

RESSALVA

Atendendo a solicitação do(a) autor(a), o texto completo desse trabalho será disponibilizado no repositório a partir de 30/04/2028.



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

MARIA EDUARDA DA SILVA COSTA

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIFÚNGICA DA HEMOLINFA DE
Galleria mellonella PREVIAMENTE IMUNIZADA COM *Candida*
albicans INATIVADA**

MARIA EDUARDA DA SILVA COSTA

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIFÚNGICA DA HEMOLINFA DE
Galleria mellonella PREVIAMENTE IMUNIZADA COM *Candida*
albicans INATIVADA**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE(A), 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. Assist. 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).

Costa, Maria Eduarda da Silva

Avaliação da ação antifúngica da hemolinfa de *Galleria mellonella* previamente imunizada com *Candida albicans* inativada / Maria Eduarda da Silva Costa. - São José dos Campos : [s.n.], 2026.
68 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. *Candida albicans*. 2. *Galleria mellonella*. 3. Imunização larval. 4. Resistência. 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

Diante do crescente aumento de infecções por espécies de *Candida* no Brasil e no mundo, e sua alarmante resistência aos tratamentos convencionais disponíveis, o que aumenta a morbidade e mortalidade dos pacientes, torna-se essencial o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas. Nesse contexto, os achados deste estudo apontam para estratégias promissoras com potencial aplicação futura na prevenção e no tratamento da candidíase, alinhando-se aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável, especialmente no que se refere à promoção da saúde e ao enfrentamento de doenças infecciosas.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

Given the increasing number of *Candida* infections in Brazil and worldwide, and their alarming resistance to available conventional treatments, which increases patient morbidity and mortality, the development of new therapeutic approaches becomes essential. In this context, the findings of this study point to promising strategies with potential future application in the prevention and treatment of candidiasis, aligning with the Sustainable Development Goals, especially regarding health promotion and the fight against infectious diseases.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Assist. Máira Terra Garcia (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista - UNESP

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Titular Juliana Campos Junqueira

Universidade Estadual Paulista - UNESP

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Assist. Paulo Henrique Fonseca do Carmo

Universidade Estadual Paulista - UNESP

Instituto de Biociências de Botucatu

Campus de Botucatu

São José dos Campos, 30 de abril de 2026.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora **Maíra Terra Garcia**, por sua confiança e apoio ao longo desses dois anos, por pegar na minha mão e me ensinar a ir em frente mesmo com medo. Que com o seu “o não a gente já tem” me alçou aos mais inimagináveis voos. Maíra foi mais do que orientadora, foi amiga, foi uma mãe, como costumamos chamá-la carinhosamente. A pessoa que com todo o seu amor pela pesquisa e com toda a sua bagagem, sentou-se ao meu lado e me ensinou a fazer Ciência. Maíra enxerga muito além dos alunos que ela deve orientar, ela os conhece como pessoas e respeita suas individualidades, serei sempre grata por compreender meus tempos e limites, obrigada por essa orientação humana e sensível.

Ao professor **Paulo Henrique Fonseca do Carmo**, que esteve presente desde o início desta jornada, contribuindo para o desenvolvimento deste trabalho e para o meu crescimento quanto discente. É muito especial e valioso poder contar com sua presença e apoio até hoje.

À professora **Juliana Campos Junqueira** pela presença constante no dia a dia, sua calma, doçura e forma tão generosa de ensinar, fazem de você uma referência. Você é uma inspiração e com certeza é alguém que levo como exemplo de quem desejo me tornar no futuro.

Ao **programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas a Saúde Bucal (CASB)**, pelo apoio institucional, pela infraestrutura e pelo ambiente acadêmico que possibilitaram o desenvolvimento deste trabalho. À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pelo apoio financeiro concedido por meio da bolsa de mestrado (Código de Financiamento 001). À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pelo apoio financeiro ao projeto (Processo nº 2025/07609-8), que possibilitou a realização deste trabalho.

À **Mayara Cristina Moreira Silva**, a técnica do laboratório, por toda a dedicação, organização e cuidado com o nosso ambiente laboratorial. Sua ajuda, especialmente no manejo de *Galleria mellonella*, foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus colegas de laboratório, agradeço pela parceria diária, pelas trocas, pelo apoio e pelos momentos de descontração que tornaram essa jornada mais leve. Dividir essa caminhada com vocês fez toda a diferença. Agradeço especialmente à **Fabiana Alves de Souza Silva**, que com tanta criatividade me inspirou todos os dias a ser um pouquinho melhor e é a pessoa a quem chamo carinhosamente de “a tampa do meu Falcon”, à **Lara Luise Castro Pedroso**, que sempre foi tão atenciosa e paciente comigo desde o início e se fez tão presente todos os dias mesmo quando eu estava do outro lado do mundo, e à **Patrícia Michelle Nagai de Lima**, por suas valiosas orientações acadêmicas e pessoais ao longo do caminho.

À **Pró Reitoria de Pesquisa (PROPe)**, pela oportunidade da realização do sonho do intercâmbio acadêmico ainda no mestrado. A experiência acadêmica na Hubei University, em Wuhan - China, representou um importante enriquecimento para minha formação científica e pessoal (Apêndice A).

À **Hubei University** pela oportunidade de realizar parte desta trajetória em um ambiente acadêmico e cultural tão enriquecedor. Ao professor **Shihui Yang**, meu orientador durante esse período, e às professoras **Qiaoning He** e **Xia Wang**, pela orientação, disponibilidade e pelos ensinamentos compartilhados. Aos alunos que me acompanharam, especialmente ao **Ning Yang**, agradeço pela paciência, pelo auxílio e por tornarem essa experiência mais leve e acolhedora.

