, sugere-se que as bactérias não viáveis de *L. rhamnosus* possam induzir produção de citocinas pró-inflamatórias e também de IL-10, sugerindo um efeito regulador na produção de citocinas pelos macrófagos. Assim, torna-se de grande interesse ampliar os estudos da ação dos probióticos inativados pelo calor *in vitro* e *in vivo* a fim de verificar sua influência na resposta imune frente a um desafio bacteriano.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivos gerais

Os objetivos do presente estudo foram desenvolver uma metodologia de criação de *G. mellonella* que proporcionasse lagartas mais padronizadas quanto ao tamanho, peso e quantidade de hemolinfa e avaliar os efeitos da bactéria probiótica *L. rhamnosus* ATCC 7469 inativada pelo calor sobre o modelo *in vivo* (*G. mellonella*) e *in vitro* sobre macrófagos RAW 264.7, ambos desafiados por *S. aureus* e *E. coli*.

3.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos do presente estudo foram:

- a) Desenvolver uma metodologia de criação de *G. mellonella*, estabelecendo a ração da dieta que proporciona melhor desenvolvimento das lagartas, a fim de obter um modelo padronizado de *G. mellonella* para pesquisas futuras;
- b) Analisar os efeitos do *L. rhamnosus* inativado pelo calor, no modelo de criação padronizado de *G. mellonella* quando desafiados por *S. aureus* ou *E. coli*, avaliando os seguintes parâmetros: susceptibilidade à infecção experimental,

contagem total de hemócitos; melanização e produção de óxido nítrico;

- c) Avaliar os efeitos de *L. rhamnosus* inativado pelo calor sobre macrófagos, na produção de citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-10), óxido nítrico e atividade fagocítica, quando desafiados por *S. aureus* ou *E. coli*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Criação de *Galleria mellonella* com diferentes dietas

Para iniciar o processo de criação de *G. mellonella* e avaliar o efeito das dietas padronizadas em seu ciclo biológico, inicialmente, as lagartas de *G. mellonella*, doadas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), foram mantidas em potes plásticos com voal e tampa perfurada (Figura 1A) para transformar-se em mariposas. Em seguida, foi colocado cartolina na tampa como substrato para ovoposição (Figura 1B).

Foram distribuídos aleatoriamente em 4 potes plásticos (Figura 1C) 1000 ovos, sendo 250 em cada. Os ovos obtidos (Figura 1D) foram contados em microscópio estereoscópico (Figura 1E). Em todos os potes foi acrescentado cera alveolada (Figura 1F) e as diferentes rações (figura 1G), perfazendo 4 grupos experimentais:

- a) EMBRAPA- Ração da Embrapa: 120 g de açúcar mascavo, 80 g de glicerol, 400 g de leite em pó, 120 g de levedo de cerveja, 200 g de farinha de trigo integral, 200 g de farelo de trigo (fibra de trigo), 200 g de gérmen de trigo (Figura 2A);
- b) AVEIA – 300 g de aveia em flocos, 300 g de farinha integral, 60 g de levedura seca, 120 mL de glicerol, 120 mL de mel e cera- (Mead et al., 1985, modificada) (Figura 2B);

- c) FUBÀ- 250 g de fubá, 150 g levedura de cerveja, 100 g de farinha de soja, 100 g de leite em pó desnatado, 250 g de mel e 210 g de glicerol e cera (Brighenti et al., 2005- modificada) (Figura 2C);
- d) PÓLEN – 5 g de Pólen e 20 g cera. (Figura 2D).

Os potes foram incubados em estufa a 28 °C por aproximadamente 20 dias. Neste período, foi realizado acompanhamento semanal para verificar o crescimento das lagartas.

Após este período, quando as lagartas já atingiram o tamanho que permitiu o manuseio (aproximadamente 1 cm), foi realizada a limpeza das mesmas, retirando as teias e os casulos. As lagartas foram transferidas para recipientes de alumínio com 7,5 cm de altura e 16,5 cm de diâmetro, com tampas dotadas de furos e foram mantidas as diferentes dietas (Figura 1H).

Os potes foram mantidos a 28 °C e foi realizado o acompanhamento seu ciclo biológico e desenvolvimento das lagartas, registrando: 1) a duração da fase larval (dias de duração do ciclo larval das lagartas- desde ovo até o último estágio larval); 2) viabilidade das lagartas (% de pupas no último instar); 3) peso no último estágio larval (amostra de 30 lagartas de cada grupo experimental foram pesadas no último estágio larval); 4) cor no último estágio larval; 5) (foi observado se houve diferença na coloração das lagartas alimentadas com as diferentes rações, no último estágio larval).

Também foi avaliada influência das rações sobre volume da hemolinfa, onde a hemolinfa foi retirada e passada para outro microtubo, com auxílio de pipeta e a contagem total de hemócitos, realizada a coleta da hemolinfa de 10 lagartas e foi utilizado o teste de exclusão com azul de Tripán para realizar a contagem total de hemócitos

no contador automático de células (Countess® Automated Cell Counter-Invitrogen).

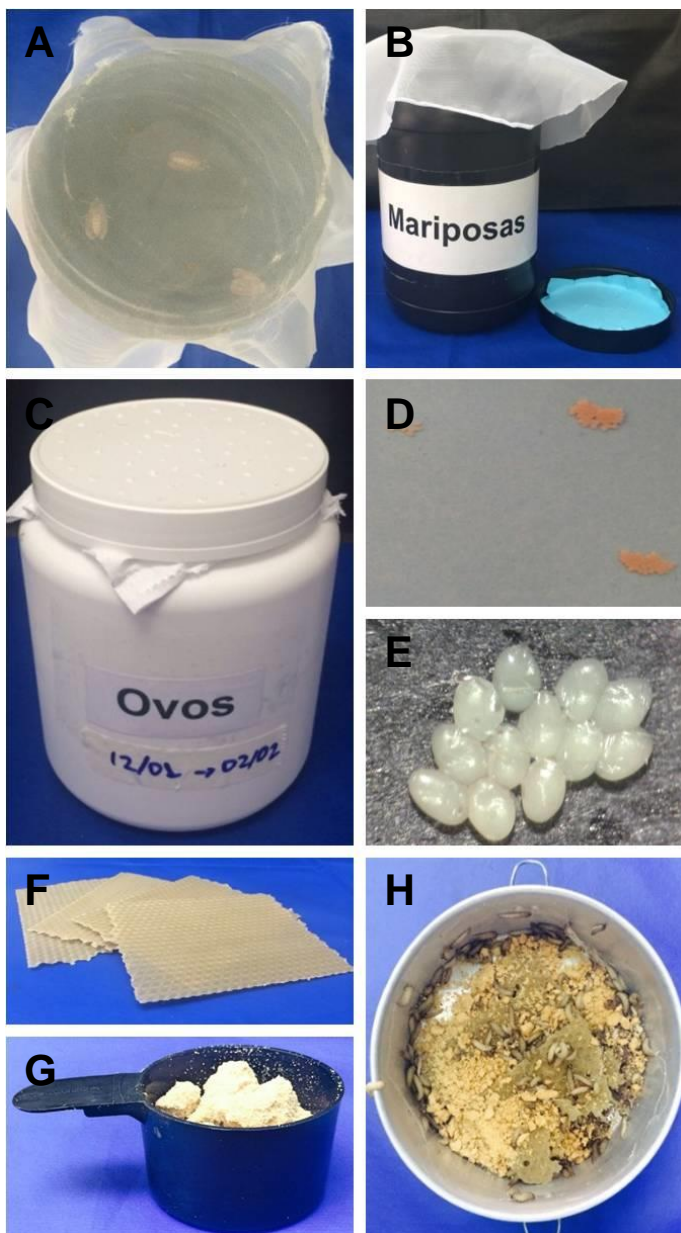


Figura 1- Material utilizado na criação e aspecto dos ovos de *G. mellonella*. A) pote plástico com voal para evitar a saída das mariposas de *G. mellonella*; B) tampa com cartolina como substrato para ovoposição; C) pote plástico, com tampa perfurada, utilizado para acondicionar os ovos; D) aspecto dos ovos de *G. mellonella* vistos a olho nu; E) ovos observados em microscópio estereoscópico (Carl Zeiss, Stemi DV4 – Alemanha - aumento de 24X); F) cera alveolada; G) medida de ração utilizada; H) recipiente de alumínio contendo cera alveolada e ração, onde são colocadas as lagartas após 20 dias até o momento de utilização para experimento ou reprodução.



Figura 2 - Rações utilizadas no experimento, nas imagens pode-se observar a diferença na textura das dietas. A) Ração EMBRAPA; B) Ração a base de Fubá; C) Ração a base de Aveia; D) Pólen.

4.1.1 Susceptibilidade à infecção experimental (Curva de sobrevivência)

Também para observar influência das diferentes dietas no sistema imune, lagartas de *G. mellonella* no estágio final da fase larval, sendo 12 lagartas de cada dieta, foram inoculadas com 10 μ L de suspensão de *S. aureus* ATCC 6538 ou *E. coli* ATCC 25922. Foram utilizadas cepas padrão de mantidas em freezer a -70 °C no Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos/ UNESP. A partir de colônias isoladas e confirmadas pela coloração de Gram, foram padronizadas as suspensões dos microorganismos em PBS estéril e apirogênico até a concentração de 10^8

células/mL, em espectrofotômetro (Gibreel, Upton, 2013; Mak et al., 2010).

Um inóculo de 10 µL das suspensões foi injetado na lagarta através da última *proleg* inferior esquerda. Foi utilizado um grupo inoculado apenas com PBS para acompanhar o estado de saúde das lagartas de *G. mellonella* durante todo o experimento. Após as inoculações, as lagartas foram armazenadas em placas de Petri e incubadas a 37 °C em estufa bacteriológica. O número de *G. mellonella* mortas foi anotado primeiramente 18 h após a inoculação dos microorganismos e posteriormente a cada 24 h, sendo monitoradas por 7 dias após o início do experimento. As lagartas foram consideradas mortas quando não apresentaram nenhum movimento ao toque. A morte de todas as lagartas do grupo experimental ou a transição para a forma de pupa determinou o término do experimento.

Após o término dos testes envolvendo a criação de *G. mellonella*, foi selecionada a melhor dieta e melhor metodologia de criação, e este protocolo foi padronizado para todos os experimentos seguintes. Este protocolo de criação (ANEXO A) está sendo utilizado no Laboratório de Invertebrados do Departamento de Bociências e Diagnóstico Bucal, no ICT-UNESP.

4.2. Efeitos de *L. rhamnosus* inativado pelo calor na resposta de *G. mellonella* desafiada com *S. aureus* e *E. coli*

4.2.1 Cultivo e preparação das suspensões de *L. rhamnosus* (morto pelo calor), *S. aureus* e *E. coli*

Foi utilizada cepa padrão da espécie *L. rhamnosus* ATCC 7469, que foi semeada em Ágar Man-Rogosa-Shape (MRS- Oxoid,

Basingstroke, Hampshire, England) e cultivada a 37 °C em 5% de CO₂ por 24 h. A partir das colônias isoladas e confirmadas pela coloração de Gram, foi padronizada uma suspensão em PBS estéril e apirogênico até a concentração de 10⁸ células/mL, em espectrofotômetro com comprimento de onda de 540 nm. A suspensão anterior foi autoclavada a 121 °C por 15 min e em seguida, centrifugada por 10 min a 5000 rpm e o *pellet* ressuspenso em PBS estéril e apirogênico.

As suspensões de *S. aureus* e *E. coli*, foram preparadas como descrito no item 4.1.1 e a partir de colônias isoladas e confirmadas pela coloração de Gram. Foi padronizada suspensão dos micro-organismos em PBS estéril e apirogênico até a concentração 10⁹ células/mL, em espectrofotômetro.

4.2.2 Curva de sobrevivência

Foram utilizadas lagartas *G. mellonella* em estágio final da fase larval com peso corporal de aproximadamente de 0,280 a 0,320 g. Antes do estudo da interação de *L. rhamnosus* com *S. aureus* e *E. coli* foi realizada uma análise da susceptibilidade de *G. mellonella* a infecção por esses micro-organismos para determinação da concentração sub-letal de ambas as bactérias nesses animais. Para isso, foram inoculadas em *G. mellonella* várias suspensões padronizadas que variaram de 10⁸ a 10⁵ células/mL. Para cada concentração inoculada, foi utilizado um grupo de 12 lagartas. Um inóculo de 10 µL de cada suspensão foi injetado na lagarta para determinação da curva de sobrevivência, conforme descrito no item 4.1.1.

Para interação de *L. rhamnosus* inativado, *S. aureus* ou *E. coli*, um inóculo de 10 µL da bactéria probiótica padronizada, inativada pelo calor, foi injetado com auxílio de seringas de precisão (Hamilton Inc.,

EUA) na hemolinfa de cada lagarta pela última *proleg* (Figura 3A) esquerda. Após 2 h e 30 min, 10 µL da suspensão padronizada das outras bactérias foram inoculados na última *proleg* direita). Foram realizados grupos controles onde houve a inoculação de apenas um micro-organismo. Para esses grupos foi inoculado 10 µL de PBS. O número de *G. mellonella* mortas foi anotado primeiramente 18 h após a inoculação dos micro-organismos e posteriormente a cada 24 h, sendo monitoradas por 7 dias após o início do experimento. As lagartas foram consideradas mortas quando não apresentaram nenhum movimento ao toque (Figura 3B). A morte de todas as lagartas do grupo experimental ou a transição para a forma de pupa determinou o término do experimento.

4.2.3 Coleta da hemolinfa

Foram utilizadas lagartas *G. mellonella* em estágio final da fase larval com peso corporal de aproximadamente 0,280 g a 0,320 g. As lagartas foram inoculadas conforme descrito no item 4.2.2 e após 24 h foi realizada eutanásia e coleta da hemolinfa

Para a coleta de hemolinfa as lagartas foram imobilizadas em placa de Petri gelada por cerca de 20 min, em seguida, as lagartas foram cortadas com bisturi na parte ventral (Figura 3C) e espremidas para a retirada da hemolinfa (Figura 3D), que foi coletada em microtubo gelado. Essa hemolinfa foi centrifugada a 9500 xg/10 min a 4 °C e utilizada para as análises.

4.2.3.1 Contagem total dos hemócitos

Foi realizada a contagem total de hemócitos, para observar se o probiótico foi capaz de influenciar seu número na hemolinfa. Para contagem total de hemócitos foi realizada a coleta da hemolinfa, como descrito no item 4.2.3. Após centrifugação, a hemolinfa foi transferida para outro microtubo e o *pellet* foi ressuspendido em 1 mL de IPS (tampão anticoagulante estéril: 150 mM de cloreto de sódio, 5 mM de cloreto de potássio, 10 mM de tris-HCl, pH 6,9, 10 mM de EDTA e 30 mM de citrato de sódio) gelado, foi realizada uma nova centrifugação (9500 xg/ 10 min a 4 °C) e o *pellet* novamente ressuspendido em 1 mL de IPS. A viabilidade celular foi avaliada pelo teste de exclusão, utilizando azul de tripan e a contagem total de hemócitos realizada em contador de células (Countess Cell).

4.2.3.2 Análise da melanização da hemolinfa

Para quantificação da melanização, a hemolinfa coletada conforme item 4.2.3, foi colocada na placa de 96 poços (n = 8) e diluída em IPS (10 µL de hemolinfa em 40 µL de IPS). Após 5 min, foi realizada a leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 405 nm.



