

RESSALVA

Atendendo a solicitação do(a) autor(a), o texto completo desse trabalho será disponibilizado no repositório a partir de 26/08/2027.



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

FABIANA ALVES DE SOUZA SILVA

**ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA HEMOLINFA
DE *Galleria mellonella* A PARTIR DA IMUNIZAÇÃO
COM *Staphylococcus aureus* E *Candida albicans***

FABIANA ALVES DE SOUZA SILVA

**ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA HEMOLINFA
DE *Galleria mellonella* A PARTIR DA IMUNIZAÇÃO
COM *Staphylococcus aureus* E *Candida albicans***

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE BUCAL.

Área: Microbiologia e Imunologia. Linha de pesquisa: Agentes antimicrobianos e métodos de controle para infecções de interesse médico-odontológico.

Orientadora: Profa. Assoc. Maíra Terra Garcia

São José dos Campos

2026

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2026]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Silva, Fabiana Alves de Souza

Análise da atividade antibacteriana da hemolinfa de *Galleria mellonella* a partir da imunização com *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* / Fabiana Alves de Souza Silva. - São José dos Campos : [s.n.], 2026.
77 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde Bucal - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2026.

Orientador: Maíra Terra Garcia.

1. *Galleria mellonella*. 2. Sistema imune. 3. Resistência antimicrobiana .
4. *Staphylococcus aureus*. I. Garcia, Maíra Terra, orient. II. Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - UNESP. IV. Universidade Estadual Paulista (UNESP). V. Título.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

O presente estudo investigou ação antimicrobiana a partir da hemolinfa de *G. mellonella* imunizadas com *S. aureus* e *C. albicans*, com o objetivo de investigar novas estratégias terapêuticas frente a infecções causadas por *S. aureus* e ao avanço da resistência antimicrobiana, alinhando-se com o ODS 3 (Saúde e bem-estar), a qual visa reduzir a mortalidade e apoia o desenvolvimento de novos medicamentos.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

The present study investigated antimicrobial action from the hemolymph of *G. mellonella* immunized with *S. aureus* and *C. albicans*, with the objective of investigating new therapeutic strategies against infections caused by *S. aureus* and the advance of antimicrobial resistance, in line with SDG 3 (Health and well-being), which aims to reduce mortality and supports the development of new drugs.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Máira Terra Garcia (Orientadora)

Universidade estadual Paulista (UNESP)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus São José dos Campos

Profa. Juliana Campos Junqueira

Universidade estadual Paulista (UNESP)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus São José dos Campos

Prof. André Henrique Correia Pereira

Faculdade Anhanguera

Anhanguera Educacional

Campus São José dos Campos

São José dos Campos, 26 de fevereiro de 2026.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a **Deus** e à **Maria, nossa Mãe**, que sempre passaram à minha frente, iluminando meus caminhos, abençoando cada passo e me concedendo força, fé e coragem ao longo de toda essa trajetória.

À **Unesp - Universidade Estadual Paulista do Instituto de Ciência e Tecnologia** de São José dos Campos e ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde Bucal (CASB)**, expresso minha sincera gratidão pela oportunidade de crescimento acadêmico, científico e pessoal, bem como por toda a estrutura e apoio oferecidos durante a realização deste trabalho.

À minha orientadora, **Profa. Maíra Terra Garcia**, agradeço por me aceitar como orientanda, por acreditar em mim e enxergar meu potencial mesmo quando eu mesma não conseguia ver. Como uma de suas primeiras orientadas, tenho a alegria e orgulho de dizer o quanto você é uma orientadora maravilhosa. Tudo o que aprendi, cada pergunta que passei a fazer, cada detalhe que hoje observo com mais atenção, nasceu da sua forma de ensinar, incentivar e provocar pensamento (pensar fora da caixinha). Nesses dois anos vejo o quanto amadureci, não apenas como pesquisadora, mas também como pessoa e grande parte disso devo a você. Obrigada pela paciência, pela confiança, pelos conselhos que levarei para a vida, pelas conversas sérias e também pelos momentos leves que salvaram dias difíceis. Espero ter correspondido às suas expectativas e peço desculpas pelos momentos em que deixei a desejar. Minha admiração por você, como pessoa, professora e orientadora, é imensa. Tive muita sorte de ter você me guiando nessa caminhada. Muito obrigada, de todo o coração.

À **Profa. Juliana Campos Junqueira**, minha sincera gratidão por ser uma inspiração para mim e para tantas mulheres do laboratório, e por seu empenho constante em fortalecer e melhorar nosso ambiente de pesquisa, contribuindo de forma tão significativa para o crescimento de todos nós.

À **Patrícia Michelle Nagai de Lima**, uma das minhas primeiras amigas no laboratório, obrigada por ouvir meus desabafos, minhas lágrimas, minhas crises existenciais científicas (e não científicas também), por cada risada quando a gente só precisava sobreviver à semana, pelos conselhos e por me ensinar a olhar a vida com mais leveza.

À **Maria Eduarda da Silva Costa**, minha companheira de bancada, de perrengues, de aprendizados e de sonhos compartilhados, obrigada por ouvir até as ideias mais absurdas e ainda assim, sonhar comigo. Dividir essa jornada com você deixou tudo mais possível.

À **Lara Luise Castro Pedroso**, amiga que a ciência me deu, obrigada por estar presente sempre, pela amizade, pelo apoio e por trazer beleza até nos dias mais caóticos e por me encantar com o som da sua voz que acalma qualquer tempestade acadêmica.

Ao **Prof. Paulo Henrique Fonseca do Carmo**, meu sincero obrigado. Aprendi muito com você no laboratório e sempre admirei sua didática e disposição em ajudar.

A todos do laboratório, que se tornaram minha família durante essa trajetória, meu profundo agradecimento pelo convívio, apoio, carinho e aprendizado compartilhado diariamente.

À **Profa. Mônica Ghislaine Oliveira Alves**, agradeço pela confiança em mim ao permitir que eu acompanhasse e auxiliasse suas alunas.

Às alunas **Gabrielle Canuto Lucas**, **Caroline faria Zimiani** e **Maria Eduarda Devito Souza Santos**, obrigada por confiarem em mim para co-orientá-las no laboratório. Com vocês, aprendi a ter paciência, a buscar sempre o meu melhor e a aprimorar minha didática. Cresci muito nesse processo, e sou grata por cada momento de aprendizado.

À **Profa. Marianne Spalding** e às meninas do Inverno na Universidade, agradeço pelo acolhimento e pela confiança. Participar do inverno foi especial, não apenas pelo aprendizado, mas pelo cuidado e confiança que encontrei ali.

À **Mayara Moreira**, obrigada por toda a ajuda no dia a dia do laboratório, por cada dúvida esclarecida e por todo o apoio e dicas para o cultivo de células.

Ao clube do livro **Asas da Leitura**, meu agradecimento cheio de carinho por ter despertado novamente em mim o amor pela leitura.

Aos meus pais, **Andréa das Dores de Souza Silva** e **Marcelino Alves da Silva**, minha base, meu porto seguro e meu maior amor. Obrigada por sempre acreditarem em mim, por todo incentivo, pelas orações, pelos ensinamentos e por nunca medirem esforços para que eu pudesse chegar até aqui. Tudo o que faço também é por vocês, na esperança de retribuir, mesmo que um pouco, tudo o que sempre fizeram por mim. A distância física só aumentou a saudade, mas também me fez perceber ainda mais o quanto vocês são essenciais na minha vida. Amo vocês.

Às minhas irmãs, **Laís de Souza Silva** e **Leandra Alves de Souza Silva**, por sonharem comigo, caminharem ao meu lado e por todo apoio incondicional. À minha sobrinha **Pietra Alves de Souza** e ao meu sobrinho **Nicolas Alves de Souza**, que me inspiram todos os dias a ser uma pessoa melhor.

Aos meus tios, **Maria Rosa de Souza Batista** e **Benedito Domiciano Batista**, que me acolheram com tanto amor em sua casa e cuidaram de mim como verdadeiros pais. Serei eternamente grata por todo carinho, cuidado e generosidade.

Ao **Giuliano Caneppele Micarelli**, amigo que me incentivou a seguir meus sonhos, esteve ao meu lado nos momentos mais difíceis e me estendeu a mão quando eu mais precisei. Muito obrigada por tudo.