Aos amigos da Missão Hubei, entre tantas coincidências entre nossas histórias e momentos que pareciam nos preparar para nos levar uns aos outros, percebemos que tinha que ser nós ali, e, de fato, foi. Dividir essa vivência com vocês tornou tudo mais significativo. Levo comigo não só o aprendizado, mas também a certeza de que essa experiência não teria sido a mesma sem vocês. E como eu disse no nosso último jantar, “sinto que a vida toda eu procurei pela minha casa, e em vocês eu a encontrei, vocês são a minha casa”. Às pessoas que foram minha casa, deixo um agradecimento mais que especial:

- Ao **Davy Sapatini**, a alma da Missão Hubei, por tornar cada momento mais divertido com seu jeito único e humor contagiante. Obrigada por todas as risadas, pelas conversas e por ser meu fiel companheiro de compras e de shopping.
- Ao **Eduardo Pinto André**, pelas risadas e pela leveza que trouxe à

nossa convivência. Mesmo depois de um fim de semana inteiro juntos dizendo que precisava de uma semana de descanso de mim, bastava chegar a segunda-feira para surgir a clássica mensagem: “onde vamos almoçar hoje?”.

- À **Julia Marques Ribeiro**, por sempre dançar comigo, por rir comigo no ônibus enquanto todo mundo surtava porque estávamos perdidos, e por todos os espetinhos de “morango do amor chinês” divididos.
- Ao **Laerte Ganéo Neto**, meu “gêmeo”, por topar fazer nada comigo em casa e, ainda assim, transformar esses momentos em algo especial. Foi uma surpresa perceber o quanto somos parecidos e o quão fácil e natural foi o desabrochar da nossa amizade.
- À **Lara Yassuko Nakamura**, meu primeiro vínculo, minha colega de casa e a primeira pessoa com quem morei, por tudo o que construímos juntas. A relação de irmãs que nasceu dessa convivência tornou tudo mais acolhedor. Sou especialmente grata pelo cuidado e carinho diários. Nossa casa sempre foi um ponto de encontro, onde recebíamos nossos amigos, e onde terminávamos as noites fazendo skincare juntas. Que delícia foi cantar *You Belong With Me* (nossa música preferida) a plenos pulmões nos karaokês com você, memórias que levo comigo com muito carinho.
- À **Rebecca Vieira e Magalhães Rodrigues**, por sempre nos levar aos melhores lugares de Wuhan e por tornar cada descoberta ainda mais especial. Obrigada por ser também minha maior incentivadora nas noites de vôlei.
- À **Stella Daniels Kovacs**, pelas aventuras gastronômicas. Obrigada também por defender minhas escolhas de filmes duvidosas nas noites de cinema e por ser a melhor professora de mahjong.
- Ao **Vitor Sampaio Fernandes**, por sua forma tão positiva de ver as situações e ser a “cola” do grupo, sempre propondo momentos para estarmos todos juntos. Obrigada por entender minhas limitações ao utilizar um GPS e obrigada pelo melhor presente: uma toalha de banho de verdade. Obrigada por ser meu parceiro de bancada e por convencer nosso chefinho a me deixar dissecar um camundongo,

mesmo sabendo que você passaria mal ao presenciar a cena.

À **Nicole Fernanda dos Santos Lopes**, minha melhor amiga há 16 anos, por caminhar ao meu lado em todas as fases da minha vida. Crescer com você, compartilhar tantos momentos, e tantas versões de nós mesmas, e construir uma amizade tão sólida é um dos maiores presentes que tenho. Obrigada por estar sempre presente, por me apoiar, me ouvir e por ser, há tanto tempo, minha base e meu porto seguro.

À **Ana Carolina da Fonseca**, o maior presente que a faculdade me deu. Obrigada por sempre me aplaudir tão alto, por torcer por mim com tanto carinho e por estar ao meu lado em cada conquista.

À **Taylor Swift**, minha relação parassocial, que tantas vezes parece me conhecer profundamente em cada letra de suas músicas. Só eu sei o quão difícil foi escolher apenas uma para a minha epígrafe. No dia em que realizava o sonho de vê-la ao vivo pela primeira vez, também recebi a notícia da minha aprovação no mestrado, um momento que tornou tudo ainda mais especial. De muitas formas, sua música esteve comigo ao longo de todo esse caminho.

Aos meus pais, **Hélio Donizeti da Costa** e **Rosemeire da Silva Costa**, meu mais profundo agradecimento por serem meu alicerce em todos os momentos. Obrigada por acreditarem em mim mesmo quando eu duvidei, por todo o amor incondicional e por me darem forças para seguir em frente. Meu pai foi aquele que tantas vezes me pegou nos braços ao descer do ônibus aos prantos dizendo que não queria mais voltar, e minha mãe estava lá me dizendo que eu ia voltar sim e que eu ia conseguir passar por isso sim. Tudo o que sou e conquisto também é por vocês.

A **Deus**, meu mais sincero agradecimento, por ter se mostrado presente em todos os momentos ao longo dessa caminhada. Sua presença constante me deu força, direção e serenidade para seguir até aqui.

Ask me what I learned from all those years
Ask me what I earned from all those tears
Ask me why so many fade, but I'm still here
Taylor Swift, *Karma*

RESUMO

Costa M E S. Avaliação da ação antifúngica da hemolinfa de *Galleria mellonella* previamente imunizada com *Candida albicans* inativada [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2026.