Figura 3- Metodologia de infecção e retirada da hemolinfa de lagartas de *G. mellonella*. A) inoculação com auxílio de seringas de precisão (Hamilton Inc., EUA); B) lagartas mortas após infecção- melanização; C) corte na parte ventral entre as últimas *prolegs*, com auxílio de um bisturi; D) retirada da hemolinfa em microtubo gelado.

4.2.3.3 Produção de óxido nítrico

A concentração de óxido nítrico foi determinada com base no reagente de Griess, onde uma alíquota de 100 µL de amostra de hemolinfa foi diluída em 900 µL de IPS e alíquotas de 100 µL das amostras foram colocadas em microplaca de 96 poços (n = 8) e após a mesma quantidade do reagente de Griess foi adicionado. Após dez minutos, a absorbância foi medida em leitor de microplacas com comprimento de onda de 570 nm.

4.3 Efeitos *in vitro* de *L. rhamnonus* inativado pelo calor em macrófagos (RAW 264.7) estimulado por *S. aureus* e *E. coli*

4.3.1 Cultura de macrófagos RAW 264.7

Uma linhagem de macrófagos de camundongos (RAW 264.7) obtida do banco de células da Associação Técnico Científica Paul Ehrlich (APABCAM, Rio de Janeiro, RJ) foi mantida em meio DMEM (LGCBio, São Paulo) completo enriquecido com 10% de soro fetal bovino (Invitrogen) a 37 °C com 5% de CO₂ por 7 dias. Para realização dos testes, foi preparada uma suspensão celular com a remoção mecânica das células aderidas, utilizando varredores de células (*cell scraper* – Corning Costar). Em seguida, o meio de cultura contendo as células foram transferidos para tubos e submetidos à centrifugação (3500 xg, 5 min, 25 °C). O sobrenadante foi descartado e as células (*pellet*) ressuspendidas em meio DMEM completo. A viabilidade celular foi avaliada pelo teste de exclusão, utilizando azul de tripan e contagem das células viáveis pelo contador automático.

4.3.2 Preparação das suspensões de *L. rhamnosus* (morto pelo calor), *S. aureus* e *E. coli*

As cepas de *S. aureus* e *E. coli* foram cultivadas e as suspensões preparadas conforme descrito no item 4.2.1. *L. rhamnosus* na concentração 5×10^7 células/mL, em espectrofotômetro com comprimento de onda de 540 nm e DO 0,40. *S. aureus* e *E. coli*, 10^8 células/mL, padronizadas em espectrofotômetro.

4.3.3 Exposição das células às bactérias

Foram distribuídos 5×10^5 células viáveis de macrófagos em microplacas de poliestireno de 24 poços, e acrescentado meio DMEM completo até o volume final de 1 mL. As placas foram incubadas por 24 h a 37 °C e 5% de CO₂, para a aderência celular. As células não aderidas foram removidas através de duas lavagens com soro fisiológico estéril e apirogênico. Foram acrescentados 500 µL de meio DMEM enriquecido com 10% de soro fetal bovino (Cross et al., 2004; Jorjão et al., 2015).

Alíquotas de 500 µL da suspensão probiótica foram adicionadas juntamente aos poços da microplaca contendo as células, totalizando volume final de 1 mL. Para o grupo controle foram acrescentados 500 µL de solução fisiológica estéril e apirogênica e 500 µL de meio DMEM. Em seguida, as placas foram incubadas por um período de 2 h e 30 min a 37 °C e 5% de CO₂.

Após esse período, o conteúdo das placas foi removido e passou por nova lavagem com soro fisiológico estéril e apirogênico. Em seguida, foram adicionados 500 µL de meio DMEM e 500 µL de uma das suspensões das bactérias (*S. aureus* ou *E. coli*). Para o grupo controle foram acrescentados 500 µL de solução fisiológica estéril e apirogênica e

500 µL de meio de cultura. As placas foram novamente incubadas por um período de 2 h e 30 min a 37 °C e 5% CO₂. As placas foram lavadas e foi acrescentado 1 mL de meio DMEM com antibiótico a 1% e incubadas por 16 h a 37 °C e 5% CO₂. Os sobrenadantes das células foram coletados, aliquotados e congelados em freezer (-20 °C) para posterior análise das citocinas e óxido nítrico.

Os testes foram realizados em triplicata, sendo 4 repetições em cada, totalizando 12 amostras para cada grupo experimental. Sendo os grupos experimentais: a) cultura de células apenas com lactobacilos inativado; b) cultura celular com lactobacilos e posteriormente *S. aureus*; c) cultura celular com lactobacilos e posteriormente *E. coli*; d) cultura celular somente com *S. aureus*; e) cultura celular somente *E. coli*; f) grupo controle onde os macrófagos não sofreram estímulo.

4.3.4 Detecção e quantificação de citocinas pró e anti-inflamatórias

A quantificação de citocinas foi realizada pelo teste imunoenzimático (ELISA). Para tanto, placas de microtitulação de 96 poços (Nunc) foram sensibilizadas com anticorpos de captura específicos para cada citocina de camundongo (anti-TNF- α , anti-IL-1 β , anti-IL-6, anti-IL-10, anti-IL-12) (R & D Systems, NE), sendo 100 µL/poço. As placas permaneceram *overnight* em temperatura ambiente.

Posteriormente, as placas foram lavadas com 300 µL de Tampão de Lavagem (PBS acrescido de 0,05% de Tween 20) por três vezes. As placas foram bloqueadas com tampão de bloqueio. As placas foram mantidas em temperatura ambiente por uma hora. Após os procedimentos de lavagem, foram adicionados nas placas 100 µL do padrão de citocinas (curva-padrão) ou 100 µL das amostras

(sobrenadantes da cultura celular). Os testes foram realizados em duplicata. As placas foram mantidas por duas horas em temperatura ambiente. Em seguida, foram acrescentados 100 μL de anticorpo de detecção (anti-TNF- α , anti-IL-1 β , IL-6, anti-IL-10 ou anti-IL-12) marcado com biotina. Após 2 h em temperatura ambiente, foram adicionados 100 μL de estreptavidina conjugada com enzima peroxidase. As placas foram cobertas com papel alumínio e mantidas em temperatura ambiente por 20 min.

Para revelar a reação, foram adicionados 100 μL da solução de substrato cromogênico, composto por Reagente A (peróxido de hidrogênio) e Reagente B (tetrametilbenzidina) na proporção de 1:1. As placas foram mantidas cobertas com papel alumínio, à temperatura ambiente por 20 min. Logo após foram adicionados 50 μL da solução de parada da reação (ácido sulfúrico 2N). As placas foram imediatamente levadas ao leitor de microplacas, com comprimento de onda de 450 nm. Os valores de DO de cada citocina foram convertidos para pg/mL pelo programa GraphPadPrism 6.0.

4.3.5 Detecção e quantificação de óxido nítrico

A produção de óxido nítrico nos sobrenadantes de cultura de macrófagos foi determinada indiretamente pela concentração de nitrito detectada pelo reagente de Griess (03553-Sigma-Aldrich). As amostras (100 μL) dos sobrenadantes foram acrescentados aos poços de uma placa de 96 poços, a seguir o mesmo volume do reagente de Griess (03553-Sigma-Aldrich) foi acrescentado. Após 10 min, a leitura foi realizada utilizando leitor de microplacas com comprimento de onda 570 nm. Para o cálculo da concentração do nitrito, foram utilizadas amostras padrão de nitrito de 100 μM a 0,781 μM constituindo uma curva-padrão.

4.3.6 Contagem de UFC/mL de *S. aureus* e *E. coli*, após contato do *L. rhamnosus* com macrófagos:

Para avaliar a influência dos lactobacilos inativados sobre a atividade fagocítica dos macrófagos, as células foram distribuídas em microplacas de poliestireno de 96 poços (TPP), sendo que em cada poço foram colocadas 2×10^4 células viáveis e meio DMEM completo até obter o volume final de 200 μ L. As placas foram incubadas por 24 h a 37 °C e 5% de CO₂, para a aderência celular. As células não aderidas foram removidas através de duas lavagens com soro fisiológico estéril e apirogênico. Foram acrescentados 100 μ L de meio DMEM enriquecido com 10% de soro fetal bovino e alíquotas de 100 μ L da suspensão probiótica foram adicionadas juntamente aos poços da microplaca contendo as células, totalizando volume final de 200 μ L. Para o grupo controle foram acrescentados 100 μ L de solução fisiológica estéril e apirogênica. Em seguida, as placas foram incubadas por um período de 2 h e 30 min a 37 °C e 5% CO₂.

Após esse período, as placas tiveram seu conteúdo removido e passaram por nova lavagem com soro fisiológico estéril e apirogênico. Em seguida, foram adicionados 100 μ L de meio DMEM e 100 μ L de uma das suspensões bacterianas (*S. aureus* ou *E. coli*). Para o grupo controle foram acrescentados 100 μ L de solução fisiológica estéril e apirogênica. As placas foram novamente incubadas por um período de 30 min a 37 °C e 5% CO₂.

Depois de 30 min (melhor tempo obtido após prévia análise), 100 μ L do sobrenadante foi recolhido e realizadas diluições seriadas e todas as diluições semeados em triplicata em Ágar BHI (20 μ L) e incubados a 37 °C por 48 h para posterior contagem do número de unidades formadoras de colônia.

4.4 Análise estatística

Os resultados foram analisados estatisticamente pela análise de variância ANOVA, complementado pelo teste de Tukey. A curva de morte e estimativa das diferenças na sobrevivência foi determinada pelo teste de Log-rank (Mantel-Cox). O nível de significância adotado em todas as análises foi 5% ($p \leq 0,05$) e foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism 6.0.

5 RESULTADOS

5.1 Criação de *Galleria mellonella* com diferentes dietas

5.1.1 Duração da fase larval

Pode-se observar na Tabela 1 que a duração da fase larval se diferenciou em alguns dias dentre os grupos estudados, sendo que o menor intervalo foi obtido quando as lagartas foram alimentadas com pólen, não se diferenciando estatisticamente do grupo FUBÁ. O maior intervalo observado foi o do grupo AVEIA, não havendo diferença estatística em relação ao grupo EMBRAPA, sendo este também maior estatisticamente em relação ao grupo PÓLEN e FUBÁ.

5.1.2 Viabilidade das lagartas (% de pupas no último instar)

Em relação a porcentagem de pupas que se formam durante o estágio larval, pode-se observar na Tabela 1, que quando as lagartas são alimentadas com a ração EMBRAPA, é observado maior formação de pupas durante esse período, sendo estatisticamente superior aos demais grupos onde no grupo AVEIA foi encontrada a menor porcentagem.

5.1.3 Peso no último estágio larval

Na Tabela 1 estão demonstrados os valores médios dos pesos das lagartas no último estágio larval, não havendo diferença estatística ($p \leq 0,05$) entre a média dos pesos das lagartas no último estágio, alimentadas com as rações EMBRAPA ou AVEIA. Também pode-se observar que o peso das lagartas alimentadas com ração FUBÁ foi maior no último estágio larval, não se diferenciando estatisticamente das alimentadas com PÓLEN.

5.1.4 Volume da hemolinfa e contagem total dos hemócitos

Os valores do volume de hemolinfa e contagem total de hemócitos estão demonstrados na Tabela 1. Pode-se observar que não houve diferença estatística entre o volume de hemolinfa e contagem total de hemócitos entre os grupos de lagartas, no último estágio larval, alimentadas com as rações EMBRAPA ou AVEIA ($p > 0,05$). Sendo o volume encontrado nestes grupos experimentais estatisticamente menor ($p < 0,05$) em relação aos grupos FUBÁ e PÓLEN, os quais foram estatisticamente semelhantes entre si ($p > 0,05$).

5.1.5 Susceptibilidade à infecção experimental (Curva de sobrevivência)

As porcentagens de sobrevivência das lagartas podem ser observadas na Tabela 2 e nas figuras 4A, 4B. Apesar de haver diferença nas porcentagens de sobrevivência das lagartas em cada grupo

estudado, não houve diferença estatística ($p>0,05$) entre nenhum dos grupos, para nenhum dos micro-organismos estudados.

Tabela 1- Valores médios e desvio-padrão para cada grupo experimental durante o período de experimento do ciclo larval de *G. mellonella*

Ração	Peso (g)	Fase larval (dias)	% Pupa	Volume da Hemolinfa (μL)	Contagem total de Hemócitos ($\times 10^6/\text{mL}$)
Embrapa	$0,277 \pm 0,031^a$	$42 \pm 1,53^a$	$15,2 \pm 1,70^a$	$20 \pm 4,57^a$	$2,4 \pm 0,294^a$
Aveia	$0,278 \pm 0,019^a$	$49 \pm 2,52^b$	$4 \pm 1,29^b$	$23 \pm 5,29^a$	$2,8 \pm 0,171^a$
Fubá	$0,365 \pm 0,033^b$	$35 \pm 2,00^c$	$8,4 \pm 0,84^c$	$48 \pm 4,20^b$	$5,7 \pm 0,432^b$
Pólen	$0,382 \pm 0,032^b$	$32 \pm 1,53^c$	$6,8 \pm 0,47^{bc}$	$53 \pm 4,35^b$	$6,14 \pm 0,110^b$

Tabela 2 - Porcentagem de sobrevivência de *G. mellonella* a infecção por *S. aureus* e *E. coli*, nos diferentes grupos experimentais

Grupos	% de sobrevivência	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
Embrapa	41,67	33,33
Aveia	41,67	41,67
Fubá	50	58,33
Pólen	58,33	58,33

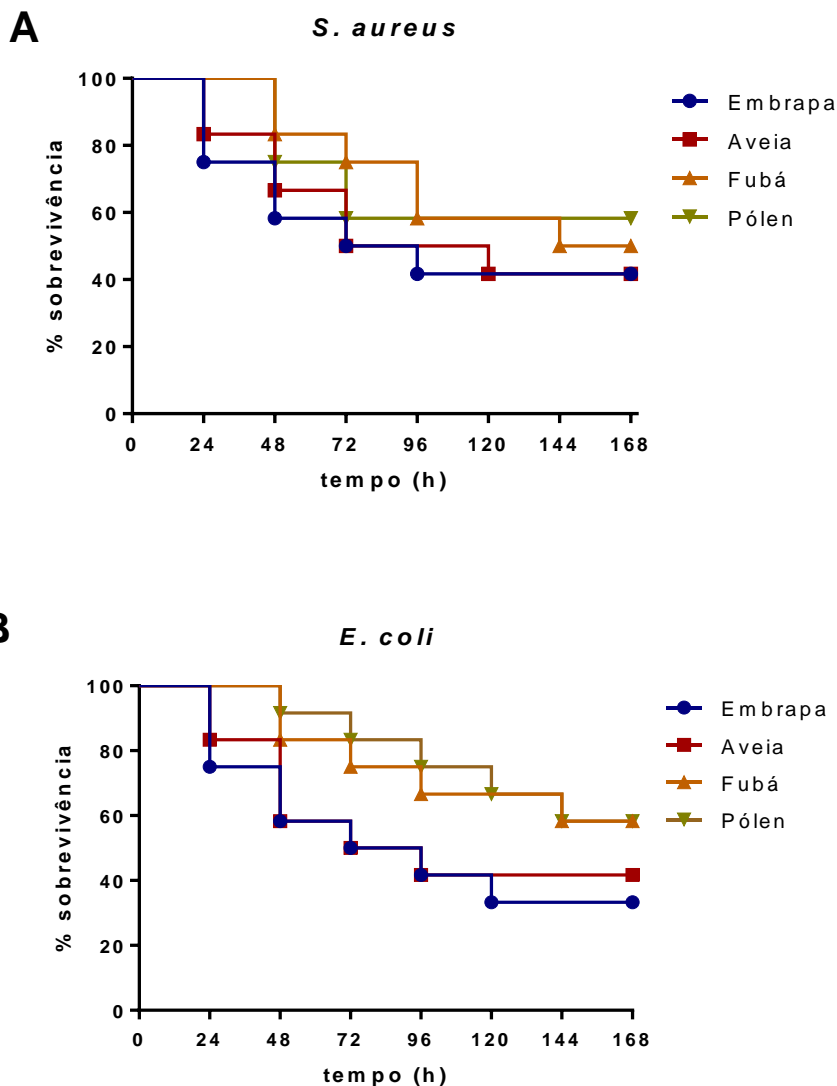


Figura 4- Curva de sobrevivência de *G. mellonella* a infecção por bactérias nos diferentes grupos experimentais: EMBRAPA, AVEIA, FUBÁ e PÓLEN. A) curva de sobrevivência de *G. mellonella* quando inoculadas com *S. aureus* nos diferentes grupos experimentais; B) Curva de sobrevivência de *G. mellonella* quando inoculadas com *E. coli*

5.2 Efeitos de *L. rhamnosus* inativado pelo calor na resposta de *G. mellonella* desafiada com *S. aureus* e *E. coli*

5.2.1 Determinação da concentração sub-letal de *S. aureus* e *E. coli* nesses animais

Antes do estudo da interação de *L. rhamnosus* com *S. aureus* e *E. coli* foi realizada uma análise da susceptibilidade de *G. mellonella* a infecção por esses micro-organismos para determinação da concentração sub-letal de *S. aureus* e *E. coli*. Como podemos observar na figura 5 (A, B), a concentração de 10^9 células/ mL foi letal para os animais, e então para o estudo da interação foi utilizada a padronização dos micro-organismos a 10^8 células/ mL.