Aos funcionários da **Secretaria de Pós-Graduação**, sempre solícitos e dispostos a ajudar, meu sincero agradecimento por todo suporte.

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma, fizeram parte desta jornada. Se hoje estou aqui, é porque tive cada um de vocês ao meu lado. Meu mais profundo e sincero obrigada.

"Após tantos acontecimentos excepcionais, Alice começou a pensar que pouquíssimas coisas eram, de fato, impossíveis."

Lewis Carroll, Alice no País das Maravilhas

RESUMO

Silva FAS. Análise da atividade antibacteriana da hemolinfa de *Galleria mellonella* a partir da imunização com *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, 2026.

A resistência antimicrobiana, intensificada pelo uso indiscriminado de antibióticos e agravada durante a pandemia de COVID-19, tem favorecido a emergência de patógenos resistentes, como *Staphylococcus aureus*, uma bactéria coco Gram-positiva associada a infecções nosocomiais e comunitárias e com elevada capacidade de adquirir mecanismos de resistência, tornando urgente o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Neste contexto, produtos naturais têm ganhado relevância como fontes de biomoléculas com atividade antimicrobiana, e o invertebrado *Galleria mellonella* destaca-se como uma fonte promissora de compostos naturais. Diante disso, este estudo investigou atividade antimicrobiana da hemolinfa de larvas de *G. mellonella*, sob diferentes imunizações, tempo pós-imunização (24, 48 e 72h) e processamento, sobre a formação de biofilmes de *S. aureus*. Para isso, foram avaliados quatro grupos experimentais 1) Controle de crescimento (CC); 2) IM Sa (imunizado com *S. aureus*); 3) IM Ca (imunizado com *C. albicans*) e 4) Controle da hemolinfa (sem imunização). De cada grupo experimental, foram obtidas hemolinfas que passaram por três diferentes processamentos: a) Hemolinfa completa (HC); b) Hemolinfa livre de hemócitos (HL); c) Hemócitos isolados (HI). Sua atividade sobre a formação do biofilme foi avaliada pela contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/mL); quantificação de biomassa total (cristal violeta); atividade metabólica (XTT) e quantificação de espécies reativas de oxigênio (ROS). Em todos os testes foi utilizado o programa GraphPad Prism 8.0, com nível de significância de 5%. A atividade antimicrobiana da hemolinfa e suas frações, foi independente do microrganismo imunizante, sendo seu efeito mais influenciado pelo tempo de pós-imunização e processamento. No ensaio de UFC/mL, a fração HL de 48h de imunização apresentou a maior inibição, reduzindo 3,95 Log₁₀. Já a HI exibiu efeitos expressivos em todos os tempos com reduções superiores a 6 Log₁₀. A HC com 24h de imunização apresentou até 4,94 Log₁₀. A análise por cristal violeta demonstrou redução significativa da biomassa do biofilme, em destaque as frações HL e HI, quando comparadas com o CC. A HC apresentou comportamento distinto em relação as demais frações, apresentando uma redução de menor magnitude. No ensaio de XTT, redução ambas as frações demonstraram atividade metabólica indetectável em todas as densidades avaliadas. Na quantificação de ROS, a HC e a fração HL apresentaram aumento progressivo na produção de ROS nos tempos de 18h e 24h. Diante do exposto, conclui-se que a imunização com diferentes microrganismos é capaz de induzir respostas imunes específicas e/ou cruzadas, e que a extensão da atividade antimicrobiana e antibiofilme da hemolinfa está diretamente associada ao pico e ao tipo da resposta imune larval. Desse modo, esses resultados reforçam o potencial desse modelo como fonte de biomoléculas naturais para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas frente à resistência antimicrobiana.

Palavras-chave: *Galleria mellonella*; sistema imune; resistência antimicrobiana; *Staphylococcus aureus*

ABSTRACT

Silva FAS. Analysis of the antibacterial activity of Galleria mellonella hemolymph from immunization with Staphylococcus aureus and Candida albicans [dissertation]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, 2026.

Antimicrobial resistance, intensified by the indiscriminate use of antibiotics and aggravated during the COVID-19 pandemic, has favored the emergence of resistant pathogens, such as Staphylococcus aureus, a Gram-positive coccus bacterium associated with nosocomial and community infections and with a high capacity to acquire resistance mechanisms, making the development of new therapeutic strategies urgent. In this context, natural products have gained relevance as sources of biomolecules with antimicrobial activity, and the invertebrate Galleria mellonella stands out as a promising source of natural compounds. Therefore, this study investigated the antimicrobial activity of the hemolymph of G. mellonella larvae, under different immunizations, post-immunization time (24, 48 and 72h) and processing, on the formation of S. aureus biofilms. For this, four experimental groups were evaluated: 1) Growth control (CC); 2) IM Sa (immunized with S. aureus); 3) IM Ca (immunized with C. albicans) and 4) Hemolymph control (no immunization). From each experimental group, hemolymphs were obtained and underwent three different processing: a) Complete hemolymph (CH); b) Hemocyte-free hemolymph (HF); c) Isolated hemocytes (IH). Its activity on biofilm formation was evaluated by counting colony-forming units (CFU/mL); quantification of total biomass (violet crystal); metabolic activity (XTT) and quantification of reactive oxygen species (ROS). In all tests, the GraphPad Prism 8.0 program was used, with a significance level of 5%. The antimicrobial activity of hemolymph and fractions was independent of the immunizing microorganism, and its effect was more influenced by the post-immunization time and processing. In the CFU/mL assay, the 48-hour HF immunization fraction showed the highest inhibition, reducing 3.95 Log₁₀. IH, on the other hand, exhibited significant effects at all times with reductions greater than 6 Log₁₀. The HC with 24 hours of immunization showed up to 4.94 Log₁₀. The violet crystal analysis showed a significant reduction in the biomass of the biofilm, especially the HF and IH fractions, when compared to the CC. The CH showed a different behavior in relation to the other fractions, showing a reduction of lower magnitude. In the XTT assay, both fractions showed undetectable metabolic activity at all densities evaluated. In the quantification of ROS, the CH and the HF fraction showed a progressive increase in ROS production at 18h and 24h. In view of the above, it is concluded that immunization with different microorganisms is capable of inducing specific and/or cross-immune responses, and that the extent of antimicrobial and antibiofilm activity of hemolymph is directly associated with the peak and type of larval immune response. Thus, these results reinforce the potential of this model as a source of natural biomolecules for the development of new therapeutic approaches against antimicrobial resistance

Keywords: Galleria mellonella; immune system; antimicrobial resistance; Staphylococcus aureus

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	19
2.1.1 Fatores de virulência.....	20
2.2 Modelos experimentais <i>in vivo</i> alternativos ao uso de vertebrados	24
2.2.1 <i>Galleria mellonella</i>	25
2.2.2 Sistema imune	26
2.2.3 Resposta celular	26
2.2.4 Resposta humoral	27
2.2.5 <i>Priming</i> imunológico	29
3 PROPOSIÇÃO	30
3.1 Objetivo geral.....	30
3.1.1 Objetivos específicos.....	30
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1 Microrganismos	32
4.2 Larvas de <i>G. mellonella</i>.....	34
4.2.1 Grupos experimentais.....	34
4.3 Imunização das larvas de <i>G. mellonella</i>	35
4.3.1 Inibição da melanização pós extração.....	36
4.3.2 Processamento da hemolinfa.....	36
4.4 Testes <i>in vitro</i>	37
4.4.1 Avaliação do efeito da hemolinfa imunizada na formação de biofilme.....	37
4.4.2 Análise dos biofilmes pela contagem de células viáveis.....	37
4.4.3 Análise do biofilme por cristal violeta (biomassa)	38
4.4.4 Análise da atividade metabólica do biofilme	38
4.4.5 Quantificação de espécies reativas de oxigênio (ROS)	39
4.6 Análise estatística	39
5 RESULTADOS.....	40
5.1 Inibição da melanização pós extração.....	40