As infecções fúngicas têm emergido como um problema de saúde global nas últimas décadas. Espécies do gênero *Candida* são frequentemente encontradas nessas diferentes infecções, devido a isso, no ano de 2022 a OMS incluiu a espécie *Candida albicans* em sua lista de agentes patogênicos fúngicos com prioridade crítica. A resistência antifúngica desse gênero é preocupante, o que torna urgente a criação de novas alternativas. Diante disso, o objetivo desse estudo foi investigar a ação antifúngica da hemolinfa das larvas de *Galleria mellonella* antes e após a imunização por *C. albicans*. Para isso, o trabalho foi realizado em três etapas: 1) Padronização do agente antimelanizante capaz de inibir a cascata de melanização da hemolinfa das larvas de *G. mellonella*; 2) Padronização das concentrações de *C. albicans* e seleção da imunização capaz de induzir resposta imune sem comprometer a sobrevivência do hospedeiro e 3) Imunização em diferentes tempos para realização dos testes em cultura planctônica, biofilme e filamentação. Como resultado, obtivemos que a hemolinfa de larvas imunizadas por 24 h foi capaz de reduzir o número de células viáveis em cultura planctônica após 60 minutos de contato, em contraste as imunizações de 48 h e 72 h não apresentaram redução quando comparadas aos seus respectivos controles. Os biofilmes originados das padronizações de 10^4 , 10^5 e 10^6 cél/mL de *C. albicans* apresentaram reduções de 1,8; 2,5 e 3,2 $\log_{10}$, respectivamente, ao serem expostos à hemolinfa imunizada por 24 h. Os biofilmes tratados com a hemolinfa imunizada por 48 h e 72 h apresentaram inibições de 0,3; 0,2 e 0,3 $\log_{10}$ e de 3,1; 1,1 e 0,8 $\log_{10}$, respectivamente. No teste de filamentação, as células fúngicas expostas à hemolinfa imunizada, em todos os tempos avaliados, apresentaram menor formação de hifas, sugerindo que esse tratamento exerce efeito modulador no dimorfismo do fungo. Diante do exposto, conclui-se que a hemolinfa de *G. mellonella*, previamente imunizada com *C. albicans*, apresenta atividade antifúngica e efeito modulador frente a seu dimorfismo, gerando a necessidade de estudos adicionais para elucidar os mecanismos envolvidos nessa resposta.

Palavras-chave: *Candida albicans*; *Galleria mellonella*; Imunização larval; Resistência.

ABSTRACT

Costa M E S. *Evaluation of the antifungal activity of Galleria mellonella hemolymph previously immunized with inactive Candida albicans [dissertation].* São José dos Campos (SP): São Paulo State University (UNESP), Institute of Science and Technology; 2026.

Fungal infections have emerged as a global health problem in recent decades. Species of the genus *Candida* are frequently found in these different infections; therefore, in 2022, the WHO included *Candida albicans* in its list of critically important fungal pathogens. Antifungal resistance in this genus is a concern, making the development of new alternatives urgent. Therefore, the objective of this study was to investigate the antifungal action of the hemolymph of *Galleria mellonella* larvae before and after immunization with *C. albicans*. To this end, the work was carried out in three stages: 1) Standardization of the anti-melanizing agent capable of inhibiting the melanization cascade of the hemolymph of *G. mellonella* larvae; 2) Standardization of *C. albicans* concentrations and selection of the immunization capable of inducing an immune response without compromising host survival; and 3) Immunization at different times to perform tests in planktonic culture, biofilm, and filamentation. As a result, we found that hemolymph from larvae immunized for 24 h was able to reduce the number of viable cells in planktonic culture after 60 minutes of contact. In contrast, immunizations of 48 h and 72 h did not show a reduction when compared to their respective controls. Biofilms originating from standardizations of 10^4 , 10^5 , and 10^6 cells/mL of *C. albicans* showed reductions of 1.8, 2.5, and 3.2 log₁₀, respectively, when exposed to hemolymph immunized for 24 h. Biofilms treated with hemolymph immunized for 48 h and 72 h showed inhibitions of 0.3, 0.2, and 0.3 log₁₀ and of 3.1, 1.1, and 0.8 log₁₀, respectively. In the filamentation test, fungal cells exposed to immunized hemolymph showed less hyphal formation at all evaluated times, suggesting that this treatment has a modulating effect on fungal dimorphism. Therefore, it is concluded that the hemolymph of *G. mellonella*, previously immunized with *C. albicans*, exhibits antifungal activity and a modulating effect on its dimorphism, generating the need for further studies to elucidate the mechanisms involved in this response.

Keywords: *Candida albicans*; *Galleria mellonella*; Larval immunization; Resistance.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 Gênero <i>Candida</i>	19
2.1.1 Morfologia e fatores de virulência	20
2.1.2 Infecção e tratamento	22
2.2 Invertebrados.....	23
2.2.1 <i>Galleria mellonella</i>	24
2.2.2 Sistema imune larval.....	25
3 PROPOSIÇÃO	28
3.1 Objetivo geral.....	28
3.2 Objetivos específicos.....	28
4 MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 Larvas de <i>G. mellonella</i>	29
4.2 Teste de diferentes inibidores de melanização para preservação da hemolinfa de <i>G. mellonella</i>	30
4.3 Microrganismo.....	32
4.4 Imunização das larvas de <i>G. mellonella</i> com <i>C. albicans</i>	32
4.4.1 Grupos experimentais.....	32
4.4.2 Inoculação larval	32
4.4.3 Coleta e processamento da hemolinfa livre de células.....	33
4.5 Testes de atividade antifúngica	34
4.5.1 Grupos experimentais.....	34
4.5.2 Efeito antifúngico da hemolinfa de <i>G. mellonella</i> pré-imunizada sobre cultura planctônica de <i>C. albicans</i>	34
4.5.3 Efeito antifúngico da hemolinfa de <i>G. mellonella</i> pré-imunizada contra biofilme de <i>C. albicans</i>	35
4.5.4 Influência da hemolinfa de <i>G. mellonella</i> pré-imunizada na filamentação de <i>C. albicans</i>	35
4.6 Análise estatística	36
5 RESULTADO	37
5.1 Efeitos dos inibidores de melanização na hemolinfa.....	37