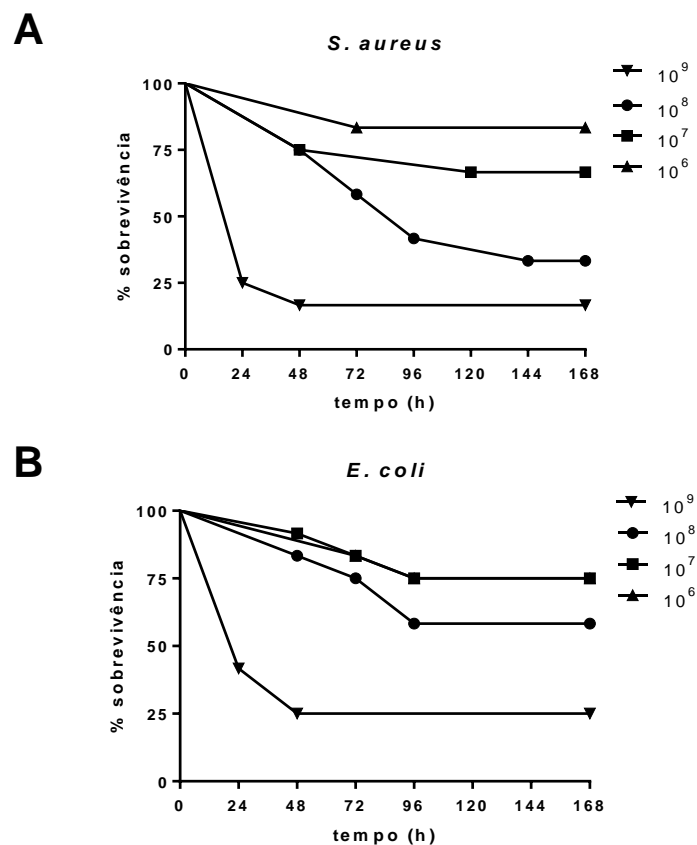


Figura 5- Curva de susceptibilidade de *G. mellonella* a *S. aureus* e *E. coli*. A) curva de sobrevivência de *G. mellonella* quando inoculada com diferentes suspensões (10^9 a 10^6 células/ mL) de *S. aureus*; B) curva de sobrevivência de *G. mellonella* quando inoculada com diferentes suspensões (10^9 a 10^6 células/mL) de *E. coli*

5.2.2 Curva de sobrevivência

Os números de lagartas mortas durante a infecção por *S. aureus* e *E. coli*, nos diferentes tempos e grupos experimentais e porcentagem de sobrevivência ao final do experimento estão demonstrados na tabela 3. As figuras 6A e 6B demonstram que não houve diferença estatística entre os grupos tratados previamente com *L. rhamnosus* e os somente infectados com as bactérias ($p > 0,05$). O grupo *L. rhamnosus* diferenciou-se estatisticamente dos demais grupos, não havendo morte significativa das lagartas ($p \leq 0,05$). Apesar de não haver diferença estatística pode-se observar que houve morte das lagartas com 24 h, quando não foram inoculadas previamente com os lactobacilos inativados.

Tabela 3 - Porcentagem de sobrevivência de *G. mellonella* durante infecção por *S. aureus* e *E. coli*, nos diferentes grupos experimentais, com ou sem prévia inoculação com *L. rhamnosus* inativados

Controle	<i>L. rhamnosus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. rhamnosus</i> <i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>L. rhamnosus</i> <i>E. coli</i>
100%	87,5%	50%	58,33%	58,33%	75%

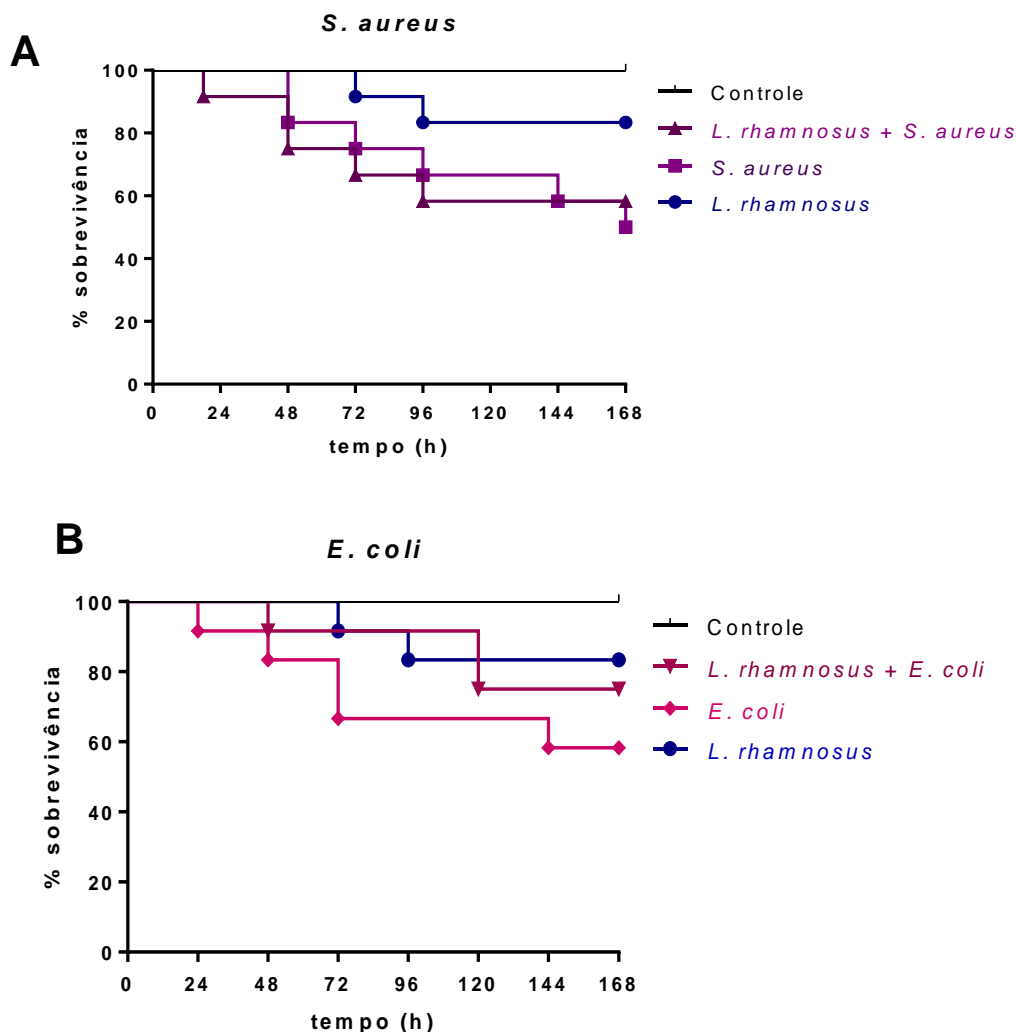


Figura 6 - Curva de sobrevivência da lagarta *G. mellonella* quando inoculadas com bactérias, *S. aureus* e *E. coli*, com ou sem prévia inoculação de *L. rhamnosus* inativado. A) Curva de sobrevivência de *G. mellonella* ao *S. aureus*, com ou sem prévia inoculação de *L. rhamnosus* inativado; B) Curva de sobrevivência de *G. mellonella* a *E. coli*, com ou sem prévia inoculação de *L. rhamnosus*

5.2.3 Contagem total dos hemócitos

Na figura 7, observou-se que a maior contagem de hemócitos foi encontrada nos grupos em que as lagartas foram inoculadas previamente com *L. rhamnosus* e a maior contagem foi encontrada quando foram inoculadas somente com *S. aureus*, se

diferenciando estatisticamente dos demais grupos (controle, *L. rhamnosus*, *S. aureus*) ($p < 0,05$). Apesar de não haver diferença estatística, o grupo que sofreu ação somente dos *L. rhamnosus* houve uma diminuição na contagem total de hemócitos em relação ao controle. Houve diferença estatística também entre os grupos inoculados com *E. coli* com ou sem prévia inoculação de lactobacilos em relação ao controle ($p < 0,05$).

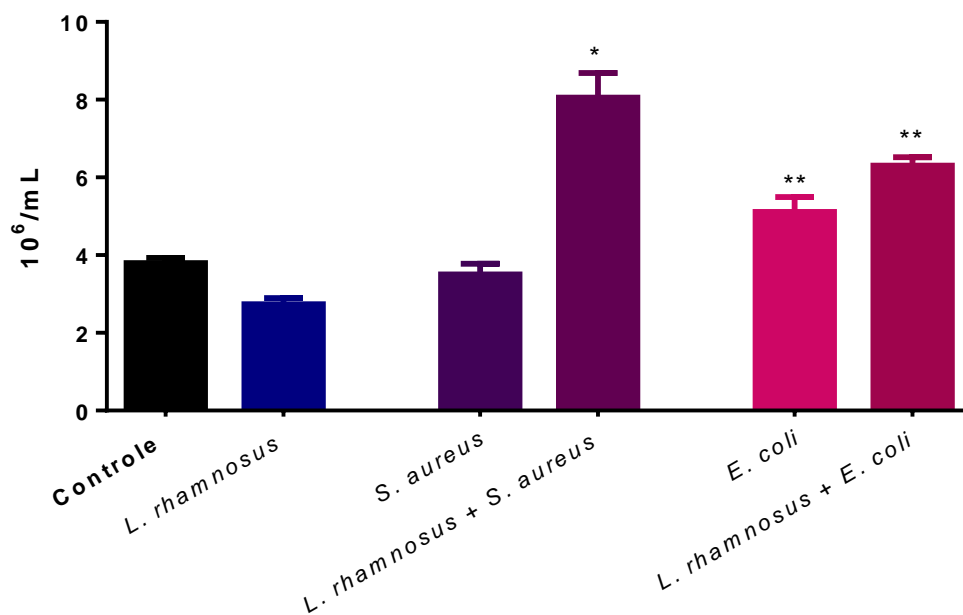


Figura 7- Médias e desvio padrão da contagem total de hemócitos na hemolinfa de *G. mellonella* 24 h após inoculação de *S.aureus* e de *E. coli* com ou sem prévia inoculação de *L. rhamnosus*.

5.2.4 Melanização da hemolinfa

Na figuras 8 pode-se observar maior melanização ($p < 0,05$) nos grupos estimulados com lactobacilos e infectados pelas bactérias. A melanização no grupo inoculado com *S. aureus* foi maior

estaticamente que os grupos controle e somente *L. rhamnosus* ($p < 0,05$). No grupo somente estimulado com *L. rhamnosus* a melanização não se diferenciou estatisticamente do grupo controle ($p > 0,05$). O grupo *L. rhamnosus* + *S. aureus* apresentou maior densidade ótica, sendo superior estatisticamente em relação a todos os demais grupos.

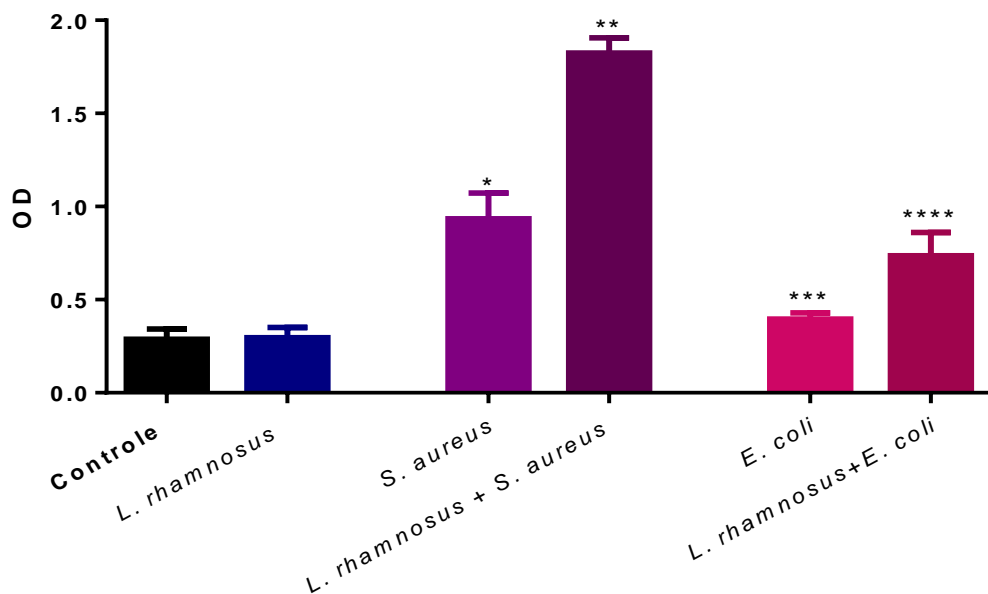


Figura 8- Médias e desvio padrão das densidades ótica (DO) da melanização produzida em lagartas infectadas com *S. aureus* ou *E. coli*, com ou sem prévia inoculação de *L. rhamnosus*, após 24 h.

5.2.5 Óxido nítrico

Na figura 9 pode-se observar que o único grupo que diferenciou estatisticamente ($p \leq 0,05$) do controle foi o inoculado com *S. aureus* após prévia inoculação de *L. rhamnosus* inativado.