5.2 Avaliação do efeito da hemolinfa imunizada na formação de biofilme .	41
5.2.1 Análise dos biofilmes pela contagem de células viáveis.....	41
5.2.2 Análise do biofilme por cristal violeta (biomassa)	48
5.2.3 Análise da atividade metabólica do biofilme	51
5.2.4 Quantificação das espécies reativas de oxigênio (ROS)	53
6 DISCUSSÃO	57
7 CONCLUSÃO	65
REFERÊNCIAS.....	66

1 INTRODUÇÃO

No início da era dos antibióticos, cepas resistentes eram pouco frequentes e geralmente associadas a infecções nosocomiais. Contudo, atualmente, o surgimento desses microrganismos tornou-se cada vez mais comum, contribuindo para o aumento da mortalidade, morbidade e para a necessidade de uso prolongado de antibióticos (Bharadwaj et al., 2022). O uso indiscriminado de antibióticos na medicina e na indústria agroalimentícia, favorece a seleção de patógenos resistentes, tornando o tratamento de infecções bacterianas cada vez mais desafiador. Diante disso, a resistência antimicrobiana se consolidou como um dos mais graves desafios para a saúde pública mundial (Bharadwaj et al., 2022; Christaki et al., 2020; Wang et al., 2020).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a resistência antimicrobiana é uma das principais ameaças à saúde pública mundial (World Health Organization, 2025). Projeções recentes indicam que caso o atual ritmo seja mantido, entre os anos de 2025 e 2050 as mortes associadas a resistência antimicrobiana poderão chegar a aproximadamente 39 milhões (Naghavi et al., 2024). Além do impacto na mortalidade, a resistência antimicrobiana pode elevar os gastos aos sistemas de saúde, podendo atingir US\$ 159 bilhões anuais até 2050, se nenhuma medida for tomada (Laurence et al., 2025). Esse cenário já se encontra em andamento, em 2021 aproximadamente 4,71 milhões de mortes foram associadas a patógenos resistentes, das quais 1,14 milhão foram diretamente atribuídas a eles (Naghavi et al., 2024). Além disso, estimativas globais indicam que aproximadamente US\$ 66 bilhões anuais foram gastos no tratamento de infecções resistentes (valores ajustados para 2022) (Laurence et al., 2025). Desse modo a resistência antimicrobiana não impacta apenas de forma clínica, mas também de forma econômica, o que reforça a urgência no desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos.

Apesar dessa necessidade, barreiras econômicas, regulatórias e científicas ainda retardam a criação de novos fármacos (Farha et al., 2025; Gargate et al., 2025; Harbarth et al., 2014). O custo para desenvolver um único antimicrobiano pode ultrapassar US\$1,3 bilhões, e o retorno incerto desencoraja o interesse e o investimento de empresas farmacêuticas (Sertkaya, Franz, 2022; Renwick, Mossialos,

2018). Do ponto de vista científico, a identificação de novos alvos terapêuticos e a compreensão da permeabilidade bacteriana permanecem como desafios recorrentes, agravados pela escassez de métodos experimentais adequados para avaliar a ação e a agregação dos compostos. Mesmo quando novos candidatos são identificados, ainda é necessário superar um processo regulatório rigoroso e complexo (Farha et al., 2025; Gargate et al., 2025). Além disso, a chegada de antimicrobianos ao mercado representa apenas parte da solução, uma vez que sua eficácia pode ser rapidamente comprometida pela capacidade das bactérias em desenvolver mecanismos de resistência (Keck et al., 2024; Laborda et al., 2024).

Diante desse cenário, em 2015 a OMS propôs o “Plano de Ação Global” para o desenvolvimento de estratégias de enfrentamento à resistência antimicrobiana. Esse plano envolve atividade como: a conscientização, prevenção, vigilância e pesquisa (Corrêa et al., 2023; Khouja et al., 2022). Desde sua implementação, foram observados avanços significativos no combate à resistência (Khouja et al., 2022; OPAS, 2022). No entanto, esses avanços sofreram um revés com o surgimento do novo coronavírus (SARS-CoV-2) e o início da pandemia, que redirecionaram a atenção mundial e os recursos antes voltados ao combate da resistência antimicrobiana (Corrêa et al., 2023; Khouja et al., 2022; Organização Pan-Americana da Saúde, 2022). Além disso, durante esse período houve um aumento no número de prescrições de antibióticos, resultando uma pressão seletiva sobre as bactérias, elevando os números de cepas resistentes (Lucien et al., 2021; Rodríguez-Baño et al., 2021; Segala et al., 2023).

Esse impacto tornou-se evidente também no Brasil. Segundo um levantamento feito pelo Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz), em parceria com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) e o Ministério da Saúde (MS), em 2020, primeiro ano da pandemia, foram registradas quase 2 mil amostras clínicas resistentes. Já em 2021, esse número ultrapassou 3,7 mil amostras confirmadas. Quando comparado esses dados com os coletados em 2019, ano pré-pandemia, foi constatado que os números triplicaram (Menezes, 2021).

Entre os microrganismos resistentes identificados nesse período, infecções causadas por *S. aureus* chamam atenção (de Oliveira Whitaker et al., 2025; Segala et al., 2023). Um estudo realizado em São Paulo, no Hospital das Clínicas, analisou o impacto da pandemia na incidência de infecções causadas por *S. aureus* resistente à

metecilina (MRSA). Os resultados revelaram um aumento de 94% nas unidades gerais e 46% nas Unidade de Terapia Intensiva (UTIs) em 2020, quando comparados ao período pré-pandemia de 2019 (Polly et al., 2022).

Staphylococcus aureus é uma bactéria Gram-positiva, comumente encontrada na microbiota humana, presente em cerca de 30% da população, sendo isolada principalmente na pele e na mucosa nasal (Howden et al., 2023; Park, Ronholm, 2021). Seu comportamento comensal torna sua colonização inofensiva, no entanto quando o hospedeiro sofre uma lesão ou passa por procedimento cirúrgico pode resultar em uma infecção oportunista, que variam de infecções leves de pele e mucosas a infecções graves, como osteomielite, endocardite, pneumonia, síndrome do choque tóxico, bacteremia, que pode evoluir para sepse, entre outras infeções (Douglas et al., 2023; Guo et al., 2020; Park, Ronholm, 2021). No contexto da resistência antimicrobiana, as infecções causadas por cepas resistentes de *S. aureus* podem dificultar o tratamento e agravar o quadro clínico, levando ao aumento da mortalidade. Em 2021, a cepa MRSA foi associada a aproximadamente a 550 mil mortes e responsável por cerca de 330 mil mortes atribuídas (Naghavi et al., 2024).

A expressão de fatores de virulência reflete diretamente na gravidade das infecções provocados por *S. aureus*, incluindo mecanismos de evasão do sistema imune do hospedeiro, adesão, liberação de toxinas e formação de biofilme (H. Chen et al., 2022; Park, Ronholm, 2021). A capacidade de evasão imunológica e de adesão estão relacionadas, principalmente, a expressão de proteínas como a proteína A (SpA), a proteína de adesão extracelular (Eap) e a proteína ligadora de fibronectina (FnbpB) (Chen et al., 2022; Howden et al., 2023; Linz et al., 2023). Já a liberação de toxinas está intimamente associada à patogenicidade da bactéria, sendo possível classificá-las em três grupos: toxinas formadoras de poros (α -hemolisina, γ -hemolisina e δ -hemolisina), toxinas esfoliativas (A/B/C/D) e superantígenos (Linz et al., 2023; Oliveira et al., 2018).

Ainda sobre fatores de virulência, a formação do biofilme merece destaque. Esse processo consiste em um aglomerado de células microbianas aderidas à uma superfície, envoltos por uma matriz extracelular, a qual confere proteção à comunidade bacteriana e facilita a comunicação célula-célula (Craft et al., 2019). O biofilme desempenha um papel crucial na persistência das infecções por *S. aureus*, proporcionando maior proteção contra agentes antimicrobianos e ao sistema imune,

além de favorecer a transferência de genes de resistência entre as bactérias (Guo et al., 2020; Howden et al., 2023; Parastan et al., 2020).