5.2	Imunização larval.....	38
5.3	Ação antifúngica da hemolinfa de <i>G. mellonella</i> imunizada em cultura planctônica de <i>C. albicans</i>	39
5.4	Ação da hemolinfa de <i>G. mellonella</i> imunizada em biofilme	41
5.5	Análise da filamentação de <i>C. albicans</i>	44
6	DISCUSSÃO	46
7	CONCLUSÃO	51
	REFERÊNCIAS.....	52
	APÊNDICE	63

1 INTRODUÇÃO

Infecções fúngicas têm emergido como um problema de saúde global nas últimas décadas, estimativas sugerem uma incidência anual de 6,5 milhões de infecções fúngicas invasivas e 3,8 milhões de mortes (Cornely et al., 2025; Denning, 2024). No Brasil, a taxa de incidência de infecções fúngicas é de 2,49 casos por 1.000 internações (Groisman Sieben et al., 2024). Para além disso, investigações epidemiológicas mostram que taxas de mortalidade ultrapassam 70% entre os pacientes internados em unidades de terapia intensiva. Contudo, este número pode ser muito maior, uma vez que doenças fúngicas não integram, na maioria dos estados, a lista de doenças de notificação compulsória (Agnelli et al., 2023).

Dentre os fungos oportunistas, o gênero *Candida* é destaque, pois frequentemente é associado a infecções superficiais de mucosa ou candidíase invasiva (Baltazar et al., 2015; Ben-Ami, Kontoyiannis, 2021; Bilal et al., 2022; Cortés et al., 2020). Esse gênero apresenta diversas espécies que podem ser encontradas na microbiota humana como comensais: *Candida albicans*, *Candida glabrata* (*Nakaseomyces glabrata*), *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* e *Candida krusei* (*Pichia kudriavzevii*) (Farooq et al., 2022; Pereira et al., 2020). Em situações de desequilíbrio do ambiente ou do hospedeiro, esses fungos podem manifestar um caráter oportunista que leva a um potencial comportamento patogênico. Um estudo global com aproximadamente 256.882 isolados de *Candida* spp. coletados em 142 locais em 41 países mostrou que cerca de 90% de todos os casos de candidemia foram causados por *C. albicans* (65,3%), *N. glabrata* (11,3%), *C. tropicalis* (7,2%), *C. parapsilosis* (6%) e *P. kudriavzevii* (2,4%) (Silva et al., 2019).

Nos últimos anos, esse cenário tornou-se ainda mais preocupante, pois as infecções fúngicas foram agravadas pela pandemia de COVID-19, uma vez que o amplo uso de antibióticos, corticosteroides, cateteres venosos e diálise, juntamente com os danos causados pelo SARS CoV-2, favoreceram infecções bacterianas e fúngicas. Pacientes que apresentam formas graves de COVID-19 correm maior risco de desenvolver candidemia (Arastehfar et al., 2020; Rzymiski et al., 2024). Devido a alarmante incidência de infecção, no ano de 2022 a OMS (Organização Mundial da

Saúde) publica sua primeira lista global de patógenos fúngicos prioritários, com o objetivo de direcionar os esforços de pesquisa aos fungos que apresentem maior ameaça à saúde pública.

A lista incluiu a espécie *C. albicans* em seu índice de agentes patogênicos fúngicos com prioridade crítica, ao lado de *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus* e *Candida auris* (*Candidozyma auris*). Essa classificação reflete não apenas a elevada prevalência da espécie, mas também sua plasticidade fenotípica, sustentada por diferentes mecanismos de virulência. Entre eles, destacam-se a habilidade de aderir a tecidos e superfícies e a capacidade de alternar entre as formas morfológicas de levedura unicelular e hifa verdadeira. Ambas são essenciais para a virulência total da espécie: enquanto a forma leveduriforme está mais associada à disseminação sistêmica, as hifas estão relacionadas à invasão tecidual (Agnelli et al., 2023; D'enfert et al., 2021; Staniszewska, 2019).

Além dos fatores previamente mencionados, a capacidade de formar biofilmes também é um fator de virulência importante (D'enfert et al., 2021). O desenvolvimento dos biofilmes de *C. albicans* pode ser dividido em quatro etapas fundamentais: I) adsorção e adesão de leveduras a uma superfície adequada, II) divisão celular, III) maturação da estrutura com a produção de matriz extracelular, e IV) dispersão de células do biofilme (Ponde et al., 2021). Essa última etapa representa um desafio clínico relevante, pois as células dispersas apresentam características distintas das células planctônicas, como maior capacidade de filamentação e formação de novos biofilmes, maior adesão a substratos bióticos e abióticos, além de menor suscetibilidade aos antifúngicos. Tais atributos sugerem que as células dispersas do biofilme encontram-se “pré-condicionadas” para expressar máxima virulência, dificultando a reversão do quadro infeccioso (Ponde et al., 2021).

Do ponto de vista nutricional, *C. albicans* apresenta preferência pelo uso de carbono como fonte primária de energia. No entanto, diante da limitação desse recurso, o fungo demonstra elevada flexibilidade metabólica, sendo capaz de explorar outras fontes, como nitrogênio, fosfato e micronutrientes, como ferro e zinco (D'enfert et al., 2021). Essa plasticidade contribui para sua sobrevivência em diferentes nichos do hospedeiro. Além disso, a parede celular desempenha papel essencial na manutenção da estabilidade osmótica e na proteção contra estresses

ambientais, funcionando como uma estrutura dinâmica e adaptável (D'enfert et al., 2021). Já a membrana plasmática contém ergosterol, indispensável para a manutenção de sua integridade, enquanto a parede celular é composta principalmente por polissacarídeos, como a glucano. Essas estruturas, além de fundamentais para a sobrevivência do fungo, diferenciam-se das células humanas e, por isso, constituem os principais alvos das classes de antifúngicos disponíveis, como azóis, equinocandinas e polienos. Contudo, a crescente resistência a esses fármacos evidencia a necessidade urgente de identificar novos alvos terapêuticos e desenvolver alternativas inovadoras para o tratamento das infecções fúngicas, sobretudo diante da ausência de vacinas licenciadas ou em fase de ensaio clínico para o tratamento de doenças fúngicas (Denning, 2024; Ivanov et al., 2022; Liang et al., 2016; Quiles-Melero, García-Rodríguez, 2021).