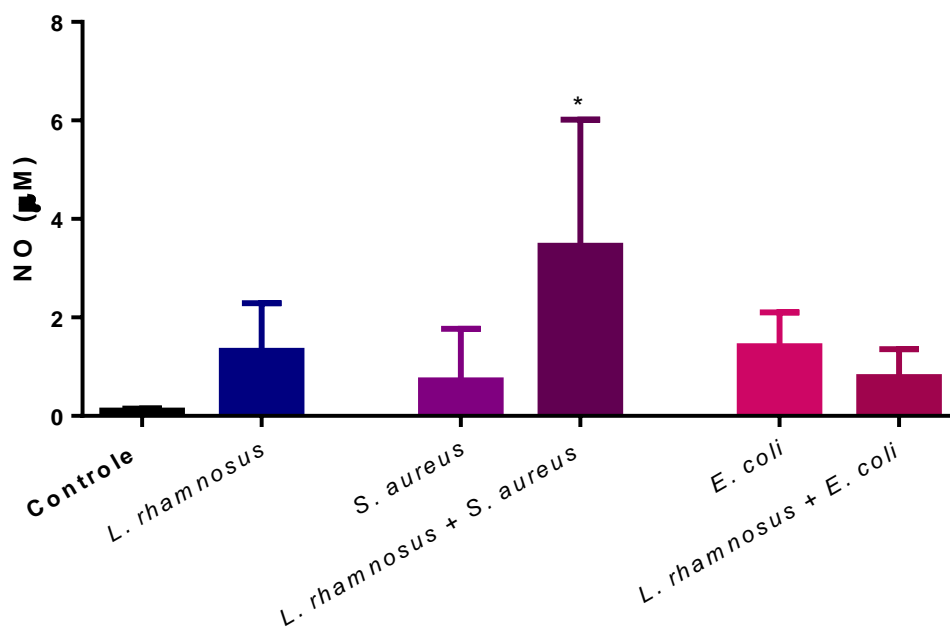


Figura 9- Médias e desvio padrão das concentrações (μM) de óxido nítrico (NO) na hemolinfa de lagartas infectadas com *S. aureus* ou *E. coli*, com ou sem prévia inoculação de *L. rhamnosus*, após 24 h.

5.3 Efeitos *in vitro* de *Lactobacillus rhamnosus* inativado pelo calor em macrófagos (RAW 264.7) estimulado por *S. aureus* e *E. coli*

5.3.1 Detecção e quantificação de citocinas

A figura 10 demonstra diferenças significativas da produção TNF- α em todos os grupos estudados em relação ao controle ($p \leq 0,05$). Sendo que o grupo *L. rhamnosus* foi estatisticamente superior ao grupo estimulado com *S. aureus* e o grupo controle ($p \leq 0,05$) e semelhante aos grupos estimulados por *E. coli* ($p > 0,05$).

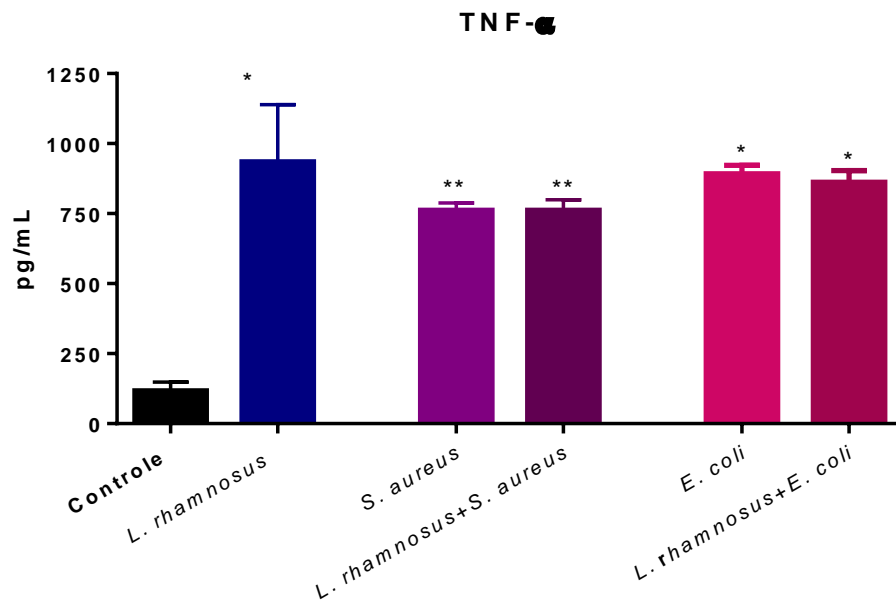


Figura 10- Médias e desvio padrão das concentrações de TNF- α (pg/mL) nos sobrenadantes, após 16 h, da cultura de macrófagos estimulados por *S. aureus* ou *E. coli*, com ou sem prévia estimulação com *L. rhamnosus*, detectadas pelo teste imunoenzimático ELISA.

Na figura 11 em relação a IL-1 β o grupo *L. rhamnosus* não foi capaz de induzir produção estatisticamente significativa desta citocina, sendo semelhante ao controle ($p > 0,05$). Nos grupos *S. aureus* e *S. aureus* após estímulo de *L. rhamnosus*, essa produção foi maior estatisticamente em relação ao controle ($p \leq 0,05$). Nos grupos estimulados com *E. coli*, onde a produção desta citocina foi significativamente maior ($p \leq 0,05$) que em relação a todos os grupos.

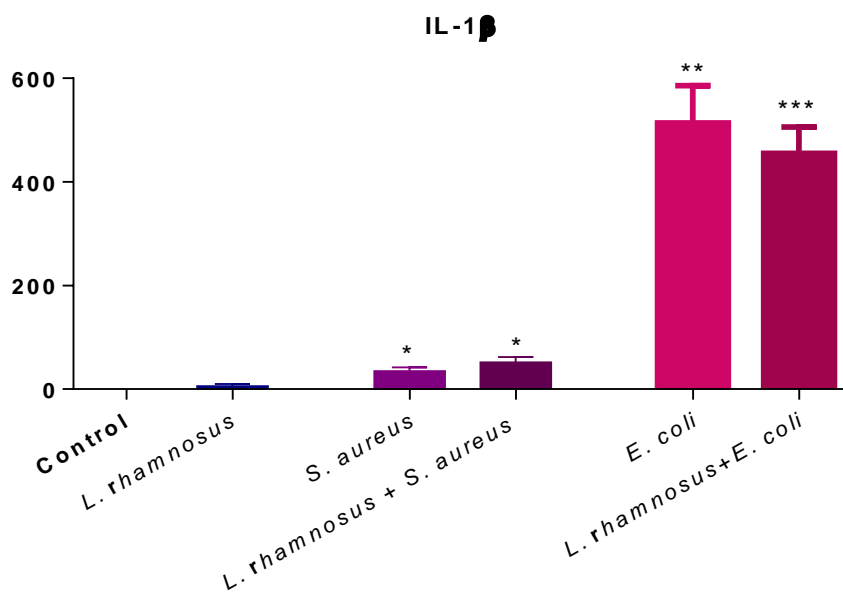


Figura 11- Médias e desvio padrão das concentrações de IL-1 β (pg/mL) nos sobrenadantes, após 16 h da cultura de macrófagos estimulados por *S. aureus* ou *E. coli*, com ou sem prévia estimulação com *L. rhamnosus*, detectadas pelo teste imunoenzimático ELISA.

Em relação a IL-6 (Figura 12) não foi observada produção significativa pelo grupo *L. rhamnosus*, sendo que nos demais grupos a produção desta citocina foi estatisticamente superior ($p \leq 0,05$), havendo um aumento significativo no grupo *L. rhamnosus* com *S. aureus* a em relação ao *S. aureus*. Nos grupos estimulados com *E. coli* a produção foi maior estatisticamente ($p \leq 0,05$) em relação a todos os demais grupos.

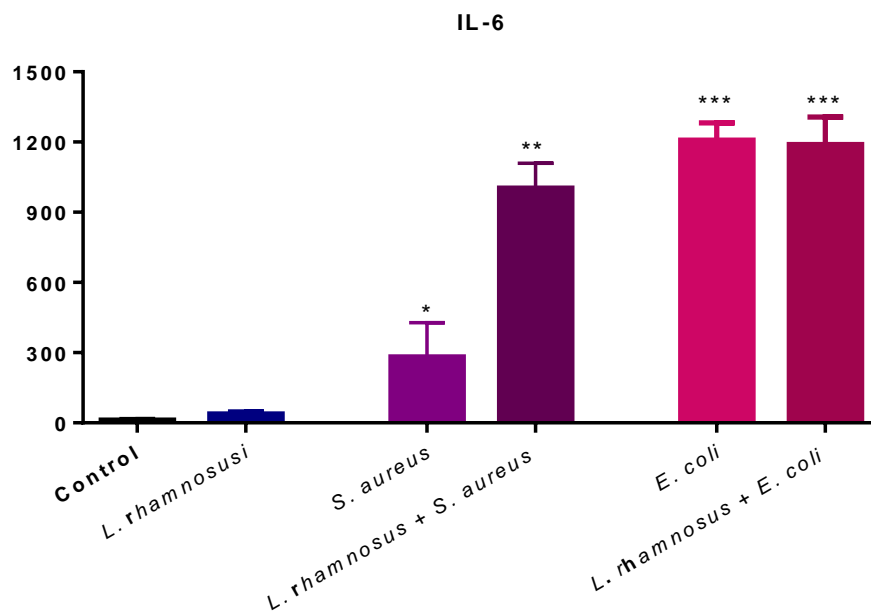


Figura 12- Médias e desvio padrão das concentrações de IL-6 (pg/mL) nos sobrenadantes após 16 h, da cultura de macrófagos estimulados por *S. aureus* ou *E. coli*, com ou sem prévia estimulação com *L. rhamnosus*, detectadas pelo teste imunoenzimático ELISA.

Em relação a IL-12, pode-se observar na figura 13 baixa produção em todos os grupos, sendo todos os grupos foram estatisticamente semelhantes ao grupo controle ($p > 0,05$).

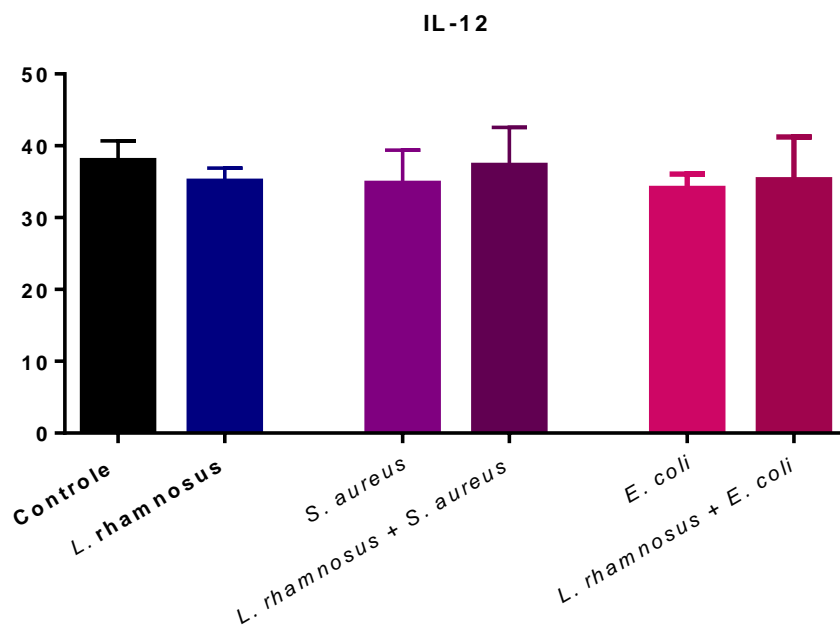


Figura 13 - Médias nas concentrações de IL-12 (pg/mL) nos sobrenadantes, após 16 h, da cultura de macrófagos estimulados por *S. aureus* ou *E. coli*, com ou sem prévia estimulação com *L. rhamnosus*, detectadas pelo teste imunoenzimático ELISA.

Em relação a IL-10, pode-se observar na figura 14, que não houve produção significativa ($p > 0,05$) desta citocina pelo *L. rhamnosus* apenas, mas nos grupos estimulados pelas bactérias a produção foi significativamente maior que o grupo controle ($p \leq 0,05$).

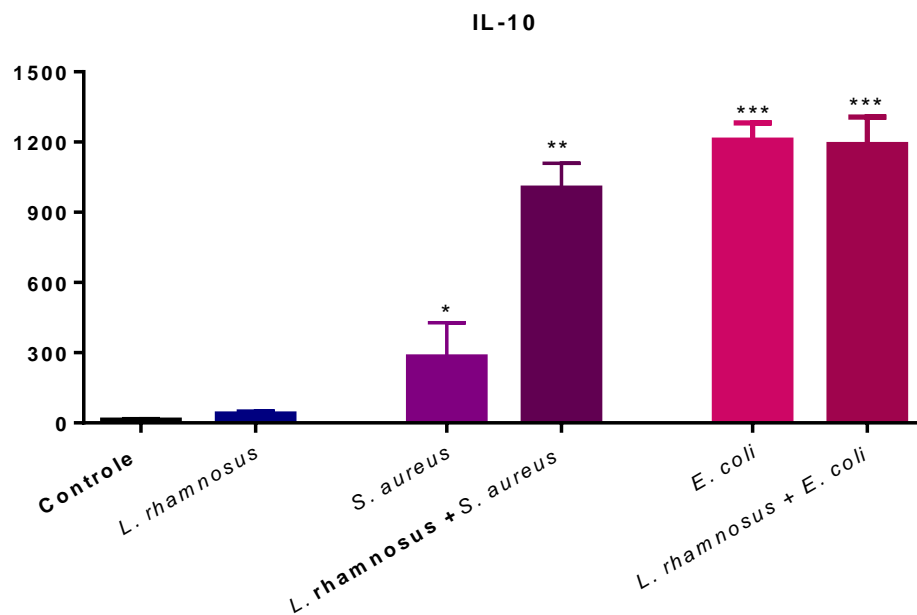


Figura 14 - Médias nas concentrações de IL-10 (pg/mL) nos sobrenadantes, após 16 h, da cultura de macrófagos estimulados por *S. aureus* ou *E. coli*, com ou sem prévia estimulação com *L. rhamnosus*, detectadas pelo teste imunoenzimático ELISA.

5.3.2 Óxido nítrico

A figura 15 demonstra que a produção de óxido nítrico foi maior nos grupos em que as células sofreram estímulo por *S. aureus*, diferenciando estatisticamente ($p \leq 0,05$) dos grupos controle, somente estimulado com lactobacilos e estimulados com *E. coli*. Sendo que nos grupos estimulados com *E. coli*, essa produção foi estatisticamente menor ($p \leq 0,05$) que o grupo somente estimulado pelo lactobacilos.

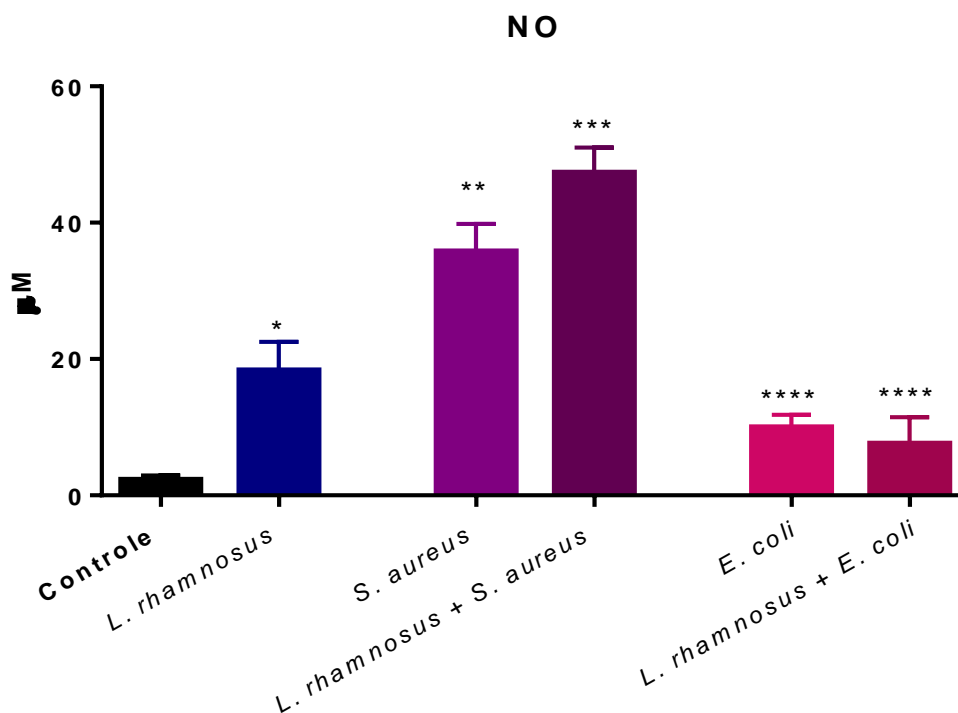


Figura 15 - Concentração (μM) de óxido nítrico (NO) no sobrenadante de macrófagos RAW 264.7, cultivados em contato com *S. aureus* ou *E. coli*, por 2 h e 30 min, com ou sem estímulo prévio de *L. rhamnosus* inativado pelo calor também por 2 h e 30 min.