Além da capacidade de formar biofilme, *S. aureus* possui facilidade em adquirir mecanismos de resistência a antibióticos, seja por mutação ou transferência horizontal de genes de resistência provenientes de outras bactérias (Craft et al., 2019; Linz et al., 2023). Esses mecanismos podem resultar na redução da permeabilidade do fármaco, alteração do alvo, inativação enzimática e superexpressão de bomba efluxo (Guo et al., 2020; Yilmaz, Aslantaş, 2017). Um exemplo da sua capacidade adaptativa é o surgimento da cepa MRSA, a qual apresenta resistência a maioria dos β -lactâmicos devido à aquisição do gene *mecA*, que resulta na alteração do sítio alvo (Lakhundi, Zhang, 2018; Lee et al., 2018). Essa cepa, ocupa uma posição de destaque na lista de microrganismos prioritários da OMS, devido as opções limitadas para seu controle (Ali Alghamdi et al., 2023; Guo et al., 2020).

Atualmente a vancomicina, é o principal antibiótico empregado no tratamento de infecções graves por MRSA, contudo, cepas resistentes à vancomicina (VRSA) já são realidade vivenciada no mundo (Cheung et al., 2021; Guo et al., 2020). O surgimento desses mecanismos de resistência limita as opções de tratamentos, desse modo, estudos recentes estão se voltando para identificação de compostos naturais com ação antimicrobiana contra *S. aureus* (Álvarez-Martínez et al., 2020; Douglas et al., 2023).

Produtos naturais têm fornecido uma base importante para o desenvolvimento de antibióticos de diferentes classes, como β -lactâmicos, tetraciclina, lincosamida, aminoglicosídeos, glicopeptídeos e macrolídeo (Elmaidomy et al., 2022). A diversidade estrutural dessas biomoléculas, que resulta em propriedades e mecanismos de ações distintos, tem despertado crescente interesse na investigação de composto com atividade antimicrobiana, visando o desenvolvimento de novas medidas terapêuticas (Abdel-Razek et al., 2020; Álvarez-Martínez et al., 2020). Apesar da sua popularidade, ainda há muito a ser explorado, considerando à grande variedade de fontes naturais disponíveis, que incluem microrganismos, plantas e animais (Álvarez-Martínez et al., 2020; Atanasov et al., 2021).

Entre os animais, os invertebrados são possíveis fontes de compostos naturais com atividade antimicrobiana (Álvarez-Martínez et al., 2020; Mahanta et al., 2023; Zhou et al., 2024). Na última década, a larva de *Galleria mellonella*, mais conhecida

como traça-da-cera, vem se destacando como modelo *in vivo* alternativo para estudar a relação patógeno hospedeiro de infecções bacterianas, fúngicas e parasitárias. Esse modelo também vem sendo explorado como um teste pré-triagem, possibilitando avaliar a eficácia e toxicidade de novos antimicrobianos (Kavanagh, Sheehan, 2018; Pereira et al., 2020; Tomiotto-Pellissier et al., 2016; Tsai et al., 2016).

A popularidade deste modelo está crescendo devido às vantagens que apresenta sobre modelos tradicionais, como: baixo custo, reprodução em larga escala, variedade vias de infecção (oral, cutânea e sistêmica), possibilidade de incubação à temperatura de 37 °C, ausência da aprovação do Comitê de Ética e facilidade na sua manipulação. Outra vantagem é que sua utilização vai de acordo com o princípio 3R's (Replace, Reduce, Refine), já que é possível reduzir o número de vertebrados utilizados a partir de uma triagem com as larvas de *G. mellonella* (Campos-Silva et al., 2019; Ménard et al., 2021; Serrano et al., 2023; Tsai et al., 2016).

A resposta imune da larva de *G. mellonella* traz algumas similaridades com o sistema imune inato dos mamíferos, esse fator é um dos pontos mais importantes na escolha desse modelo para estudos (Gallorini et al., 2024; Jorjão et al., 2018; Kavanagh, Sheehan, 2018; Serrano et al., 2023). Seu sistema imunológico é dividido em duas respostas: celular e humoral, e apesar dessa divisão é possível notar a ação conjunta das respostas (Serrano et al., 2023; Tsai et al., 2016).

A resposta celular é mediada por hemócitos que se encontram de maneira livre pela hemolinfa ou ligados a órgãos. Essas células são responsáveis por realizar a fagocitose, produção de superóxido, liberação de enzimas, encapsulamento e nodulação (Tsai et al., 2016). A resposta humoral é mediada por moléculas solúveis como, opsoninas, peptídeos antimicrobianos (AMPs), melanina e produtos criados por cascatas proteolíticas, como a via da fenoloxidase (PO) (Marena et al., 2025). As respostas imunes são desencadeadas a partir da identificação e interação dos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) como, peptidoglicano, lipopolissacarídeos (LPS), ácidos lipoteicoicos (LTA) e glucanos, com receptores de reconhecimento de padrões (PRR) presentes nos hemócitos (Serrano et al., 2023; Wu, Xu, et al., 2016).

Além do sistema imune inato, mamíferos dispõem de outra via imunológica, o sistema imune adaptativo, no entanto os invertebrados carecem desse sistema (Sheehan et al., 2020). Contudo, estudos apontam que alguns insetos apresentam

priming imunológico, esse fenômeno resulta no aumento da densidade de hemócitos circulantes e elevação de AMPs na hemolinfa, devido a exposição prévia por um patógeno, desafiando e aprimorando o sistema imune fazendo com que haja maiores chances de sobrevivência do inseto em uma infecção secundária com o mesmo patógeno (Browne et al., 2013; Cooper, Eleftherianos, 2017; Sheehan et al., 2020). Na literatura ainda há pouco sobre como esse processo funciona, grau de especificidade da resposta e a possibilidade do isolamento de moléculas com potencial antimicrobiano (Wu, Xu, et al., 2016). Diante disso, o objetivo desse trabalho é investigar a atividade antibacteriana da hemolinfa da larva de *G. mellonella* imunizada com *S. aureus* e *Candida albicans* inativadas, na formação de biofilmes de *S. aureus*.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, concluiu-se que:

- a) A combinação de IPS com PTU apresentam melhor inibição da melanização da hemolinfa pós extração, preservando suas características físico-químicas.
- b) O tempo de imunização está inteiramente ligado ao pico de resposta imunológica e atividade antimicrobiana, variando entre as frações.
- c) A imunização com diferentes microrganismos, sendo bactéria ou fungo, induziu a resposta imune, resultando em uma resposta cruzada, independente do produto final.
- d) A hemolinfa e suas frações apresentaram redução da viabilidade celular, independente da densidade inicial do biofilme, em destaque as frações HL e HI. O efeito da fração HL sobre a viabilidade do biofilme que pode estar relacionado com aumento e o surgimento de AMPs após a imunização. A fração HI apresentou efeito maior, sendo associado principalmente a possível ação conjunta de fagocitose e a liberação de AMPs. A HC, com redução moderada não exibiu sinergismo entre as respostas celular e humoral.
- e) As frações HL e HI foram capazes de desestruturar e inibir a formação do biofilme, reduzindo a biomassa total e a atividade metabólica.

Portanto, dentro das limitações do estudo, os resultados obtidos indicam que a hemolinfa imunizada apresenta potencial para o isolamento de moléculas com potencial antimicrobiano.