Para o desenvolvimento de novos antifúngicos, os testes iniciais são realizados *in vitro* e, posteriormente, em modelos *in vivo*. Estima-se que aproximadamente 20 milhões de animais sejam utilizados anualmente em pesquisas biomédicas, sendo camundongos e ratos os principais modelos empregados (Robinson et al., 2019). Estes animais, porém, estão assegurados por inúmeras restrições éticas, além de apresentarem alto custo de manutenção, o que demanda tempo e recursos consideráveis para a pesquisa (Vanhoffelen et al., 2023). Diante dessas limitações, nos últimos anos, insetos têm ganhado destaque como modelos alternativos de hospedeiro, uma vez que não estão contemplados em regulamentações éticas tão rigorosas quanto os vertebrados. Ademais, o sistema imunológico inato presente tanto em mamíferos quanto em insetos, reconhece invasores externos e aciona vias de resposta imune semelhantes, reforçando a aplicabilidade desses modelos (Ahlawat, Sharma, 2023).

Diante do cenário de expansão do uso de insetos como modelo de infecção, as larvas de *Galleria mellonella* têm se destacado, visto que possuem um sistema imunológico inato funcionalmente semelhante ao dos mamíferos, composto por três componentes principais: (I) barreiras físicas, (II) resposta celular e (III) resposta humoral. A primeira linha de defesa é representada pela cutícula, formada por quitina e proteínas com propriedades antimicrobianas, que atua como uma barreira física contra a entrada de patógenos (Durieux et al., 2021).

Além dessa proteção externa, as larvas apresentam um sistema circulatório

aberto composto pela hemolinfa, fluido análogo ao sangue dos mamíferos, responsável pelo transporte de nutrientes e células imunológicas (Piatek et al., 2020). É nesse compartimento que se desenvolve a resposta celular, mediada principalmente por hemócitos, que desempenham funções equivalentes à dos neutrófilos em vertebrados. Esses hemócitos circulam livremente pela hemolinfa ou aderem a órgãos e participam ativamente dos principais mecanismos de defesa inata: fagocitose, nodulação e encapsulamento (Bugyna et al., 2023; Serrano et al., 2023).

A ativação desses mecanismos de defesa depende da capacidade de reconhecimento do patógeno. Os hemócitos de *G. mellonella* expressam em sua superfície os chamados Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRRs – *Pattern Recognition Receptors*), que detectam Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs), como lipopolissacarídeos, peptidoglicanos e β -glucanos. Esse reconhecimento inicial é essencial para a ativação de respostas específicas contra diferentes microrganismos (Curtis et al., 2022; Giammarino et al., 2024).

Os hemócitos são classificados em subtipos com funções imunológicas distintas. Os pró-hemócitos atuam como células progenitoras, garantindo a renovação da população celular. Os plasmatócitos são os mais abundantes, desempenham papel central na fagocitose e na produção de fatores antimicrobianos. Os granulócitos, caracterizados pela presença de grânulos citoplasmáticos, participam tanto na fagocitose quanto no encapsulamento de patógenos. Os coagulócitos contribuem para a coagulação da hemolinfa, uma resposta imediata contra injúrias e infecções. Já os esferócitos estão envolvidos no transporte de componentes da cutícula, enquanto os oenócitos produzem precursores da enzima fenoloxidase, essencial no processo de melanização (Giammarino et al., 2024; Ménard et al., 2021; Trevijano-Contador, Zaragoza, 2019).

Complementando a resposta celular, a imunidade humoral de *G. mellonella* envolve a liberação de moléculas solúveis com ação antimicrobiana, como peptídeos antimicrobianos (AMPs), opsoninas, enzimas da cascata da melanização e proteínas derivadas de vias proteolíticas (Pereira et al., 2020). Os AMPs desempenham papel central devido à diversidade de seus mecanismos de ação, que incluem a desorganização de membranas e a inibição da síntese de DNA e proteínas (Cristine Pereira et al., 2018). As opsoninas, por sua vez, favorecem o reconhecimento e a

fagocitose de microrganismos ao se ligarem a componentes estruturais, como os β -glucanos. Assim como os PRRs em mamíferos, essas moléculas participam ativamente do reconhecimento e eliminação de fungos (Pereira et al., 2020).

Esse arsenal imunológico torna-se particularmente relevante em infecções por *C. albicans*. Estudos demonstram que o reconhecimento desse fungo por hemócitos de *G. mellonella* ocorre por meio de múltiplos receptores, entre eles o GmCD8, que atua como opsonina e facilita a fagocitose das células fúngicas. Os principais epítomos identificados estão na parede celular de *C. albicans*, com destaque para os β -glucanos, que também induzem a expressão de genes codificadores de AMPs (Trevijano-Contador, Zaragoza, 2019).

Em infecções experimentais, *C. albicans* é capaz de causar mortalidade em larvas de *G. mellonella*, evidenciando a importância da atuação coordenada entre as respostas celular e humoral para o controle da infecção. Diversos fatores, como o estresse térmico (incubação a 4 °C ou 37 °C), a pré-exposição a doses subletais do patógeno ou outras formas de estimulação, podem aumentar a concentração de hemócitos e induzir a expressão de genes imunológicos, conferindo maior resistência às larvas (Trevijano-Contador, Zaragoza, 2019). Outro ponto de destaque é que a possibilidade de injetar doses definidas e reprodutíveis de microrganismos torna o modelo altamente controlável e confiável para estudos de infecção (Tsai et al., 2016).