5.3.3 Contagem total de unidades formadoras de colônia:

Em relação a influência dos lactobacilos mortos pelo calor na contagem total de UFC/mL das bactérias, pode-se observar que a quantidade de UFC/ mL foi menor nos grupos em que houve primeiro estímulo por *L. rhamnosus* inativados pelo calor, em relação a aqueles em que não houve o contato da célula com o lactobacilos. Como podemos observar nas figura 16, houve diferença estatística ($p \leq 0,05$) na contagem de unidade formadoras de colônia nos grupos onde o micro-organismo foi cultivado somente com as células e aquela em que as células sofreram ação de *L. rhamnosus*, sugerindo que os lactobacilos foram capazes de aumentar a capacidade fagocitária dos macrófagos.

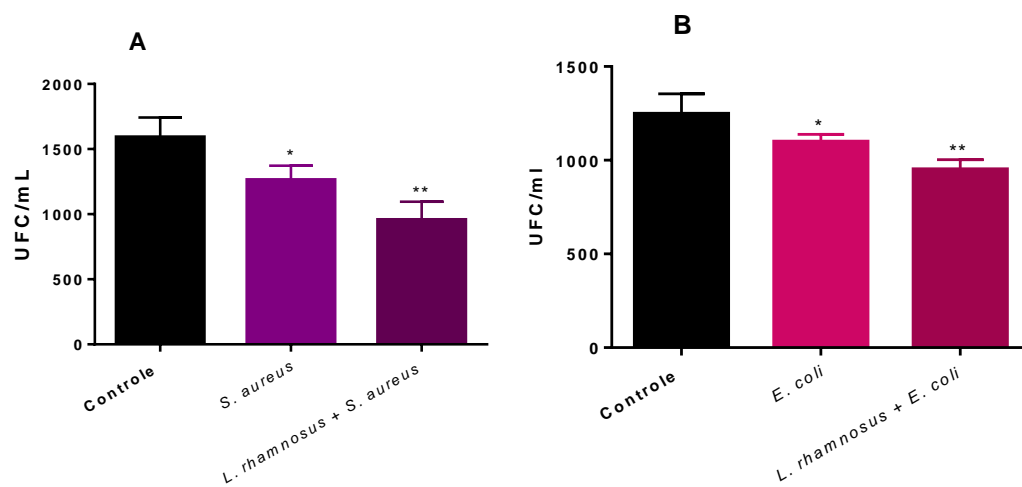


Figura 16 - Média e desvio padrão da contagem de unidades formadoras de colônia UFC/mL (10^5) obtidos após cultivo de macrófagos com as bactérias, com ou sem prévio estímulo do *L. rhamnosus*. A) Média e desvio padrão dos dados de UFC/mL obtidos após cultivo das células com *S. aureus* por 30 min, com ou sem prévio estímulo do *L. rhamnosus*; B) média e desvio padrão dos dados de UFC/mL obtidos após cultivo das células com *S. aureus* por 30 min, com ou sem prévio estímulo do *L. rhamnosus*.

6 DISCUSSÃO

No presente estudo buscamos desenvolver uma metodologia de criação de *G. mellonella* que promovesse melhor desenvolvimento das larvas e avaliar o efeito *in vivo* da bactéria probiótica (*L. rhamnosus* ATCC 7469) inativada pelo calor sobre o modelo *in vivo* (*G. mellonella*) e *in vitro* (macrófagos RAW 264.7), ambos desafiados por *S. aureus* e *E. coli*. Este estudo buscou desenvolver uma metodologia de criação de *G. mellonella*, estabelecendo a ração da dieta que proporcionasse melhor desenvolvimento das lagartas, a fim de obter um modelo padronizado para pesquisas futuras. Para isso, foi acompanhado o desenvolvimento das lagartas desde ovo até o último estágio larval, no qual as lagartas são utilizadas nos experimentos.

Avaliando esses parâmetros, o estudo buscou uma criação onde o tempo de duração do estágio larval (ovo até último estágio) fosse o menor possível, sem alterar o desenvolvimento das lagartas. Pode-se observar que a duração da fase larval se diferenciou em alguns dias dentre os grupos estudados, sendo que o menor intervalo foi obtido quando as lagartas foram alimentadas com pólen, não se diferenciando do grupo FUBÁ, sendo que nas demais rações AVEIA e EMBRAPA, foi observado um aumento significativo neste intervalo. Mohamed et al. (2014) avaliaram a influência de cinco dietas naturais [favo de mel velho (OW), favo de mel velho e adicionado 10% de pólen (OWP), favo de mel novo (NW), favo de mel novo contendo 10% de pólen (NWP), e somente pólen de abelha (BP), no desenvolvimento e mortalidade das lagartas de *G. mellonella*, e observaram que houve variações significativas no desenvolvimento das lagartas. Os autores relataram que o favo novo (NW) demonstrou ser a dieta larval mais pobre

induzindo uma maturação prolongada, além de diminuição na produtividade de ovos, retardando a oviposição e prolongando a duração de todo o ciclo de vida, causando maior mortalidade em todas as fases de vida em geral. Em contraste, alimentando as larvas em dietas com favo envelhecido ou contendo pólen, o desenvolvimento foi afetado positivamente e a vitalidade em todas as fases da vida. O período larval encontrado por esses autores foi mais longo ($114,5 \pm 0,6$ dias) nas lagartas alimentadas somente com favo novo (NW) e essa duração larval diminuiu acentuadamente ($22,7 \pm 0,3$, $27,1 \pm 0,2$, $30,0 \pm 0,6$ e $52,5 \pm 0,3$ dias) nas dietas que continham pólen (BP, OWP, NWP e OW).

Em nosso estudo, onde as rações que não continham alimento natural (mel ou pólen) ou o mel em menor quantidade da lagarta em sua composição, foi observado os maiores intervalos (EMBRAPA 42 dias e AVEIA 49 dias) e sendo que o consumo de alimentos parece estar correlacionado com a duração da fase larval. Neste estudo não foi observado o consumo da ração por esses animais, mas há uma indicação de que os animais tenham preferência pelas dietas contendo mel e pólen e que consumiram mais estas dietas. Isso pode estar relacionado também com a porcentagem de formação de pupas precocemente durante o estágio larval, onde no grupo alimentado com ração EMBRAPA, é observado maior formação de pupas durante esse período, sendo estatisticamente superior aos demais grupos onde no grupo AVEIA foi encontrada a menor porcentagem. Além disso, Krams et al. (2015) destacaram que estudos anteriores demonstram que *G. mellonella* pode ter desenvolvimento larval rápido e maior peso corporal apenas quando se alimentam com dietas de alta qualidade nutricional, mostrando que a má nutrição resultou em diminuição no tamanho do corpo de *G. mellonella* e precoce pupação. Isso sugere que a ração EMBRAPA pode não ser a ideal para alimentar esses animais nos primeiros estágios, em nossas condições.

Também foi levado em consideração em nosso estudo, a obtenção de uma quantidade grande de lagartas e que estas formassem grupos homogêneos em tamanhos e pesos maiores que as geralmente utilizadas em nossos experimentos, para que conseguíssemos obter maior quantidade de amostras (tecido e hemolinfa) para os experimentos. Os grupos FUBÁ e PÓLEN, em que o peso das lagartas no último estágio larval foi de 0,365 g e 0,382 g, apresentaram pesos significativamente maiores que os grupos EMBRAPA (0,277 g) e AVEIA (0,278 g). Coskun et al. (2006) avaliaram o efeito de diferentes quantidades de favo de mel (0, 25, 50, 100, 200 ou 300 g) e troca de mel por sacarose (0, 5, 10, 15 ou 20%) em uma dieta artificial (500 g de farelo, 300 mL de glicerina, 200 g favo de mel, 150 mL água pura e 150 mL de mel) sobre o desenvolvimento das lagartas durante 3, 7 e 10 dias. Eles observaram que as lagartas podem tolerar diferentes dietas sem graves problemas durante o seu desenvolvimento, pois todas completaram seu crescimento, entretanto, foi observada perda de peso na dieta que não continha mel. Especialmente nas relações em que a quantidade de favo de mel é mais baixa do que o controle, foi relatada uma deficiência nutricional e, como consequência pupação precoce. Isso não foi observado quando houve um aumento da quantidade de favo de mel na dieta (50%).

Observa-se que o aumento de peso é diretamente proporcional com a quantidade de favo de mel e estes dados podem auxiliar na compreensão dos nossos estudos, pois as dietas em que não apresentam nenhum alimento natural desses animais (EMBRAPA) ou mel em menor quantidade (AVEIA), o ganho de peso foi bem menor e o desenvolvimento mais lento. O efeito negativo da remoção do favo de mel a partir da dieta (com diferentes razões) sobre o desenvolvimento mostraram que estas dietas não podem dar aos insetos suas necessidades nutricionais corretamente. As dietas devem oferecer compostos nutricionais tais como carboidratos, proteínas e lipídios e esta

é a razão da perda de peso nas dietas, as quais não inclui mel e sacarose (Coskun et al., 2006).

Niemierko e Wlodawer (1950) relataram a necessidade de proteína nas dietas dessas lagartas e que a cera de abelha somente não oferece a quantidade necessária de proteína. Por isso geralmente não são encontradas criações de *G. mellonella* somente alimentadas com cera de abelha e em condições laboratoriais as lagartas se desenvolvem bem em várias dietas artificiais em que a cera é substituído com carboidratos (Dadd, 1964). Nas rações estudadas foram utilizadas diferentes fontes de carboidratos e proteínas, sendo a ração da EMBRAPA rica em carboidrato, mas fraco em energia, a ração de AVEIA rica em proteína, ração de FUBÁ rica em carboidrato e energia e o PÓLEN é um alimento nutritivos completo, rico em proteína. Além disso a variação na composição desses alimentos pode ter ocasionado diferenças no consumo e capacidade digestiva das lagartas e isso pode ter ocasionado a variação de peso e ciclo larval.

Os resultados do presente estudo, demonstraram que não houve diferença entre o volume de hemolinfa e contagem total de hemócitos entre os grupos de lagartas, no último estágio larval, alimentadas com as rações EMBRAPA ou AVEIA, rações com baixa energia, sendo o volume encontrado nestes grupos experimentais inferiores aos grupos FUBÁ e PÓLEN, rações com alto valor nutricional, sendo que o grupo alimentado somente com pólen apresentou maior volume de hemolinfa e maior contagem total de hemócitos. Outros estudos demonstraram que uma dieta rica em proteínas geralmente aumenta a quantidade de hemócitos e níveis de fenoxidase e conseqüentemente melanização e encapsulamento (Washburn et al., 1996; Trudeau et al., 2001). Com isso nossos resultados demonstraram que a produção de hemolinfa e hemócitos, foi proporcional ao peso e tamanho das lagartas.

Quando as lagartas receberam as diferentes rações, foram submetidas a infecções experimentais por *S. aureus* e *E. coli* e, apesar de não haver diferença estatística nas curvas de sobrevivência, foi observada diferença nas porcentagens de sobrevivência das lagartas, sendo que em todos os grupos alimentados com ração da EMBRAPA ou AVEIA, para os 2 micro-organismos, essa porcentagem foi menor. Também foi demonstrado que houve uma resistência inicial a infecção nas primeiras horas nos grupos alimentados com FUBÁ e PÓLEN, para as 2 bactérias, sendo observada a primeira morte com 48 h e nos grupos EMBRAPA e AVEIA houve morte de lagartas já com 24 h. Isso também pode estar relacionado com o tamanho do corpo da lagarta e a quantidade de hemolinfa e hemócitos que auxiliam na defesa desse organismo, o que mostra a importância de relatar o peso das lagartas nos estudos.

Durante o ciclo de vida das lagartas, quando alimentadas com ração da EMBRAPA, foi observado um crescimento mais vagaroso e menor agilidade dessas lagartas, quando comparadas as demais. Também houve grande formação de pupa com as lagartas em estágios de desenvolvimento precoces, além de apresentarem uma coloração mais escura. No grupo alimentado com a ração de AVEIA foi observado que as lagartas se desenvolveram bem nos primeiros estágios larvais, depois o desenvolvimento foi mais lento, apresentando ao final dos experimentos o maior tempo do ciclo de ovo ao último estágio larval. Os grupos alimentados com a ração de FUBÁ e PÓLEN apresentaram-se muito semelhantes, sendo que houve rápido desenvolvimento larval, coloração mais clara e baixa taxa de pupação precoce. Foi observada a coloração da lagarta, sendo desejado que fossem mais claras, pois um dos testes mais utilizados é o de susceptibilidade a infecção, onde é observada a melanização da lagarta. Em relação a esse parâmetro não foi encontrada muita diferença, sendo que as alimentadas com FUBÁ e PÓLEN ficaram um pouco mais claras. Outro fator importante que foi observado durante

nosso experimento, foi a formação de teias e casulos. Verificou-se que nos grupos FUBÁ e PÓLEN essa formação foi menor, proporcionando maior facilidade na limpeza e manejo das lagartas. Nos grupos EMBRAPA e AVEIA foi observado que os casulos formados foram mais resistentes e com maior formação de teia, dificultando a limpeza das mesmas. Estes dados são apenas qualitativos.

Outro fator observado durante o experimento foi a temperatura para desenvolvimento das lagartas, apesar de não ter registrado, observou-se que em temperaturas baixas (22 °C) o desenvolvimento das lagartas é mais lento, e quando a temperatura estava mais alta (30 °C) as lagartas se desenvolviam muito rapidamente e isso não permitia a homogeneidade dentro do grupo. Isso foi relatado por Cardoso et al. (2007), em que a duração dos estágios imaturos foi inversamente proporcional à temperatura, sendo que para os períodos de desenvolvimento larval foram obtidos valores de 40 dias quando mantidas a 22 °C, 27 °C e 23 a 32 °C. Então, em nossas condições experimentais e para o objetivo deste estudo, a melhor temperatura encontrada foi 28 °C, com as lagartas mantidas em estufa tipo BOD.

Por esse motivo, foi de grande importância avaliar o tamanho e tempo de duração do estágio larval, para que, uma quantidade elevada de lagartas para atender o laboratório e para reprodução fosse obtida, dentro de um tempo hábil para o trabalho. Julgamos, também, de grande importância o tamanho da lagarta, uma vez que as de maior tamanho permitem uma manipulação mais fácil e maior obtenção de hemolinfa e tecidos para as análises. Com isso após o término dos testes envolvendo a criação de *G. mellonella*, foi selecionada a melhor dieta e melhor metodologia de criação, que para nossas exigências foi a ração FUBÁ, por não se diferenciar do Pólen, que favoreceu todos os parâmetros estudados, mas é mais barata para ser utilizada na criação. Foi então desenvolvido um protocolo desenvolvido foi adotado no Laboratório de Invertebrados no ICT-UNESP São José dos Campos.