REFERÊNCIAS

- Abdel-Razek AS, El-Naggar ME, Allam A, Morsy OM, Othman SI. Microbial Natural Products in Drug Discovery. *Processes* 2020, Vol 8, Page 470. 2020;8(4):470. doi: 10.3390/PR8040470.
- Aboelnaga N, Elsayed SW, Abdelsalam NA, Salem S, Saif NA, Elsayed M, et al. Deciphering the dynamics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm formation: from molecular signaling to nanotherapeutic advances. *Cell Communication and Signaling* 2024 22:1. 2024;22(1):188-. doi: 10.1186/S12964-024-01511-2.
- Adamo S. The Integrated Defense System: Optimizing Defense against Predators, Pathogens, and Poisons. *Integr Comp Biol*. 2022a;62(6):1536–46. doi: 10.1093/ICB/ICAC024.
- Ali Alghamdi B, Al-Johani I, Al-Shamrani JM, Musamed Alshamrani H, Al-Otaibi BG, Almazmomi K, et al. Antimicrobial resistance in methicillin-resistant *staphylococcus aureus*. *Saudi J Biol Sci*. 2023;30(4):103604. doi: 10.1016/J.SJBS.2023.103604.
- Álvarez-Martínez FJ, Barrajón-Catalán E, Micol V. Tackling Antibiotic Resistance with Compounds of Natural Origin: A Comprehensive Review. *Biomedicines*. 2020;8(10):405. doi: 10.3390/BIMEDICINES8100405.
- Andrejko M, Mak P, Siemińska-Kuczer A, Iwański B, Wojda I, Suder P, et al. A comparison of the production of antimicrobial peptides and proteins by *Galleria mellonella* larvae in response to infection with two *Pseudomonas aeruginosa* strains differing in the profile of secreted proteases. *J Insect Physiol*. 2021;131:104239. doi: 10.1016/J.JINSPHYS.2021.104239.
- Atanasov AG, Zotchev SB, Dirsch VM, Orhan IE, Banach M, Rollinger JM, et al. Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery* 2021 20:3. 2021;20(3):200–16. doi: 10.1038/s41573-020-00114-z.
- Barbarossa A, Rosato A, Tardugno R, Carrieri A, Corbo F, Limongelli F, et al. Antibiofilm Effects of Plant Extracts Against *Staphylococcus aureus*. *Microorganisms*. 2025;13(2):454. doi: 10.3390/MICROORGANISMS13020454/S1.
- de Barros PP, Rossoni RD, Garcia MT, Kaminski V de L, Loures FV, Fuchs BB, et al. The Anti-Biofilm Efficacy of Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) In Vitro and a Murine Model of Oral Candidiasis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;11. doi: 10.3389/FCIMB.2021.700305.
- Behbehani JM, Irshad M, Shreaz S, Karched M. Anticandidal Activity of Capsaicin and Its Effect on Ergosterol Biosynthesis and Membrane Integrity of *Candida albicans*. *Int J Mol Sci*. 2023;24(2):1046. doi: 10.3390/IJMS24021046/S1.

Di Bella S, Marini B, Stroffolini G, Geremia N, Giacobbe DR, Campanile F, et al. The virulence toolkit of *Staphylococcus aureus*: a comprehensive review of toxin diversity, molecular mechanisms, and clinical implications. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 2025 44:8. 2025;44(8):1797–816. doi: 10.1007/S10096-025-05148-Y.

Bharadwaj A, Rastogi A, Pandey S, Gupta S, Sohal JS. Multidrug-Resistant Bacteria: Their Mechanism of Action and Prophylaxis. *Biomed Res Int.* 2022;2022(1):5419874. doi: 10.1155/2022/5419874.

Braissant O, Astasov-Frauenhoffer M, Waltimo T, Bonkat G. A Review of Methods to Determine Viability, Vitality, and Metabolic Rates in Microbiology. *Front Microbiol.* 2020;11:547458. doi: 10.3389/FMICB.2020.547458/FULL.

Brown SE, Howard A, Kasprzak AB, Gordon KH, East PD. A peptidomics study reveals the impressive antimicrobial peptide arsenal of the wax moth *Galleria mellonella*. *Insect Biochem Mol Biol.* 2009;39(11):792–800. doi: 10.1016/J.IBMB.2009.09.004.

Browne N, Heelan M, Kavanagh K. An analysis of the structural and functional similarities of insect hemocytes and mammalian phagocytes. *Virulence.* 2013;4(7):597–603. doi: 10.4161/VIRU.25906.

Bucataru C, Ciobanasu C. Antimicrobial peptides: Opportunities and challenges in overcoming resistance. *Microbiol Res.* 2024;286. doi: 10.1016/j.micres.2024.127822.

Campos-Silva R, Brust FR, Trentin DS, Macedo AJ. Alternative method in *Galleria mellonella* larvae to study biofilm infection and treatment. *Microb Pathog.* 2019;137. doi: 10.1016/J.MICPATH.2019.103756.

Chen H, Zhang J, He Y, Lv Z, Liang Z, Chen J, et al. Exploring the Role of *Staphylococcus aureus* in Inflammatory Diseases. *Toxins* 2022, Vol 14, Page 464. 2022;14(7):464. doi: 10.3390/TOXINS14070464.

Chen RY, Keddie BA. *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) Hemocytes Release Extracellular Traps That Confer Protection Against Bacterial Infection in the Hemocoel. *J Insect Sci.* 2021;21(6). doi: 10.1093/JISESA/IEAB092.

Cheung GYC, Bae JS, Otto M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence.* 2021;12(1):547–69. doi: 10.1080/21505594.2021.1878688.

Clark KD. Insect Hemolymph Immune Complexes. *Subcell Biochem.* 2020;94:123–61. doi: 10.1007/978-3-030-41769-7_5.

Contreras-Garduño J, Lanz-Mendoza H, Franco B, Nava A, Pedraza-Reyes M, Canales-Lazcano J. Insect immune priming: ecology and experimental evidences. *Ecol Entomol.* 2016;41(4):351–66. doi: 10.1111/EEN.12300.

Cooper D, Eleftherianos I. Memory and specificity in the insect immune system: Current perspectives and future challenges. *Front Immunol.* 2017;8(MAY):250483. doi: 10.3389/FIMMU.2017.00539/TEXT.

Corrêa JS, Zago LF, Da Silva-Brandão RR, de Oliveira SM, Fracolli LA, Padoveze MC, et al. The governance of antimicrobial resistance in Brazil: Challenges for developing and implementing a one health agenda. *Glob Public Health.* 2023;18(1). doi: 10.1080/17441692.2023.2190381.

Coste Grahl M V., Perin APA, Lopes FC, Porto BN, Uberti AF, Canavoso LE, et al. The role of extracellular nucleic acids in the immune system modulation of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). *Pestic Biochem Physiol.* 2020;167:104591. doi: 10.1016/J.PESTBP.2020.104591.

Craft KM, Nguyen JM, Berg LJ, Townsend SD. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): antibiotic-resistance and the biofilm phenotype. *Medchemcomm.* 2019;10(8):1231. doi: 10.1039/C9MD00044E.

da Cruz Nizer WS, Adams ME, Allison KN, Montgomery MC, Mosher H, Cassol E, et al. Oxidative stress responses in biofilms. *Biofilm.* 2024;7:100203. doi: 10.1016/J.BIOFLM.2024.100203.

Cutuli MA, Petronio Petronio G, Vergalito F, Magnifico I, Pietrangelo L, Venditti N, et al. *Galleria mellonella* as a consolidated in vivo model hosts: New developments in antibacterial strategies and novel drug testing. *Virulence.* 2019;10(1):527–41. doi: 10.1080/21505594.2019.1621649.

Dang X, Wang G. Spotlight on Select New Antimicrobial Innate Immune Peptides Discovered during 2015–2019. *Curr Top Med Chem.* 2020;20(32):2984. doi: 10.2174/1568026620666201022143625.

Demir D, Gençer N, Er A. Purification and characterization of prophenoloxidase from *Galleria mellonella* L. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology.* 2012;40(6):391–5. doi: 10.3109/10731199.2012.696060.

Douglas EJA, Wulandari SW, Lovell SD, Laabei M. Novel antimicrobial strategies to treat multi-drug resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Microb Biotechnol.* 2023;16(7):1456. doi: 10.1111/1751-7915.14268.

Elmaidomy AH, Shady NH, Abdeljawad KM, Elzamkan MB, Helmy HH, Tarshan EA, et al. Antimicrobial potentials of natural products against multidrug resistance pathogens: a comprehensive review. *RSC Adv.* 2022;12(45):29078–102. doi: 10.1039/D2RA04884A.

Evans DCS, Mitkin AA, Rohde H, Meyer RL. Extracellular DNA and polysaccharide intercellular adhesin protect *Staphylococcus epidermidis* biofilms from phagocytosis by polymorphonuclear neutrophils. *Microbiol Res.* 2025;297:128176–128176. doi: 10.1016/J.MICRES.2025.128176.

Farha MA, Tu MM, Brown ED. Important challenges to finding new leads for new antibiotics. *Curr Opin Microbiol*. 2025;83. doi: 10.1016/j.mib.2024.102562.