Embora as larvas não possuam linfócitos T, anticorpos ou moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), elas podem responder de maneira mais eficaz a uma segunda infecção, por meio de um fenômeno denominado *priming* imunológico. O *priming* resulta em respostas mais intensas em desafios subsequentes, mesmo na ausência de memória adaptativa (Wojda et al., 2020). Em um estudo de Vertyporokh et al. (2019), larvas pré-expostas a uma dose subletal de *C. albicans* apresentaram 80% de sobrevivência após uma reinfecção letal, enquanto apenas 50% das larvas não estimuladas sobreviveram. Esse aumento de resistência foi associado a alterações no padrão proteico da hemolinfa, incluindo a presença de novos polipeptídeos imunologicamente ativos, o que reforça o potencial desse fluido como fonte de moléculas antimicrobianas de interesse.

Diante desse cenário, há um crescente interesse na investigação da resposta imune de *G. mellonella* e na identificação de moléculas bioativas presentes

em sua hemolinfa. O estudo de seus mecanismos imunológicos, especialmente após imunização com patógenos como *C. albicans*, pode revelar compostos com potencial antifúngico promissor. Assim, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a atividade antifúngica da hemolinfa de *G. mellonella* imunizada com *C. albicans*. Espera-se com isso contribuir para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas frente às infecções fúngicas, problema de saúde pública em constante ascensão e ainda subestimado.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, conclui-se:

- a) A combinação de IPS e PTU foi a mais eficaz na inibição da melanização da hemolinfa após a extração, preservando suas características físico-químicas e viabilizando sua utilização nos ensaios *in vitro*.
- b) O tempo de imunização está diretamente relacionado ao pico da resposta imunológica e à atividade antimicrobiana, sendo mais evidente em 24 horas.
- c) A hemolinfa imunizada apresentou efeito antifúngico mais discreto em cultura planctônica e mais expressivo em biofilme, sugerindo que sua ação está associada ao tempo de exposição e à complexidade do modelo biológico.

Dessa forma, dentro das limitações do estudo, os resultados indicam que a hemolinfa de *G. mellonella* imunizada constitui uma fonte promissora para o isolamento futuro de moléculas com potencial antimicrobiano.

REFERÊNCIAS

- Abdulghani M, Zore G. Optimization of in vitro Biofilm Growth of *Candida albicans*. *Indian J Microbiol*. 2025;65(2):1361–5. doi: 10.1007/S12088-024-01220-X.
- Adamo S. The Integrated Defense System: Optimizing Defense against Predators, Pathogens, and Poisons. *Integr Comp Biol*. 2022;62(6):1536–46. doi: 10.1093/ICB/ICAC024.
- Admella J, Torrents E. A Straightforward Method for the Isolation and Cultivation of *Galleria mellonella* Hemocytes. *Int J Mol Sci*. 2022;23(21). doi: 10.3390/IJMS232113483.
- Agnelli C, Guimarães T, Sukiennik T, Lima PRP, Salles MJ, Breda GL, et al. Prognostic Trends and Current Challenges in Candidemia: A Comparative Analysis of Two Multicenter Cohorts within the Past Decade. *Journal of Fungi*. 2023;9(4). doi: 10.3390/jof9040468.
- Ahlawat S, Krishna , Sharma K. Lepidopteran insects: emerging model organisms to study infection by enteropathogens. *Folia Microbiol (Praha)*. n.d.;1:3. doi: 10.1007/s12223-022-01014-y.
- Arastehfar A, Carvalho A, Hong Nguyen M, Hedayati MT, Netea MG, Perlin DS, et al. COVID-19-Associated Candidiasis (CAC): An Underestimated Complication in the Absence of Immunological Predispositions? *Journal of Fungi*. 2020;6(4):1–13. doi: 10.3390/JOF6040211.
- Arck PC. When 3 Rs meet a forth R: Replacement, reduction and refinement of animals in research on reproduction. *J Reprod Immunol*. 2019;132:54–9. doi: 10.1016/J.JRI.2019.03.004.
- Baltazar LM, Ray A, Santos DA, Cisalpino PS, Friedman AJ, Nosanchuk JD. Antimicrobial photodynamic therapy: An effective alternative approach to control fungal infections. *Front Microbiol*. 2015;6(MAR):136201. doi: 10.3389/FMICB.2015.00202/TEXT.
- Baur M, Schulz NKE, Greune L, Länger ZM, Eirich J, Finkemeier I, et al. Immune priming in the insect gut: a dynamic response revealed by ultrastructural and transcriptomic changes. *BMC Biology* 2025 23:1. 2025;23(1):227-. doi: 10.1186/S12915-025-02334-4.
- Bilal H, Shafiq M, Hou B, Islam R, Khan MN, Khan RU, et al. Distribution and antifungal susceptibility pattern of *Candida* species from mainland China: A systematic analysis. *Virulence*. 2022;13(1):1573. doi: 10.1080/21505594.2022.2123325.
- Brown GD, Ballou ER, Bates S, Bignell EM, Borman AM, Brand AC, et al. The

pathobiology of human fungal infections. *Nat Rev Microbiol*. 2024;22(11). doi: 10.1038/S41579-024-01062-W.

Bu Q-R;, Bao M-Y;, Yang Y ;, Wang T-M;, Wang C.-Z, Vinson J, et al. Citation: Targeting Virulence Factors of *Candida albicans* with Natural Products 2022; doi: 10.3390/foods11192951.