Em relação aos efeitos de *L. rhamnosus* inativados pelo calor na resposta de *G. mellonella* desafiada com *S. aureus* e *E. coli*, pode-se observar que apesar de não haver diferença estatística entre as curvas de sobrevivência das lagartas, nos grupos inoculados com *L. rhamnosus* antes das bactérias, a porcentagem de sobrevivência foi maior, e as lagartas demora mais para morrer (48 h). Além disso o lactobacilos inativado provocou baixa mortalidade das lagartas (87,5%), não diferenciando estatisticamente do grupo controle. Isso sugere que a inoculação do lactobacilos inativado, antes das bactérias, desencadeou uma resposta imune, em que na maioria das lagartas não causou sua morte e auxiliou na resposta às bactérias, sendo que para algumas essa resposta possa ter sido exacerbada, causando assim sua morte.

Vilela et al. (2015) inocularam uma cepa probiótica de *L. acidophilus* e somente o sobrenadante da suspensão, previamente a infecção por *C. albicans* em *G. mellonella* e observaram um aumento da sobrevivência das lagartas. Além disso, o número de *C. albicans* (UFC/mL) recuperado a partir da hemolinfa de larvas foi menor no grupo inoculado com *L. acidophilus* comparativamente com o grupo controle, sugerindo um aumento na fagocitose deste micro-organismo. Os autores concluíram que *L. acidophilus* ATCC 4356, e somente o sobrenadante da suspensão, foram capazes de proteger *G. mellonella* contra candidose experimental. Desbois e Coote (2011) utilizaram *G. mellonella* para investigar tratamento profiláticos com daptomicina e vancomicina, contra infecção com *S. aureus*. Os autores observaram uma melhora na sobrevivência larval e este efeito protetor foi dose dependente, com maiores doses desses agentes aumentando sobrevivência das larvas. Na literatura não foram encontrados muitos trabalhos utilizando ATCC de *E. coli* em *G. mellonella*, mas estudos com isolados clínicos de linhagens uropatogênicas de *E. coli* (UPEC) usando larvas *G. mellonella*, demonstraram que *G. mellonella* é uma excelente ferramenta para a investigação preliminar de interações patógeno-hospedeiro, da virulência

das cepas de UPEC (Leuko, Raivio, 2012; Alghoribi et al., 2013; Repizo et al., 2015)

Insetos não têm uma resposta adaptativa no sistema imune, mas possuem um sistema imune inato que se baseia em fatores de reconhecimento, que protege de forma eficaz e rápida quando há infecção por micro-organismos e parasitas. Este sistema é altamente desenvolvido e compreende componentes celulares e humorais que podem ser ativados por invasão de corpos estranhos, incluindo patógenos (Hoffmann JA et al., 1995). No mecanismo de defesa celular, os hemócitos são capazes reconhecer as ameaças ao organismo e podem reagir de três maneiras diferentes contra patógenos: fagocitose, formação de nódulos e encapsulamento (Shaurub, 2012). Em nosso estudo, foi observado que a contagem de hemócitos foi maior quando as lagartas foram inoculadas previamente com *L. rhamnosus*. Isso pode ser observado nos dois grupos infectados com as bactérias, mas no grupo em que houve inoculação de *S. aureus*, este aumento foi maior, sugerindo que sendo as duas bactérias (*L. rhamnosus* e *S. aureus*) Gram-positivas, desencadeiam a mesma resposta.

Fuchs et al. (2015) estudaram um tratamento profilático com micafungina em *G. mellonella* infectadas com *S. aureus* (um agente patogênico para o qual o antimicrobiano não demonstra atividade direta). Os autores verificaram que no modelo de *G. mellonella*, o tratamento profilático inibiu ação dos agentes patogênicos e isso foi caracterizado por um aumento de 2,43 vezes em comparação com larvas inoculadas apenas com PBS na densidade de hemócitos. Eles relataram que esse aumento ocorreu 4 h após infecção, e que a densidade hemocitária diminuiu ao longo do tempo, sendo que com 24 h após injeção do antimicrobiano, o aumento não foi significativo sobre PBS. Isso pode explicar porque foi observada a diminuição na contagem de hemócitos quando o grupo que foi inoculado apenas com *L. rhamnosus*, pois essa contagem ocorreu 24 h após a inoculação. Além disso, Gibreel e Upton,

em 2013, relataram que um peptídeo sintético antimicrobiano, que possui uma potente atividade contra micro-organismos Gram-positivos, protegeu a lagarta *G. mellonella* da infecção por *S. aureus*, mas não aumentou a contagem total de hemócitos, após 24 h da infecção e concluíram que a defesa contra a infecção, possa ter sido alcançada pelo aumento na taxa de fagocitose.

Nossos resultados demonstraram que *L. rhamnosus* inativado também pode influenciar essa taxa, e por isso a contagem de hemócitos neste grupo inoculado apenas com a bactéria probiótica, possa não ter aumentado, já que essa bactéria em nosso estudo *in vitro* demonstrou aumentar a fagocitose de macrófagos. Também nos leva a pensar que a densidade hemocitária, nos grupos inoculados com as bactérias, poderia ser maior se fosse realizada a contagem com menos tempo de infecção. Rajendran et al. (2015) estudando o efeito de acetilcolina na patogênese por *C. albicans* em *G. mellonella*, demonstraram que acetilcolina protegeu as lagartas da infecção e que essa proteção ocorreu por meio da melhora da função de hemócitos, demonstrando aumento na contagem total dos hemócitos. Os autores relataram que esse aumento foi observado 4 h após infecção e que em 24 h houve uma diminuição.

G. mellonella possui mecanismo de defesa humoral, onde existem componentes que estão envolvidos no reconhecimento ou são diretamente responsáveis pela resposta imune. Estes componentes são responsáveis pela síntese e liberação de vários peptídeos antibacterianos. Além disso, existem também outros componentes humorais, incluindo lectinas (hemaglutininas) e um sistema de melanina-fenoxidase (PO) responsável pela coagulação da hemolinfa (melanização) e morte de invasores microbianos, bem como parasitas (Shaurub, 2012; Zdybicka-Barabas et al., 2014). Em nosso estudo essa resposta foi avaliada por meio da melanização da hemolinfa e os resultados demonstraram haver desencadeamento desta resposta imune

após inoculação de lactobacilos inativados, observando maior melanização nos grupos estimulados com lactobacilos antes da infecção por bactérias, sugerindo que a inoculação da bactéria inativada desencadeou a sequência de respostas, sem causar a morte da lagarta, modulando essa resposta. No grupo somente estimulado com *L. rhamnosus* inativado a melanização não se diferenciou estatisticamente do grupo controle, reforçando a ideia do uso de lactobacilos inativados e não vivos.

Foi observado em nosso estudo, maior melanização da hemolinfa nos grupos inoculados com *S. aureus*, no tempo de 24 h. Wand et al., 2013 avaliaram a resposta de *G. mellonella* a infecção por diversas cepas *Klebsiella pneumoniae* e relataram que em geral, as cepas que causaram um maior grau de mortalidade das lagartas mostraram aumento nos níveis de melanização. E que as cepas que produziram pouca melanização, tiveram uma atividade inicial fenoloxidase (PO), responsável pela coagulação da hemolinfa, após 60 min, mas que esta atividade não permaneceu após 4 h, sendo que as cepas mais virulentas demonstraram aumento significativo nos níveis de atividade de PO em relação ao controle não infectado. Isso foi observado em nosso trabalho também, onde *S. aureus* demonstrou ser mais patogênico para as lagartas, com maior mortalidade e maior melanização.

Com relação à produção de óxido nítrico, pode-se observar que o único grupo em que houve maior produção de óxido nítrico foi o infectado com *S. aureus* com prévia inoculação do *L. rhamnosus* inativado e observou-se também diminuição, quando as lagartas foram inoculadas com *L. rhamnosus* antes da infecção com *E. coli*, sem diferença estatística. NO é uma molécula importante porque participa em vários processos fisiológicos e patológicos, incluindo a resposta imune aos micro-organismos e parasitas, em insetos. Semenova et al. (2014) relataram que uma análise quantitativa de produção de NO em insetos é mais complicada que em mamíferos devido a uma

desaceleração das atividades metabólicas. Isso impõe exigências específicas sobre os métodos, tais como sensibilidade e especificidade, é que os métodos utilizados não permitem conclusões definitivas sobre os papéis funcionais de NO na hemolinfa de larvas de *G. mellonella*. Também em 2007, Whitten et al. observaram que a resposta imune mediada por NO em insetos são específicas para cada patógeno e que através da inoculação de LPS, foi mais observada no corpo de gordura e hemócitos. Por isso a detecção deste mediador possa não ter sido observada, sendo que foi avaliada somente a produção de NO na hemolinfa da lagarta.

Com relação aos efeitos *in vitro* de *L. rhamnosus* inativado pelo calor em macrófagos (RAW 264.7) desafiados por *S. aureus* e *E. coli* verificou-se, em relação a produção de TNF- α , que o probiótico foi capaz de induzir uma produção superior aos demais grupos estimulados com *S. aureus* e o grupo controle. No grupo estimulado por *E. coli* a indução foi semelhante ao grupo *L. rhamnosus* inativado. Estudos anteriores demonstraram que os lactobacilos mesmo inativados são capazes de estimular alta produção de TNF- α (Marin et al., 1997; Cross et al., 2004; van Hoffen et al., 2010; Jorjão et al., 2015). Macrófagos também são o principal produtor de IL-1 β e sua produção pode ser estimulada também por TNF- α e LPS (Dinarello, 1989; Shavit et al., 2006), o que pode explicar a maior produção nos grupos estimulados com bactéria Gram-negativa. Fang et al. (2014) demonstraram que ambos *L. rhamnosus* GG, vivos ou mortos pelo calor, tinham tendência em regular positivamente a expressão de TNF- α em células Caco-2 após 2 e 4 horas de tratamento e que o efeito regulador foi maior quando as bactérias estavam mortas. Em resumo os autores destacaram que, as duas formas de *L. rhamnosus* GG podem regular positivamente a expressão de TNF- α e que a morte pelo calor não minimizou o efeito modulador da cepa. Em relação a IL-1 β o grupo *L. rhamnosus* inativado não foi capaz de induzir produção estatisticamente significativa desta

citocina, concordando com o resultado anterior (Jorjão et al., 2015). Foram encontradas produções significativas desta citocinas quando as células estimuladas apenas com *E. coli*, sendo lactobacilos inativado, capaz de diminuir essa produção.

Curiosamente em relação a IL-6, não foi verificada produção significativa pelo grupo *L. rhamnosus* inativado, somente quando as células foram desafiadas por *S. aureus* ou *E. coli* houve produção significativa desta citocina. TNF- α e IL-1 β são importantes indutores de IL-6 e por isso pode ter induzido a produção desta citocina nestes grupos. A IL-6 pode ser produzida por vários tipos celulares, sendo as células B, T e monócitos as principais fontes (Heinrich et al, 1990; Zang JM, An, 2007), o que pode explicar a baixa produção quando não houve um segundo estímulo aos macrófagos, já que no grupo *L. rhamnosus* inativado, não houve produção de IL-1 β também. Pode-se observar também que no grupo estimulado por lactobacilos, seguido da estimulação por *S. aureus* essa produção foi maior. Marin et al. (1997) avaliaram 14 cepas de bifidobactérias inativadas pelo calor e observaram que estas tinham uma atividade imunomoduladora sobre os macrófagos (RAW 264,7). Os autores relataram um aumento na produção de TNF- α (até várias centenas de vezes) e IL-6 em células não estimuladas e que após a estimulação de células RAW 264.7 com LPS, a produção de TNF- α e IL-6 foi aumentada. Também em nosso estudo *L. rhamnosus* inativado foi capaz de reforçar a produção de citocinas pró-inflamatórias, podendo esse efeito ser benéfico na manutenção do equilíbrio imunológico, aumentando a resistência a infecções.

Em relação a IL-12, pode-se observar que houve baixa produção em todos os grupos. Cross et al. (2004) relataram um aumento na produção desta citocina quando macrófagos J774A.1 foram cultivados durante 8 h ou 16 h na presença de *L. casei* Shirota. Os autores relataram que houve secreção acentuada de IL-12 e TNF- α , mas diminuição da produção de IL-10, e que esta produção foi significativa nos dois tempos

de cultivo, sendo que com 16 h a produção foi maior. Esses resultados demonstraram que para indução de alta produção desta citocina, há necessidade de maior contato do estímulo com a célula, já que neste estudo as bactérias permaneceram em contato com as células durante 24, 48 e 72 h. Em nossos estudos as bactérias, tanto o lactobacilos inativados quanto *S. aureus* ou *E. coli*, permaneceram em contato com os macrófagos por apenas 2 h e 30 min, isso pode sugerir ser a causa de baixa produção desta citocina, já que acredita-se que esta exerça papel fundamental na indução de respostas imunes Th1, sendo sua ação principal estimular células NK e sua secreção inibida pela produção de IL-10.

Em relação a IL-10, observou-se produção significativa desta citocina nos grupos estimulados pelas bactérias e quando foram previamente estimuladas pelo *L. rhamnosus* inativado anteriormente. Mas somente lactobacilos inativado não foi capaz de induzir produção desta citocina. Esses resultados foram semelhantes aos encontrados em relação a IL-6. Isso pode ser explicado pela capacidade de IL-10 em inibir produção de citocinas pró-inflamatórias, principalmente IL-1 β e IL-6 e, IL-12, sugerindo que o aumento na produção desta citocina (IL-10) nos grupos em que houve aumento de IL-1 β e IL-6, se deve ao fato de essa citocina ser reguladora (Raeburn et al., 2002).

Distúrbios no equilíbrio da produção e liberação das citocinas têm papel significativo no desencadeamento e agravamento de diversas enfermidades. Jensen et al. (2015) investigaram o papel imunoestimulante de cepas probióticas em linhagem celular monocítica THP-1 e U937. Cepas de *L. reuteri* induziram maior produção de citocinas em comparação com *L. plantarum* e *L. rhamnosus* GG. Lactobacilos vivos e preparações inativadas por UV induziram respostas diferentes para as cepas investigadas. Os autores sugerem que a soma de proteínas de superfície das bactérias probióticas, metabólitos bacterianos e / ou as proteínas secretadas induzem a secreção de citocinas em células THP-1

e ativam NF-kB em células U937-3xkB-Luc. Liu et al. (2014) investigaram os efeitos anti-alérgicos de *L. plantarum* K37 inativado pelo calor na asma e reações alérgicas sistêmicas em camundongos sensibilizados com ovalbumina e verificaram importante modulação nos níveis de citocinas e relataram que *L. plantarum* K37 inativado pelo calor pode ser um candidato promissor para tratamentos profiláticos e terapêuticos de doenças alérgicas.

Os macrófagos produzem óxido nítrico como composto nocivo para bactérias. Em nossos resultados pode-se observar que a produção de óxido nítrico foi maior nos grupos em que as células sofreram estímulo por *S. aureus*, sendo que no grupo estimulado com bactéria Gram-negativa essa produção foi menor até que a induzida pelo *L. rhamnosus* inativado. Villamil et al. (2002) analisaram 6 cepas bacterianas produtoras de ácido láctico e relataram que foram capazes de aumentar significativamente a produção de NO e o maior aumento foi observado após 72 h de incubação. Além disso os autores relataram que este aumento melhorou o efeito antibacteriano dos produtos extracelulares. Korhonen et al. (2001) sugeriram que ácido lipoteicoico (LTA), estrutura antigênica em bactérias gram-positiva, induz a formação de NO nas células J774 (macrófagos), o que pode explicar o maior aumento na produção de NO nos grupos onde as células sofreram estímulos de bactérias Gram-positivas.