Figueiredo-Godoi LMA, Garcia MT, Pinto JG, Ferreira-Strixino J, Faustino EG, Pedroso LLC, et al. Antimicrobial Photodynamic Therapy Mediated by Fotenticine and Methylene Blue on Planktonic Growth, Biofilms, and Burn Infections of *Acinetobacter baumannii*. *Antibiotics (Basel)*. 2022;11(5). doi: 10.3390/ANTIBIOTICS11050619.

Freires IA, Morelo DFC, Soares LFF, Costa IS, de Araújo LP, Breseghello I, et al. Progress and promise of alternative animal and non-animal methods in biomedical research. *Archives of Toxicology* 2023 97:9. 2023;97(9):2329–42. doi: 10.1007/S00204-023-03532-1.

Gallorini M, Marinacci B, Pellegrini B, Cataldi A, Dindo ML, Carradori S, et al. Immunophenotyping of hemocytes from infected *Galleria mellonella* larvae as an innovative tool for immune profiling, infection studies and drug screening. *Scientific Reports* 2024 14:1. 2024;14(1):759-. doi: 10.1038/s41598-024-51316-z.

Gargate N, Laws M, Khondaker &, Rahman M. Current economic and regulatory challenges in developing antibiotics for Gram-negative bacteria. *Npj Antimicrobials and Resistance* 2025 3:1. 2025;3(1):50-. doi: 10.1038/s44259-025-00123-1.

Guo H, Tong Y, Cheng J, Abbas Z, Li Z, Wang J, et al. Biofilm and Small Colony Variants—An Update on *Staphylococcus aureus* Strategies toward Drug Resistance. *International Journal of Molecular Sciences* 2022, Vol 23, Page 1241. 2022;23(3):1241. doi: 10.3390/IJMS23031241.

Guo Y, Song G, Sun M, Wang J, Wang Y. Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10:511382. doi: 10.3389/FCIMB.2020.00107/EPUB.

Harbarth S, consortium on behalf of the D-A, Theuretzbacher U, consortium on behalf of the D-A, Hackett J, consortium on behalf of the D-A, et al. Antibiotic research and development: business as usual? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2015;70(6):1604–7. doi: 10.1093/JAC/DKV020.

Hosni EM, Al-Khalaf AA, Nasser MG, Abou-Shaara HF, Radwan MH. Modeling the Potential Global Distribution of Honeybee Pest, *Galleria mellonella* under Changing Climate. *Insects*. 2022;13(5):484. doi: 10.3390/INSECTS13050484/S1.

Howden BP, Giulieri SG, Wong Fok Lung T, Baines SL, Sharkey LK, Lee JYH, et al. *Staphylococcus aureus* host interactions and adaptation. *Nature Reviews Microbiology* 2023 21:6. 2023;21(6):380–95. doi: 10.1038/s41579-023-00852-y.

Jorjão AL, Oliveira LD, Scorzoni L, Figueiredo-Godoi LMA, Prata MCA, Jorge AOC, et al. From moths to caterpillars: Ideal conditions for *Galleria mellonella* rearing for in vivo microbiological studies. *Virulence*. 2018;9(1):383. doi: 10.1080/21505594.2017.1397871.

- Kamble E, Sanghvi P, Pardesi K. Synergistic effect of antibiotic combinations on *Staphylococcus aureus* biofilms and their persister cell populations. *Biofilm*. 2022;4:100068. doi: 10.1016/J.BIOFLM.2022.100068.
- Kavanagh K, Sheehan G. The Use of *Galleria mellonella* Larvae to Identify Novel Antimicrobial Agents against Fungal Species of Medical Interest. *Journal of Fungi* 2018, Vol 4, Page 113. 2018;4(3):113. doi: 10.3390/JOF4030113.
- Kaya S, Turgut Genç T, Günay M. Hemocytes: Central drivers of antimicrobial peptide expression and immune proteins in both cellular and humoral responses of *Galleria mellonella*. *Entomol Exp Appl*. 2025;173(9):1000–10. doi: 10.1111/eea.13607
- Keck JM, Viteri A, Schultz J, Fong R, Whitman C, Poush M, et al. New Agents Are Coming, and So Is the Resistance. *Antibiotics*. 2024;13(7):648. doi: 10.3390/ANTIBIOTICS13070648.
- Khouja T, Mitsantisuk K, Tadrous M, Suda KJ. Global consumption of antimicrobials: impact of the WHO Global Action Plan on Antimicrobial Resistance and 2019 coronavirus pandemic (COVID-19). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2022;77(5):1491–9. doi: 10.1093/JAC/DKAC028.
- Krishnan N, Xu J. Editorial: Invertebrates as model organisms: opportunities and challenges in physiology and bioscience research. *Front Physiol*. 2023;14:1244594. doi: 10.3389/FPHYS.2023.1244594/TEXT.
- Kurtz J, Andino R, Boraschi D, Contreras-Garduño J, Kachroo A, Khan I, et al. Trained immunity and immune priming in plants and invertebrates. *Elife*. 2025;14. doi: 10.7554/ELIFE.106597.
- Kwadha CA, Ong'amo GO, Ndegwa PN, Raina SK, Fombong AT, Stout MJ, et al. The Biology and Control of the Greater Wax Moth, *Galleria mellonella*. *Insects* 2017, Vol 8, Page 61. 2017;8(2):61. doi: 10.3390/INSECTS8020061.
- Laborda P, Gil-Gil T, Martínez JL, Hernando-Amado S. Preserving the efficacy of antibiotics to tackle antibiotic resistance. *Microb Biotechnol*. 2024;17(7):e14528. doi: 10.1111/1751-7915.14528.
- Lakhundi S, Zhang K. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. *Clin Microbiol Rev*. 2018;31(4):e00020-18. doi: 10.1128/CMR.00020-18.
- Laurence T, Lamberti O, Smith R, Drake T, McDonnell A. The Global Direct Inpatient Cost of Antimicrobial Resistance: A Modelling Study 2025;
- Lee AS, De Lencastre H, Garau J, Kluytmans J, Malhotra-Kumar S, Peschel A, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Dis Primers*. 2018;4(1):18033-. doi: 10.1038/NRDP.2018.33.

Liang J, Huang TY, Mao Y, Li X. Biofilm formation of two genetically diverse *Staphylococcus aureus* isolates under beta-lactam antibiotics. *Front Microbiol.* 2023;14:1139753. doi: 10.3389/FMICB.2023.1139753/REFERENCE.

Liang Y, Zhang H, Dai S, Cong Y, Wu W. Inhibiting *Staphylococcus aureus* Virulence Factors: Advances in Traditional Chinese Medicines and Active Compounds. *Curr Microbiol.* 2025;82(6). doi: 10.1007/S00284-025-04236-8.

De Lima Gualque MW, Vaso CO, dos Santos KS, Galeane MC, Gomes PC, Palma MS, et al. Peptides from *Galleria mellonella* against *Cryptococcus* spp: toxicity in three-dimensional cell cultures and *G. mellonella*. *Future Microbiol.* 2024;20(1):11. doi: 10.1080/17460913.2024.2421632.

Linz MS, Mattappallil A, Finkel D, Parker D. Clinical Impact of *Staphylococcus aureus* Skin and Soft Tissue Infections. *Antibiotics.* 2023;12(3):557. doi: 10.3390/ANTIBIOTICS12030557.

Liu JJ, Madec JY, Bousquet-Mélou A, Haenni M, Ferran AA. Destruction of *Staphylococcus aureus* biofilms by combining an antibiotic with subtilisin A or calcium gluconate. *Scientific Reports* 2021 11:1. 2021;11(1):6225-. doi: 10.1038/s41598-021-85722-4.

Lucien MAB, Canarie MF, Kilgore PE, Jean-Denis G, Fénélon N, Pierre M, et al. Antibiotics and antimicrobial resistance in the COVID-19 era: Perspective from resource-limited settings. *International Journal of Infectious Diseases.* 2021;104:250–4. doi: 10.1016/j.ijid.2020.12.087.

MacArthur Clark J. The 3Rs in research: a contemporary approach to replacement, reduction and refinement. *Br J Nutr.* 2018;120(s1):S1–7. doi: 10.1017/S0007114517002227.