Bugyna L, Kendra S, Bujdáková H. *Galleria mellonella*—A Model for the Study of aPDT—Prospects and Drawbacks. *Microorganisms*. 2023;11(6). doi: 10.3390/MICROORGANISMS11061455.

Camilotti E, Furian TQ, Borges KA, Ortiz Granados OF, Zottis Chitolina G, de Brites Weber T, et al. *Galleria mellonella* larvae as an alternative model to determine the pathogenicity of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Avian Pathology*. 2024;53(6):507–19. doi: 10.1080/03079457.2024.2365932.

Campbell JS, Pearce JC, Bebes A, Pradhan A, Yuecel R, Brown AJP, et al. Characterising phagocytes and measuring phagocytosis from live *Galleria mellonella* larvae. *Virulence*. 2024;15(1). doi: 10.1080/21505594.2024.2313413.

Carmo PHF, de Lima PMN, Silva FA, Ribeiro JL, Junqueira JC, Garcia MT. Impact of egg incubation on hemocyte recruitment and susceptibility of *Galleria mellonella* larvae to pathogens. *Front Microbiol*. 2025;16. doi: 10.3389/FMICB.2025.1611104.

Chaves AFA, Xander P, Romera LMD, Fonseca FLA, Batista WL. What is the elephant in the room when considering new therapies for fungal diseases? *Crit Rev Microbiol*. 2021;47(3):275–89. doi: 10.1080/1040841X.2021.1876632.

Chen H, Zhou X, Ren B, Cheng L. The regulation of hyphae growth in *Candida albicans*. *Virulence*. 2020;11(1):337–48. doi: 10.1080/21505594.2020.1748930.

Clinical and Laboratory Standards Institute. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts*. 4th ed. Wayne (PA): Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017. (CLSI standard M27).

Cornely OA, Sprute R, Bassetti M, Chen SCA, Groll AH, Kurzai O, et al. Global guideline for the diagnosis and management of candidiasis: an initiative of the ECMM in cooperation with ISHAM and ASM. *Lancet Infect Dis*. 2025;25(5):e280–93. doi: 10.1016/S1473-3099(24)00749-7.

Cortés JA, Ruiz JF, Melgarejo-Moreno LN, Lemos E V. Candidemia in Colombia. *Biomedica*. 2020;40(1):195–207. doi: 10.7705/BIOMEDICA.4400.

Cristine Pereira T, Pimentel de Barros P, Ruano de Oliveira Fugisaki L, Dennis Rossoni R, de Camargo Ribeiro F, Teles de Menezes R, et al. Recent Advances in the Use of *Galleria mellonella* Model to Study Immune Responses against Human Pathogens n.d.; doi: 10.3390/jof4040128.

Curtis A, Binder U, Kavanagh K. *Galleria mellonella* Larvae as a Model for Investigating Fungal—Host Interactions. *Frontiers in Fungal Biology*. 2022;3:893494. doi: 10.3389/FFUNB.2022.893494.

Cutuli MA, 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. doi: 10.1080/21505594.2019.1621649.

Dekkerová-Chupáčová J, Borghi E, Morace G, Bujdáková H. Up-Regulation of Antimicrobial Peptides Gallerimycin and Galiomicin in *Galleria mellonella* Infected with *Candida* Yeasts Displaying Different Virulence Traits. *Mycopathologia* 2018 183:6. 2018;183(6):935–40. doi: 10.1007/S11046-018-0300-7.

Demir D, Genç 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.

D'Enfert C, Kaune AK, Alaban LR, Chakraborty S, Cole N, Delavy M, et al. The impact of the Fungus-Host-Microbiota interplay upon *Candida albicans* infections: current knowledge and new perspectives. *FEMS Microbiol Rev*. 2021;45(3). doi: 10.1093/FEMSRE/FUAA060.

Denning DW. Global incidence and mortality of severe fungal disease. *Lancet Infect Dis*. 2024;24(7):e428–38. doi: 10.1016/S1473-3099(23)00692-8.

Durieux MF, Melloul É, Jemel S, Roisin L, Dardé ML, Guillot J, et al. *Galleria mellonella* as a screening tool to study virulence factors of *Aspergillus fumigatus*. *Virulence*. 2021;12(1):818. doi: 10.1080/21505594.2021.1893945.

do Nascimento Dias J, de Souza Silva C, de Araújo AR, Souza JMT, de Holanda Veloso Júnior PH, Cabral WF, et al. Mechanisms of action of antimicrobial peptides ToAP2 and NDBP-5.7 against *Candida albicans* planktonic and biofilm cells. *Scientific Reports* 2020 10:1. 2020;10(1):10327-. doi: 10.1038/s41598-020-67041-2.

El-Baz AM, Mosbah RA, Goda RM, Mansour B, Sultana T, Dahms TES, et al. Back to Nature: Combating *Candida albicans* Biofilm, Phospholipase and Hemolysin Using Plant Essential Oils. *Antibiotics (Basel)*. 2021;10(1):1–18. doi: 10.3390/ANTIBIOTICS10010081.

Eleftherianos I, Heryanto C, Bassal T, Zhang W, Tettamanti G, Mohamed A. Haemocyte-mediated immunity in insects: Cells, processes and associated components in the fight against pathogens and parasites. *Immunology*. 2021;164(3):401–32. doi: 10.1111/IMM.13390.

Farooq H, Monowar T, Latt S, Chinni S, Zainol N, Sabesan G. A Review of Studies on *Candida* Species in Peninsular Malaysia. *Adv Biomed Res*.

2022;11(1):98. doi: 10.4103/ABR.ABR_3_22.

Fernandes MAA, Aguiar FLL de, Coutinho MGS, Brito EHS de, Coelho CGV, Fontenelle RO dos S. Changes in nomenclature, virulence factors, and antifungal resistance of the genus *Candida*. *Frontiers in Fungal Biology*. 2025;6:1677892. doi: 10.3389/FFUNB.2025.1677892/BIBTEX.