Em relação a influência dos lactobacilos na atividade fagocítica dos macrófagos, pode-se observar que a quantidade de UFC/mL foi menor nos grupos em que houve primeiro estímulo por *L. rhamnosus* inativados pelo calor, sugerindo que o probiótico inativado foi capaz de aumentar a capacidade fagocitária dos macrófagos, sendo este resultado de grande interesse nos casos de infecções.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados da presente pesquisa, pode-se concluir que as rações fubá e pólen mostraram os melhores resultados no desenvolvimento larval, sendo a ração FUBÁ a ração escolhida como padrão, por apresentar menor custo. No estudo *in vivo* a prévia inoculação de *L. rhamnosus* inativada pelo calor melhorou a resposta imune de *G. mellonella* quando desafiada por bactérias. No estudo *in vitro* *L. rhamnosus* inativado foi capaz de induzir produção de TNF- α e óxido nítrico e também IL-6 e IL-10 quando as células foram desafiadas por *S. aureus* e *E. coli*, além de diminuir a CFU/mL das bactérias quando em contato com macrófagos RAW 264.7, sugerindo que o *L. rhamnosus* foi capaz de melhorar a atividade fagocitária dessas células.

8 REFERÊNCIAS*

Adams CA. The probiotic paradox: live and dead cells are biological response modifiers. *Nutr Res Rev.* 2010 Jun;23(1):37-46. doi: 10.1017/S0954422410000090.

Achterman RR, Smith AR, Oliver BG, White TC. Sequenced dermatophyte strains: Growth rate, conidiation, drug susceptibilities, and virulence in an invertebrate model. *Fungal Genet Biol.* 2011 Mar;48(3):335-41. doi: 10.1016/j.fgb.2010.11.010.

Alghoribi MF, Gibreel TM, Dodgson AR, Beatson SA, Upton M. *Galleria mellonella* infection model demonstrates high lethality of ST69 and ST127 uropathogenic *E. coli*. *PLoS One.* 2014 Jul 25;9(7):e101547. doi: 10.1371/journal.pone.0101547.

Ankeny RA, Leonelli S. What's so special about model organisms? *Stud Hist Philos Sci.* 2011 Jun;42(2):313–23. doi:10.1016/j.shpsa.2010.11.039

Ashraf R, Shah NP. Immune system stimulation by probiotic microorganisms. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2014;54(7):938-56. doi: 10.1080/10408398.2011.619671.

Arvanitis M, Mylonakis E. Characteristics, Clinical Relevance, and the Role of Echinocandins in Fungal-Bacterial Interactions. *Clin Infect Dis.* 2015 Dec 1;61 Suppl 6:S630-4. doi: 10.1093/cid/civ816.

Banville N, Browne N, Kavanagh K. Effect of nutrient deprivation on the susceptibility of *Galleria mellonella* larvae to infection. *Virulence.* 2012 Oct 1;3(6):497-503. doi: 10.4161/viru.21972.

Beeton ML, Alves DR, Enright MC, Jenkins AT. Assessing phage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* using a *Galleria mellonella* infection model. *Int J Antimicrob Agents.* 2015 Aug;46(2):196-200. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2015.04.005.

Benthall G, Touzel RE, Hind CK, Titball RW, Sutton JM, Thomas RJ, et al. Evaluation of antibiotic efficacy against infections caused by planktonic or biofilm cultures of *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* in *Galleria mellonella*. *Int J Antimicrob Agents.* 2015 Nov;46(5):538-45. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2015.07.014.

Bernardeau M, Vernoux JP, Henri-Dubernet S, Guéguen M. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Lactobacillus* genus. *Int J Food Microbiol.* 2008 Sep 1;126(3):278-85.

Brighenti DM, Carvalho CF, Carvalho GA, Brighenti CRG. Efficiency of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Berliner, 1915) for control of the greater wax moth *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pyralidae). *Ciênc Agrotec.* 2005 Jan-Fev;29(1):60-8.

Browne N, Surlis C, Maher A, Gallagher C, Carolan JC, Clynes M, et al. Prolonged pre-incubation increases the susceptibility of *Galleria mellonella* larvae to bacterial and fungal infection. *Virulence.* 2015;6(5):458-65. doi: 10.1080/21505594.2015.1021540.

Cardoso AC, Prata MC, Furlong J, Prezoto F. [Thermal requirements of *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) immature stages]. *Neotrop Entomol.* 2007 Sep-Oct;36(5):657-61.

Charrière JD, Imdorf A. Protection of honey combs from wax moth damage. *Am Bee J.* 1999 Aug;139(8):627-30.

Chibebe Junior J, Fuchs BB, Sabino CP, Junqueira JC, Jorge AO, Ribeiro M, et al. Photodynamic and antibiotic therapy impair the pathogenesis of *Enterococcus faecium* in a whole animal insect model. *PLoS One.* 2013;8(2):e55926. doi: 10.1371/journal.pone.0055926.

Christoffersen TE, Hult LT, Kuczkowska K, Moe KM, Skeie S, Lea T, et al. In vitro comparison of the effects of probiotic, commensal and pathogenic strains on macrophage polarization. *Probiotics Antimicrob Proteins.* 2014 Mar;6(1):1-10. doi: 10.1007/s12602-013-9152-0.

Chuang L, Wu KG, Pai C, Hsieh PS, Tsai JJ, Yen JH, et al. Heat-killed cells of lactobacilli skew the immune response toward T helper 1 polarization in mouse splenocytes and dendritic cell-treated T cells. *J Agric Food Chem.* 2007 Dec 26;55(26):11080-6. Epub 2007 Nov 27.

Coskun M, Kayis T, Sulanc M, Ozalp P. Effects of different honeycomb and sucrose levels on the development of greater wax moth *Galleria mellonella* larvae. *Int J Agril. Biol.* 2006;8(6):855-8.

Cook SM, McArthur JD. Developing *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens. *Virulence.* 2013 Jul 1;4(5):350-3. doi: 10.4161/viru.25240.

Cross ML, Ganner A, Teilab D, Fray LM. Patterns of cytokine induction by gram-positive and gram-negative probiotic bacteria. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2004 Oct 1;42(2):173–80.

Dadd RH. A study of carbohydrate and lipid nutrition in the wax moth, *Galleria mellonella* (L.), using partially synthetic diets. *J. Insect Physiol.* 1964 Mar;10(2):161-78. doi: 10.1016/0022-1910(64)90001-0

Dash G, Raman RP, Pani Prasad K, Makesh M, Pradeep MA, Sen S. Evaluation of paraprobiotic applicability of *Lactobacillus plantarum* in improving the immune response and disease protection in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish Shellfish Immunol.* 2015 Mar;43(1):167-74. doi: 10.1016/j.fsi.2014.12.007.

Desbois AP, Coote PJ. Wax moth larva (*Galleria mellonella*): an in vivo model for assessing the efficacy of antistaphylococcal agents. *J Antimicrob Chemother.* 2011 Aug;66(8):1785-90. doi: 10.1093/jac/dkr198.

Diago-Navarro E, Chen L, Passet V, Burack S, Ulacia-Hernando A, Kodiyankal RP et al. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* exhibit variability in capsular polysaccharide and capsule associated virulence traits. *J Infect Dis.* 2014 Sep 1;210(5):803-13. doi: 10.1093/infdis/jiu157.

Ellis JD, Graham JR, Mortensen A. Standard methods for wax moth research. *J of Apicult Res.* 2013 Nov;52(1):1-17.

Fang SB, Shih HY, Huang CH, Li LT, Chen CC, Fang HW. Live and heat-killed *Lactobacillus rhamnosus* GG upregulate gene expression of pro-inflammatory cytokines in 5-fluorouracil-pretreated Caco-2 cells. *Support Care Cancer.* 2014 Jun;22(6):1647-54. doi: 10.1007/s00520-014-2137-z.

Fuchs BB, Li Y, Li D, Johnston T, Hendricks G, Li G, et al. Micafungin Elicits an Immunomodulatory Effect in *Galleria mellonella* and Mice. *Mycopathologia.* 2016 Feb;181(1-2):17-25. doi: 10.1007/s11046-015-9940-z.

Fuller R. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol.* 1989 May;66(5):365-78.

Gibreel TM, Upton M. Synthetic epidermicin NI01 can protect *Galleria mellonella* larvae from infection with *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother.* 2013 Oct;68(10):2269-73. doi: 10.1093/jac/dkt195.

Habil N, Abate W, Beal J, Foey AD. Heat-killed probiotic bacteria differentially regulate colonic epithelial cell production of human β -defensin-2: dependence on inflammatory cytokines. *Benef Microbes*. 2014 Dec;5(4):483-95. doi: 10.3920/BM2013.0061.

Harb H, van Tol EA, Heine H, Braaksma M, Gross G, Overkamp K, et al. Neonatal supplementation of processed supernatant from *Lactobacillus rhamnosus* GG improves allergic airway inflammation in mice later in life. *Clin Exp Allergy*. 2013 Mar;43(3):353-64. doi: 10.1111/cea.12047.

Hardy H, Harris J, Lyon E, Beal J, Foey AD. Probiotics, prebiotics and immunomodulation of gut mucosal defences: homeostasis and immunopathology. *Nutrients*. 2013 May 29;5(6):1869-912. doi: 10.3390/nu5061869.

Hemarajata P, Versalovic J. Effects of probiotics on gut microbiota: mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation. *Therap Adv Gastroenterol*. 2013 Jan;6(1):39-51. doi: 10.1177/1756283X12459294.

Heinrich PC, Castell JV, Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J*. 1990 Feb;265(3):621-36.

Hoffmann JA. Innate immunity of insects. *Cur. Opinion in Immunol*. 1995 Feb;7(1):4-10.

Hoffmann J. Antifungal defense in *Drosophila*. *Nat Immunol*. 2007 Jun;8(6):543-45.

Hood WM, Horton PM, Mccreadie JW. Field evaluation of the red imported fire ant (*Hymenoptera: formicidae*) for the control of wax moths (Lepidoptera: *Pyralidae*) in stored honey bee comb. *J Agric Urban Entomol*. 2003;20(2):93-103.

Hornsey M, Phee L, Longshaw C, Wareham DW. *In vivo* efficacy of telavancin/colistin combination therapy in a *Galleria mellonella* model of *Acinetobacter baumannii* infection. *Int J Antimicrob Agents*. 2013 Mar;41(3):285-87. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2012.11.013.

Huis in't Veld JH, Havenaar R, Marteau P. Establishing a scientific basis for probiotic R&D. *Trends Biotechnol*. 1994 Jan;12(1):6-8.

Ismail IH, Licciardi PV, Tang ML. Probiotic effects in allergic disease. *J Pediatr Child Health*. 2013 Sep;49(9):709-15. doi: 10.1111/jpc.12175.

Italiani P, Boraschi D. From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Front Immunol.* 2014 Oct 17;5:514. doi: 10.3389/fimmu.2014.00514.

Jander G, Rahme LG, Ausubel FM. Positive correlation between virulence of *Pseudomonas aeruginosa* mutants in mice and insects. *J Bacteriol.* 2000 Jul;182(13):3843-5.

Jensen H, Dromtorp SM, Axelsson L, Grimmer S. Immunomodulation of monocytes by probiotic and selected lactic Acid bacteria. *Probiotics Antimicrob Proteins.* 2015 Mar;7(1):14-23. doi: 10.1007/s12602-014-9174-2.

Jorjão AL, Oliveira FE, Leão MVP, Carvalho CAT, Jorge AOC, Oliveira LD. Live and Heat-Killed *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 may induce modulatory cytokines profiles on macrophages RAW 264.7. *ScientificWorldJournal.* 2015 ;2015:716749. doi: 10.1155/2015/716749.

Junqueira JC. *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens: recent studies and new perspectives. *Virulence.* 2012 Oct 1;3(6):474-76. doi: 10.4161/viru.22493.

Kano H1, Kita J, Makino S, Ikegami S, Itoh H. Oral administration of *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* OLL1073R-1 suppresses inflammation by decreasing interleukin-6 responses in a murine model of atopic dermatitis. *J Dairy Sci.* 2013 Jun;96(6):3525-34. doi: 10.3168/jds.2012-6514.

Karlsson M, Scherbak N, Khalaf H, Olsson PE, Jass J. Substances released from probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 potentiate NF- κ B activity in *Escherichia coli*-stimulated urinary bladder cells. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2012 Nov;66(2):147-56. doi: 10.1111/j.1574-695X.2012.00994.x.

Kataria J, Li N, Wynn JL, Neu J. Probiotic microbes: do they need to be alive to be beneficial?. *Nutr Rev.* 2009 Sep;67(9):546-50. doi: 10.1111/j.1753-4887.2009.00226.x.

Köhler G. Probiotics research in *Galleria mellonella*. *Virulence.* 2015;6(1):3-5. doi: 10.1080/21505594.2014.998967.

Korhonen R, Korpela R, Saxelin M, Mäki M, Kankaanranta H, Moilanen E. Induction of nitric oxide synthesis by probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG in J774 macrophages and human T84 intestinal epithelial cells. *Inflammation.* 2001 Aug;25(4):223-32.

Krams I, Kecko S, Kangassalo K, Moore FR, Jankevics E, Inashkina I, et al. Effects of food quality on trade-offs among growth, immunity and survival in the greater wax moth *Galleria mellonella*. *Insect Sci.* 2015 Mar;22(3):431-9. doi: 10.1111/1744-7917.12132.

Leuko S, Raivio TL. Mutations that impact the enteropathogenic *Escherichia coli* Cpx envelope stress response attenuate virulence in *Galleria mellonella*. *Infect Immun.* 2012 Sep;80(9):3077-85. doi: 10.1128/IAI.00081-12.

Li DD, Deng L, Hu GH, Zhao LX, Hu DD, Jiang YY, et al. Using *Galleria mellonella*-*Candida albicans* infection model to evaluate antifungal agents. *Biol Pharm Bull.* 2013;36(9):1482-7.

Li J, Wang W, Xu SX, Magarvey NA, McCormick JK. *Lactobacillus reuteri*-produced cyclic dipeptides quench agr-mediated expression of toxic shock syndrome toxin-1 in staphylococci. *Proc Natl Acad Sci.* 2011 Feb 22;108(8):3360-5. doi: 10.1073/pnas.1017431108.

Li N, Russell WM, Douglas-escobar M, Hauser N, Lopez M, Neu J. Live and heat-killed *Lactobacillus rhamnosus* GG: effects on proinflammatory and anti-inflammatory cytokines/chemokines in gastrostomy-fed infant rats. *Pediatr Res.* 2009 Aug;66(2):203-7. doi: 10.1203/PDR.0b013e3181aabd4f.

Lilly DM, Stillwell RH. Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science.* 1965 Feb 12;147(3659):747-8.

Lionakis MS. *Drosophila* and *Galleria* insect model hosts: new tools for the study of fungal virulence, pharmacology and immunology. *Virulence.* 2011 Nov-Dec;2(6):521-7. doi: 10.4161/viru.2.6.18520.

Liu YW, Liao TW, Chen YH, Chiang YC, Tsai YC. Oral administration of heat-inactivated *Lactobacillus plantarum* K37 modulated airway hyperresponsiveness in ovalbumin-sensitized BALB/c mice. *PLoS One.* 2014 Jun 17;9(6):e100105. doi: 10.1371/journal.pone.0100105.