Mahanta DK, Bhoi TK, Komal J, Samal I, Nikhil RM, Paschapur AU, et al. Insect-pathogen crosstalk and the cellular-molecular mechanisms of insect immunity: uncovering the underlying signaling pathways and immune regulatory function of non-coding RNAs. *Front Immunol.* 2023;14:1169152. doi: 10.3389/FIMMU.2023.1169152/FULL.

Marena GD, Thomaz L, Nosanchuk JD, Taborda CP. *Galleria mellonella* as an Invertebrate Model for Studying Fungal Infections. *Journal of Fungi.* 2025;11(2):157. doi: 10.3390/JOF11020157.

Marieshwari BN, Bhuvaragavan S, Sruthi K, Mullainadhan P, Janarthanan S. Insect phenoloxidase and its diverse roles: melanogenesis and beyond. *Journal of Comparative Physiology B* 2022 193:1. 2022;193(1):1–23. doi: 10.1007/S00360-022-01468-Z.

Marmaras VJ, Lampropoulou M. Regulators and signalling in insect haemocyte immunity. *Cell Signal.* 2009;21(2):186–95. doi: 10.1016/J.CELLSIG.2008.08.014.

Mba IE, Nweze EI. Antimicrobial Peptides Therapy: An Emerging Alternative for Treating Drug-Resistant Bacteria. *Yale J Biol Med*. 2022a;95(4):445.

Ménard G, Rouillon A, Cattoir V, Donnio PY. *Galleria mellonella* as a Suitable Model of Bacterial Infection: Past, Present and Future. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;11:782733. doi: 10.3389/FCIMB.2021.782733.

Méndez-López TT, Carrero JC, Lanz-Mendoza H, Ochoa-Zarzosa A, Mukherjee K, Contreras-Garduño J. Metabolism and immune memory in invertebrates: are they dissociated? *Front Immunol*. 2024;15:1379471. doi: 10.3389/fimmu.2024.1379471.

Menezes M. Detecção de bactérias resistentes a antibióticos triplicou na pandemia [Internet]. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 2021 [cited 2024 July 6]. Available from: <https://fiocruz.br/noticia/2021/11/deteccao-de-bacterias-resistentes-antibioticos-triplicou-na-pandemia>.

Moraes RM, Garcia MT, Stossi F, de Barros PP, Junqueira JC, Anbinder AL. Effects of α and β -adrenergic signaling on innate immunity and *Porphyromonas gingivalis* virulence in an invertebrate model. *Virulence*. 2022;13(1):1614–30. doi: 10.1080/21505594.2022.2123302.

Moret Y, Siva-Jothy MT. Adaptive innate immunity? Responsive-mode prophylaxis in the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2003;270(1532):2475. doi: 10.1098/RSPB.2003.2511.

Muntean M, Muntean A-A, Preda M, Manolescu L, Dragomirescu C, Popa M-I, et al. Phenotypic and genotypic detection methods for antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens (Review). *Exp Ther Med*. 2022;24(2):508–508. doi: 10.3892/ETM.2022.11435.

Naghavi M, Vollset SE, Ikuta KS, Swetschinski LR, Gray AP, Wool EE, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance 1990–2021: a systematic analysis with forecasts to 2050. *The Lancet*. 2024;404(10459):1199–226. doi: 10.1016/S0140-6736(24)01867-1.

Oliveira D, Borges A, Simões M. *Staphylococcus aureus* Toxins and Their Molecular Activity in Infectious Diseases. *Toxins (Basel)*. 2018;10(6):252. doi: 10.3390/TOXINS10060252.

de Oliveira Whitaker C, de Oliveira TLR, Ferreira ALP, Nouér SA, da Costa CR, Guimarães LF, et al. Clonal shift and impact of azithromycin use on antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bloodstream infection during the COVID-19 pandemic. *Scientific Reports* 2024 15:1. 2025;15(1):597-. doi: 10.1038/s41598-024-84307-1.

Organização Pan-Americana da Saúde. A resistência aos antimicrobianos, acelerada pela pandemia de COVID-19: informe de política. Washington, DC: OPAS; 2022

Parastan R, Kargar M, Solhjoo K, Kafilzadeh F. *Staphylococcus aureus* biofilms: Structures, antibiotic resistance, inhibition, and vaccines. *Gene Rep.* 2020;20:100739. doi: 10.1016/J.GENREP.2020.100739.

Park S, Ronholm J. *Staphylococcus aureus* in agriculture: Lessons in evolution from a multispecies pathogen. *Clin Microbiol Rev.* 2021;34(2):1–27. doi: 10.1128/CMR.00182-20.

Pereira MF, Rossi CC, Da Silva GC, Rosa JN, Bazzolli DMS. *Galleria mellonella* as an infection model: an in-depth look at why it works and practical considerations for successful application. *Pathog Dis.* 2020;78(8). doi: 10.1093/FEMSPD/FTAA056.

Pereira TC, Barros PP de, de Oliveira Fugisaki LR, Rossoni RD, Ribeiro F de C, Menezes RT de, et al. Recent Advances in the Use of *Galleria mellonella* Model to Study Immune Responses against Human Pathogens. *J Fungi (Basel).* 2018;4(4):E128–E128. doi: 10.3390/JOF4040128.

Pinho MG, Götz F, Peschel A. *Staphylococcus aureus*: a model for bacterial cell biology and pathogenesis. *J Bacteriol.* 2025;207(8). doi: 10.1128/jb.00106-25

Polly M, de Almeida BL, Lennon RP, Cortês MF, Costa SF, Guimarães T. Impact of the COVID-19 pandemic on the incidence of multidrug-resistant bacterial infections in an acute care hospital in Brazil. *Am J Infect Control.* 2022;50(1):32–8. doi: 10.1016/j.ajic.2021.09.018.

Rather MA, Gupta K, Mandal M. Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. *Brazilian Journal of Microbiology.* 2021;52(4):1701. doi: 10.1007/S42770-021-00624-X.

Renwick M, Mossialos E. What are the economic barriers of antibiotic R&D and how can we overcome them? *Expert Opin Drug Discov.* 2018;13(10):889–92. doi: 10.1080/17460441.2018.1515908.

Ribani A, Taurisano V, Utzeri VJ, Fontanesi L. Honey Environmental DNA Can Be Used to Detect and Monitor Honey Bee Pests: Development of Methods Useful to Identify *Aethina tumida* and *Galleria mellonella* Infestations. *Vet Sci.* 2022;9(5):213. doi: 10.3390/VETSCI9050213/S1.

Robinson NB, Krieger Katherine, Khan F, Huffman W, Chang M, Naik A, et al. The current state of animal models in research: A review. *International Journal of Surgery.* 2019;72:9–13. doi: 10.1016/J.IJSU.2019.10.015.

Rodríguez-Baño J, Rossolini GM, Schultsz C, Tacconelli E, Murthy S, Ohmagari N, et al. Key considerations on the potential impacts of the COVID-19 pandemic on antimicrobial resistance research and surveillance. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2021;115(10):1122–9. doi: 10.1093/TRSTMH/TRAB048.

Saharan BS, Beniwal N, Duhan JS. From formulation to function: A detailed review of microbial biofilms and their polymer-based extracellular substances. *The Microbe*. 2024;5:100194. doi: 10.1016/J.MICROB.2024.100194.

Segala FV, Pafundi PC, Masciocchi C, Fiori B, Taddei E, Antenucci L, et al. Incidence of bloodstream infections due to multidrug-resistant pathogens in ordinary wards and intensive care units before and during the COVID-19 pandemic: a real-life, retrospective observational study. *Infection*. 2023;51(4):1061–9. doi: 10.1007/S15010-023-02000-3.

Serrano I, Verdial C, Tavares L, Oliveira M. The Virtuous *Galleria mellonella* Model for Scientific Experimentation. *Antibiotics* 2023, Vol 12, Page 505. 2023;12(3):505. doi: 10.3390/ANTIBIOTICS12030505.

Sertkaya A, Franz C. Development and approval cost analysis. In: Sertkaya A, Franz C. *Antimicrobial drugs market returns analysis: final report* [Internet]. Washington (DC): Office of the Assistant Secretary for Planning and Evaluation (ASPE); 2022 Dec 16. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK603192/>

Sheehan G, Farrell G, Kavanagh K. Immune priming: the secret weapon of the insect world. *Virulence*. 2020;11(1):238. doi: 10.1080/21505594.2020.1731137.