Maekawa LE, Rossoni RD, Barbosa JO, Jorge AO, Junqueira JC, Valera MC. Different extracts of *Zingiber officinale* decrease *Enterococcus faecalis* infection in *Galleria mellonella*. *Braz Dent J.* 2015 Mar-Apr;26(2):105-9. doi: 10.1590/0103-6440201300199.

Mak P, Zdybicka-Barabas A, Cytryńska M. A different repertoire of *Galleria mellonella* antimicrobial peptides in larvae challenged with bacteria and fungi. *Dev Comp Immunol.* 2010 Oct;34(10):1129-36. doi: 10.1016/j.dci.2010.06.005.

Marin ML, Lee JH, Murtha J, Ustunol Z, Pestka JJ. Differential cytokine production in clonal macrophage and T-cell lines cultured with bifidobacteria. *J Dairy Sci.* 1997 Nov;80(11):2713-20.

Matsuguchi T, Takagi A, Matsuzaki T, Nagaoka M, Ishikawa K, Yokokura T, et al. Lipoteichoic acids from *Lactobacillus* strains elicit strong tumor necrosis factor alpha-inducing activities in macrophages through Toll-like receptor 2. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003 Mar;10(2):259-66.

Mead GP, Ratcliffe NA, Renwrent LR. The separation of insect haemocyte types on percoll gradients; methodology and problems. *J. Insect Phwiol.* 1986;32(2):167-77. doi:10.1016/0022-1910(86)90137-X

Mohamed AA, Ansari MJ, AL-Ghamdi A, Mohamed MO, Kaur M Effect of larval nutrition on the development and mortality of *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Revista Colombiana de Entomología.* 2014;40(1): 49-54.

Mukherjee K, Raju R, Fischer R, Vilcinskas A. *Galleria mellonella* as a model host to study gut microbe homeostasis and brain infection by the human pathogen *Listeria monocytogenes*. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2013;135:27-39. doi: 10.1007/10_2013_203. doi: 10.1007/10_2013_203.

Mylonakis E, Moreno R, El Khoury JB, Idnurm A, Heitman J, Calderwood SB, et al. *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. *Infect Immun.* 2005 Jul;73(7):3842-50.

Nagpal R, Kumar A, Kumar M, Behare PV, Jain S, Yadav H. Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: a review. *FEMS Microbiol Lett.* 2012 Sep;334(1):1-15. doi: 10.1111/j.1574-6968.2012.02593.x.

Nakayama Y, Moriya T, Sakai F, Ikeda N, Shiozaki T, Hosoya T, et al. Oral administration of *Lactobacillus gasseri* SBT2055 is effective for preventing influenza in mice. *Sci Rep.* 2014 Apr 10;4:4638. doi: 10.1038/srep04638.

Oliveira F. Atividade imunomoduladora de *Lactobacillus rhamnosus* em macrófagos de camundongos estimulados com lipopolisacarídeo, ácido lipoteicóico e manana [dissertação]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2013.

Raeburn CD, Sheppard F, Barsness KA, Arya J, Harken AH. Cytokines for surgeons. *Am J Surg.* 2002 Mar;183(3):268-73.

Rajendran R, Borghi E, Falleni M, Perdoni F, Tosi D, Lappin DF, et al. Acetylcholine Protects against *Candida albicans* Infection by Inhibiting Biofilm Formation and Promoting Hemocyte Function in a *Galleria mellonella* Infection Model. *Eukaryot Cell*. 2015 Aug;14(8):834-44. doi: 10.1128/EC.00067-15.

Ramarao N, Nielsen-Leroux C, Lereclus D. The insect *Galleria mellonella* as a powerful infection model to investigate bacterial pathogenesis. *J Vis Exp*. 2012 Dec 11;(70):e4392. doi: 10.3791/4392.

Repizo GD, Gagné S, Foucault-Grunenwald ML, Borges V, Charpentier X, Limansky AS, et al. Differential Role of the T6SS in *Acinetobacter baumannii* Virulence. *PLoS One*. 2015 Sep 24;10(9):e0138265. doi: 10.1371/journal.pone.0138265.

Richards RL, Haigh RD, Pascoe B, Sheppard SK, Price F, Jenkins D, et al. Persistent *Staphylococcus aureus* isolates from two independent cases of bacteremia display increased bacterial fitness and novel immune evasion phenotypes. *Infect Immun*. 2015 Aug;83(8):3311-24. doi: 10.1128/IAI.00255-15.

Rodríguez-Nogales A, Algieri F, Vezza T, Garrido-Mesa N, Olivares M, Comalada M, et al. The viability of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 is not essential to exert intestinal anti-inflammatory properties. *Food Funct*. 2015 Apr;6(4):1176-84. doi: 10.1039/c4fo00938j.

Salinas P, Diaz-Rosales A., Cuesta J, Meseguer M, Chabrillon M, Morinigo MA, et al. Effect of heat-inactivated fish and non-fish derived probiotics on the innate immune parameters of a teleost fish (*Sparus aurata* L.) *Vet Immunol Immunopathol*. 2006 Jun 15;111(3-4):279-86.

Semenova AD, Glazachev YI, Slepneva IA, Glupov VV. Quantitative determination of nitric oxide production in haemocytes: nitrite reduction activity as a potential pathway of NO formation in haemolymph of *Galleria mellonella* larvae. *Nitric Oxide*. 2014 Feb 15;37:46-52. doi: 10.1016/j.niox.2013.12.011.

Sharma R, Kapila R, Dass G, Kapila S. Improvement in Th1/Th2 immune homeostasis, antioxidative status and resistance to pathogenic *E. coli* on consumption of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* fermented milk in aging mice. *Age (Dordr)*. 2014 ;36(4):9686. doi: 10.1007/s11357-014-9686-4. Epub 2014 Jul 19.

Shavit Y, Fridel K, Beilin B. Postoperative pain management and proinflammatory cytokines: animal and human studies. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2006 Dec;1(4):443-451.

Shaurub EH. Immunomodulation in insects post-treatment with abiotic agents: A review. *Eur J Entomol.* 2012;109(3):303-16.

Scorzoni L, de Lucas MP, Arango ACM, Almeida AMF, Lozano E, Estrella MC, et al. Antifungal efficacy during *Candida krusei* infection in non-conventional models correlates with the yeast in vitro susceptibility profile. *PLoSOne.* 2013 ;8(3):e60047. doi: 10.1371/journal.pone.0060047.

Scorzoni L, de Paula E Silva AC, Singulani Jde L, Leite FS, de Oliveira HC1, Moraes da Silva RA, et al. Comparison of virulence between *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii* using *Galleria mellonella* as a host model. *Virulence.* 2015 Nov 17;6(8):766-76. doi: 10.1080/21505594.2015.1085277.

Socol CR, Vandenberghe LPS, Spier MR, Medeiros ABP, Yamaguishi CT, Lindner JD, et al. The Potential of Probiotics: a Review. *Food Technol. Biotechnol.* 2010;48(4):413–34.

Taverniti V, Guglielmetti, S. The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: proposal of paraprobiotic concept). *Genes Nutr.* 2011 Aug;6(3):261-74. doi: 10.1007/s12263-011-0218-x.

Thomas RJ, Hamblin KA, Armstrong SJ, Müller CM, Bokori-Brown M, Goldman S, et al. *Galleria mellonella* as a model system to test the pharmacokinetics and efficacy of antibiotics against *Burkholderia pseudomallei*. *Int J Antimicrob Agents.* 2013 Apr;41(4):330-6. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2012.12.009.

Trudeau D, Washburn JO, Volkman LE. Central role of hemocytes in *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus pathogenesis in *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea*. *J Virol.* 2001 Jan;75(2):996-1003.

van Hoffen E, Korthagen NM, de Kivit S, Schouten B, Bardoel B, Duivelshof A, et al. Exposure of intestinal epithelial cells to UV-killed *Lactobacillus* GG but not *Bifidobacterium breve* enhances the effector immune response in vitro. *Int Arch Allergy Immunol.* 2010;152(2):159-68. doi: 10.1159/000265537.

Vandenberg, JD., Shimanuki H. Viability of *bacillus thuringiensis* and its efficacy for larvae of the greater wax moth (Lepidoptera: Pyralidae) following storage of treated combs. *J Econ Entomol.*1990 May;83(3):760-5.

Vieira FN, Buglione CC, Mourino JLP, Jatoba A, Ramirez C, Martins ML, et al. Time-related action of *Lactobacillus plantarum* in the bacterial microbiota of shrimp digestive tract and its action as immunostimulant. *Pesq Agropecu Bras*. 2008;43(6):763-9.

Vilela SF, Barbosa JO, Rossoni RD, Santos JD, Prata MC, Anbinder AL, Jorge AO, Junqueira JC. *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 inhibits biofilm formation by *C. albicans* and attenuates the experimental candidiasis in *Galleria mellonella*. *Virulence*. 2015;6(1):29-39. doi: 10.4161/21505594.2014.981486.

Villamil L, Tafalla C, Figueras A, Novoa B. Evaluation of immunomodulatory effects of lactic acid bacteria in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002 Nov;9(6):1318-23.

Yasuda E, Serata M, Sako T. Suppressive effect on activation of macrophages by *Lactobacillus casei* strain Shirota genes determining the synthesis of cell wall-associated polysaccharides. *Appl Environ Microbiol*. 2008 Aug;74(15):4746-55. doi: 10.1128/AEM.00412-08.

Wand ME, McCowen JW, Nugent PG, Sutton JM. Use of the *Galleria mellonella* infection model to study the opportunistic pathogen *Klebsiella pneumoniae* supports the presence of a multifaceted interaction with the host immune response. *J Med Microbiol*. 2013 Dec;62(Pt 12):1790-8. doi: 10.1099/jmm.0.063032-0.

Washburn JO, Kirkpatrick BA, Volkman LE. Insect protection against viruses. *Nature*. 1996 Oct 31;383:767. doi:10.1038/383767a0

Whitten M, Sun F, Tew I, Schaub G, Soukou C, Nappi A, Ratcliffe N. Differential modulation of *Rhodnius prolixus* nitric oxide activities following challenge with *Trypanosoma rangeli*, *T. cruzi* and bacterial cell wall components. *Insect Biochem Mol Biol*. 2007 May;37(5):440-52.

WHO. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria; 2001. Disponível em: www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf

Zdybicka-Barabas A, Mak P, Jakubowicz T, Cytryńska M. Lysozyme and defense peptides as suppressors of phenoloxidase activity in *Galleria mellonella*. *Arch Insect Biochem Physiol*. 2014 Sep;87(1):1-12. doi: 10.1002/arch.21175.

Zhang JM, An J. Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin*. 2007 Spring;45(2):27-37.

Zhang L, Li N, Caicedo R, Neu J. Alive and dead *Lactobacillus rhamnosus* GG decrease tumor necrosis factor- α -induced interleukin-8 production in Caco-2 cells. J Nutr. 2005 Jul;135(7):1752–56.

ANEXO A- Manutenção da criação de *Galleria mellonella*

Iniciar a criação a partir das lagartas em seu último estágio:

ETAPA A)

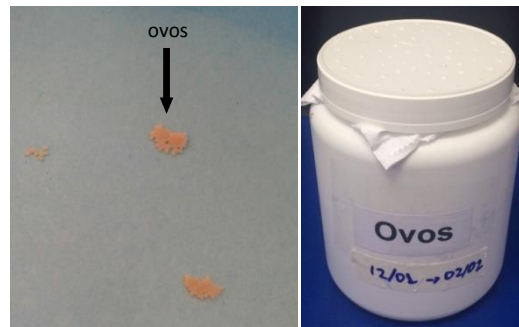
1. Em recipientes plásticos pretos com furos na tampa colocar as lagartas que estão no último estágio e/ou já pupas, para transformarem em mariposas;
2. Colocar um pano tipo voal e por cima cartolina, como substrato para ovoposição.



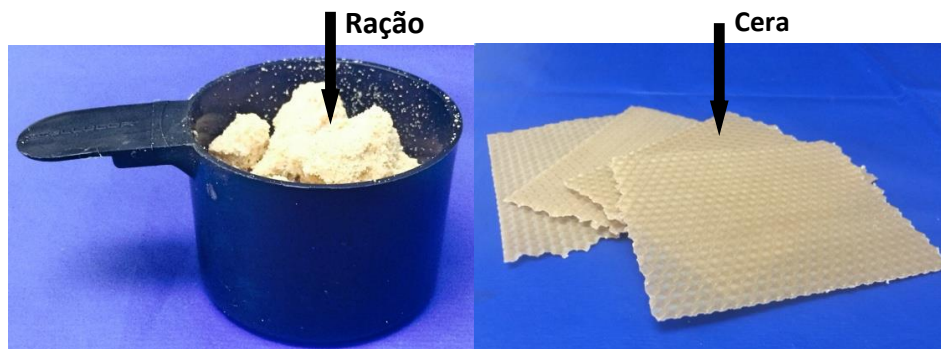
Obs: Nessa fase os animais não se alimentam. Não colocar ração, nem cera, dentro do pote. Manter em temperatura ambiente.

ETAPA B)

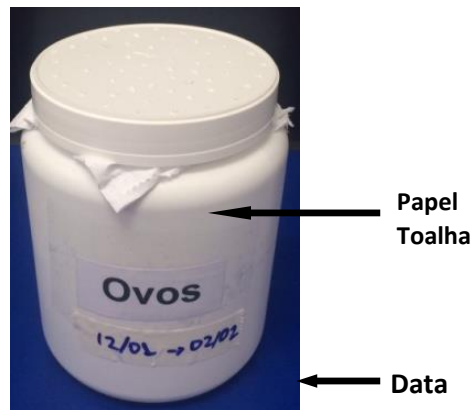
1. Semanalmente retirar as cartolinas com os ovos e colocar no pote de plástico branco;



2. Adicionar uma medida de ração e cera;



3. Fechar o pote com a tampa que possui diversos furos, lembrando-se de colocar papel toalha entre a tampa e o pote para evitar que as lagartas pequenas consigam sair;
4. Datar e incubar na estufa a 28 °C por mais ou menos 20 dias. Neste período, é importante monitorar 1 vez por semana, para acompanhar o crescimento, entretanto, evita-se mexer nas lagartas.



5. Após os 20 dias, quando as lagartas já estiverem num tamanho que permita ser manuseada (aproximadamente 1 cm), deve-se realizar a limpeza das mesmas, retirando as teias e os casulos, e separando-as de acordo com o tamanho.

ETAPA C)

1. Transferir para potes de alumínio com tampa perfurada, separando os tamanhos em: pequenas, médias e grandes, de acordo com o esquema abaixo. Manter na estufa (28 °C);



2. Realizar a limpeza 3 vezes por semana, para retirada das teias, até o estágio que será utilizada na pesquisa, aproximadamente 2

semanas (período de transformação das lagartas pequenas em grandes).

Obs:

- Sempre utilizar luvas e jaleco para manipular as lagartas
- Retirar completamente as lagartas dos casulos
- Reutilizar a cera e adicionar mais se for necessário
- Adicionar mais ração a cada limpeza

Temperatura na estufa: 28 °C

As lagartas que não forem utilizadas e as que transformarem em Pupa durante esse período, colocar nos potes pretos para dar continuidade ao ciclo de criação (ETAPA A).

Receita da Ração:

- ❖ 250 g de fubá,
- ❖ 150 g levedura de cerveja,
- ❖ 100 g de farinha de soja,
- ❖ 100 g de leite em pó desnatado,
- ❖ 200 g de mel e
- ❖ 200 g de glicerol

Misturar todos os ingredientes até ficar uma massa homogênea