Sheehan G, Margalit A, Sheehan D, Kavanagh K. Proteomic profiling of bacterial and fungal induced immune priming in *Galleria mellonella* larvae. *J Insect Physiol*. 2021;131:104213. doi: 10.1016/J.JINSPHYS.2021.104213.

Singkum P, Suwanmanee S, Pumeesat P, Luplertlop N. A powerful in vivo alternative model in scientific research: *Galleria mellonella*. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 2019;66(1):31–55. doi: 10.1556/030.66.2019.001.

Singulani JL, Scorzoni L, de Oliveira HC, Marcos CM, Assato PA, Fusco-Almeida AM, et al. Applications of Invertebrate Animal Models to Dimorphic Fungal Infections. *Journal of Fungi* 2018, Vol 4, Page 118. 2018;4(4):118. doi: 10.3390/JOF4040118.

Smith DFQ, Dragotakes Q, Kulkarni M, Hardwick JM, Casadevall A. *Galleria mellonella* immune melanization is fungicidal during infection. *Communications Biology* 2022 5:1. 2022;5(1):1364-. doi: 10.1038/s42003-022-04340-6.

Stączek S, Cytryńska M, Zdybicka-Barabas A. Unraveling the Role of Antimicrobial Peptides in Insects. *Int J Mol Sci*. 2023;24(6):5753–5753. doi: 10.3390/IJMS24065753.

Stanley D, Haas E, Kim Y. Beyond Cellular Immunity: On the Biological Significance of Insect Hemocytes. *Cells*. 2023;12(4):599. doi: 10.3390/CELLS12040599.

Stiefel P, Rosenberg U, Schneider J, Mauerhofer S, Maniura-Weber K, Ren Q. Is biofilm removal properly assessed? Comparison of different quantification methods in a 96-well plate system. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016;100(9):4135. doi: 10.1007/S00253-016-7396-9.

Sulek M, Kordaczuk J, Mak P, Śmiałek-Bartyzel J, Hulas-Stasiak M, Wojda I. Immune priming modulates *Galleria mellonella* and *Pseudomonas entomophila* interaction. Antimicrobial properties of Kazal peptide Pr13a. *Front Immunol.* 2024;15:1358247. doi: 10.3389/FIMMU.2024.1358247/FULL.

Tam K, Torres VJ. *Staphylococcus aureus* Secreted Toxins and Extracellular Enzymes. *Microbiol Spectr.* 2019;7(2):10.1128/microbiolspec.gpp3-0039–2018. doi: 10.1128/MICROBIOLSPEC.GPP3-0039-2018.

Taszkow P, Vertyporokh L, Wojda I. Humoral immune response of *Galleria mellonella* after repeated infection with *Bacillus thuringiensis*. *J Invertebr Pathol.* 2017;149:87–96. doi: 10.1016/j.jip.2017.08.008.

Terán-Murillo F, Ghosh E, Rantala MJ, Krams I, Krams R, Contreras-Garduño J. Does immune priming in *Galleria mellonella* reveal plastic mechanisms for survival? *Dev Comp Immunol.* 2025;169:105407–105407. doi: 10.1016/J.DCI.2025.105407.

Terreni M, Tacconi M, Pregnolato M. New Antibiotics for Multidrug-Resistant Bacterial Strains: Latest Research Developments and Future Perspectives. *Molecules* 2021, Vol 26, Page 2671. 2021;26(9):2671. doi: 10.3390/MOLECULES26092671.

Tomiotto-Pellissier F, Cataneo AHD, Orsini TM, Thomazelli APF dos S, Dalevedo GA, de Oliveira AG, et al. *Galleria mellonella* hemocytes: A novel phagocytic assay for *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *J Microbiol Methods.* 2016;131:45–50. doi: 10.1016/J.MIMET.2016.10.001.

Touaitia R, Mairi A, Ibrahim NA, Basher NS, Idres T, Touati A. *Staphylococcus aureus*: A Review of the Pathogenesis and Virulence Mechanisms. *Antibiotics.* 2025;14(5):470. doi: 10.3390/ANTIBIOTICS14050470.

Tsai CJY, Loh JMS, Proft T. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. *Virulence.* 2016;7(3):214–29. doi: 10.1080/21505594.2015.1135289.

Villani S, Calcagnile M, Demitri C, Alifano P. *Galleria mellonella* (Greater Wax Moth) as a Reliable Animal Model to Study the Efficacy of Nanomaterials in Fighting Pathogens. *Nanomaterials* 2025, Vol 15, Page 67. 2025;15(1):67. doi: 10.3390/NANO15010067.

Wang CH, Hsieh YH, Powers ZM, Kao CY. Defeating Antibiotic-Resistant Bacteria: Exploring Alternative Therapies for a Post-Antibiotic Era. *Int J Mol Sci.* 2020;21(3):1061. doi: 10.3390/IJMS21031061.

Wang J, Hu H, Pang S, Yin X, Cao B, Huang J, et al. Destruxin A inhibits the hemocytin-mediated hemolymph immunity of host insects to facilitate *Metarhizium* infection. *Cell Rep.* 2024;43(2). doi: 10.1016/j.celrep.2024.113686.

Wojda I. Immunity of the greater wax moth *Galleria mellonella*. *Insect Sci.* 2017;24(3):342–57. doi: 10.1111/1744-7917.12325.

Wojda I, Staniec B, Sulek M, Kordaczuk J. The greater wax moth *Galleria mellonella*: biology and use in immune studies. *Pathog Dis.* 2020;78(9). doi: 10.1093/FEMSPD/FTAA057.

World Health Organization. Global antibiotic resistance surveillance report 2025: WHO Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS). Geneva: World Health Organization; 2025.

Wu G, Liu Y, Ding Y, Yi Y. Ultrastructural and functional characterization of circulating hemocytes from *Galleria mellonella* larva: Cell types and their role in the innate immunity. *Tissue Cell.* 2016a;48(4):297–304. doi: 10.1016/J.TICE.2016.06.007.

Wu G, Xu L, Yi Y. *Galleria mellonella* larvae are capable of sensing the extent of priming agent and mounting proportionate cellular and humoral immune responses. *Immunol Lett.* 2016b;174:45–52. doi: 10.1016/J.IMLET.2016.04.013.

Wu X, Wang H, Xiong J, Yang GX, Hu JF, Zhu Q, et al. *Staphylococcus aureus* biofilm: Formulation, regulatory, and emerging natural products-derived therapeutics. *Biofilm.* 2024;7:100175. doi: 10.1016/J.BIOFLM.2023.100175.

Yakovlev AY, Nesin AP, Simonenko NP, Gordya NA, Tulin D V., Kruglikova AA, et al. Fat body and hemocyte contribution to the antimicrobial peptide synthesis in *Calliphora vicina* R.-D. (Diptera: Calliphoridae) larvae. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal* 2016 53:1. 2016;53(1):33–42. doi: 10.1007/S11626-016-0078-1.

Yan A, Kus J V., Sant N. The *Staphylococcus aureus* complex: implications for the clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol.* 2025;63(7). doi: 10.1128/JCM.01276-24.

Yilmaz EŞ, Aslantaş Ö. Antimicrobial resistance and underlying mechanisms in *Staphylococcus aureus* isolates. *Asian Pac J Trop Med.* 2017;10(11):1059–64. doi: 10.1016/J.APJTM.2017.10.003.

Zdybicka-Barabas A, St S, Aczek , Kunat-Budzyńska M, Budzyńska B, Cytryńska M, et al. Innate Immunity in Insects: The Lights and Shadows of Phenoloxidase System Activation. *International Journal of Molecular Sciences* 2025, Vol 26, Page 1320. 2025;26(3):1320. doi: 10.3390/IJMS26031320.

Zhao Jianying, Qian Jing, Luo Ji, Huang Mingming, Yan Wenjing, Zhang Jianhao, et al. Morphophysiological Changes in *Staphylococcus aureus* Biofilms Treated with Plasma-Activated Hydrogen Peroxide Solution. *Applied Sciences* 2021, Vol 11, Page 11597. 2021;11(24):11597. doi: 10.3390/APP112411597.