Figueiredo-Godoi LMA, Menezes RT, Carvalho JS, Garcia MT, Segundo AG, Jorge AOC, et al. Exploring the *Galleria mellonella* model to study antifungal photodynamic therapy. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2019;27:66–73. doi: 10.1016/J.PDPDT.2019.05.010.

Gaffar NR, Valand N, Girija UV, Gaffar NR, Valand N, Girija UV. Candidiasis: Insights into Virulence Factors, Complement Evasion and Antifungal Drug Resistance. *Microorganisms* 2025, Vol 13,. 2025;13(2). doi: 10.3390/MICROORGANISMS13020272.

Genç TT, Kaya S, Günay M, Çakaloğlu Ç. Humoral immune response of *Galleria mellonella* after mono- and co-injection with *Hypericum perforatum* extract and *Candida albicans*. *APMIS*. 2024;132(5):358–70. doi: 10.1111/APM.13383.

Giammarino A, Bellucci N, Angiolella L. *Galleria mellonella* as a Model for the Study of Fungal Pathogens: Advantages and Disadvantages. *Pathogens*. 2024;13(3). doi: 10.3390/PATHOGENS13030233.

Gonzalez-Jimenez I, Perlin DS, Shor E. Reactive oxidant species induced by antifungal drugs: identity, origins, functions, and connection to stress-induced cell death. *Front Cell Infect Microbiol*. 2023;13:1276406. doi: 10.3389/FCIMB.2023.1276406/BIBTEX.

Gonzalez-Lara MF, Ostrosky-Zeichner L. Invasive Candidiasis. *Semin Respir Crit Care Med*. 2020;41(1):3–12. doi: 10.1055/S-0040-1701215.

Groisman Sieben R, Paternina-de la Ossa R, Waack A, Casale Aragon D, Bellissimo-Rodrigues F, Israel do Prado S, et al. Risk factors and mortality of candidemia in a children's public hospital in Sao Paulo, Brazil. *Rev Argent Microbiol*. 2024; doi: 10.1016/J.RAM.2023.09.002.

Guevara-Lora I, Bras G, Juszczak M, Karkowska-Kuleta J, Gorecki A, Manrique-Moreno M, et al. Cecropin D-derived synthetic peptides in the fight against *Candida albicans* cell filamentation and biofilm formation. *Front Microbiol*. 2023;13:1045984. doi: 10.3389/fmicb.2022.1045984.

Güner P, Aşkun T, Er A. *International Journal of Nature and Life Sciences* Evaluation of Anti-bacterial Activity Induced by *Penicillium mallochii* in the Hemolymph of *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) 2023; doi: 10.47947/ijnls.1362362.

Hans S, Fatima Z, Ahmad A, Hameed S. Magnesium impairs *Candida albicans* immune evasion by reduced hyphal damage, enhanced β -glucan exposure and altered vacuole homeostasis. *PLoS One*. 2022;17(7). doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0270676.

Huang XW, Xu MN, Zheng HX, Wang ML, Li L, Zeng K, et al. Pre-exposure to *Candida glabrata* protects *Galleria mellonella* against subsequent lethal fungal infections. *Virulence*. 2020;11(1):1674–84. doi: 10.1080/21505594.2020.1848107.

Husain A, Meenakshi DU, Ahmad A, Shrivastava N, Khan SA. A Review on Alternative Methods to Experimental Animals in Biological Testing: Recent Advancement and Current Strategies. *J Pharm Bioallied Sci*. 2023;15(4):165. doi: 10.4103/JPBS.JPBS_380_23.

Ibe C, Munro CA, Ibe C, Munro CA. Fungal Cell Wall Proteins and Signaling Pathways Form a Cytoprotective Network to Combat Stresses. *Journal of Fungi* 2021, Vol 7,. 2021;7(9). doi: 10.3390/JOF7090739.

Iliev ID, Brown GD, Bacher P, Gaffen SL, Heitman J, Klein BS, et al. Focus on fungi. *Cell*. 2024;187(19):5121–7. doi: 10.1016/J.CELL.2024.08.016.

Ivanov M, Ćirić A, Stojković D. Emerging Antifungal Targets and Strategies. *International Journal of Molecular Sciences* 2022, Vol 23,. 2022;23(5). doi: 10.3390/IJMS23052756.

Katsipoulaki M, Stappers MHT, Malavia-Jones D, Brunke S, Hube B, Gow NAR. *Candida albicans* and *Candida glabrata*: global priority pathogens. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2024;88(2). doi: 10.1128/MMBR.00021-23.

Khan F, Bamunuarachchi NI, Tabassum N, Jo DM, Khan MM, Kim YM. Suppression of hyphal formation and virulence of *Candida albicans* by natural and synthetic compounds. *Biofouling*. 2021;37(6):626–55. doi: 10.1080/08927014.2021.1948538.

König A, Hube B, Kasper L. The Dual Function of the Fungal Toxin Candidalysin during *Candida albicans*-Macrophage Interaction and Virulence. *Toxins (Basel)*. 2020;12(8). doi: 10.3390/TOXINS12080469.

Kordaczuk J, Sulek M, Mak P, Śmiątek-Bartyzel J, Hułas-Stasiak M, Wojda I. Defence response of *Galleria mellonella* larvae to oral and intrahemocelic infection with *Pseudomonas entomophila*. *Dev Comp Immunol*. 2023;147(2):104749. doi: 10.1016/j.dci.2023.104749.

Kumar D, Kumar A. Molecular Determinants Involved in *Candida albicans* Biofilm Formation and Regulation. *Mol Biotechnol*. 2024;66(7):1640–59. doi: 10.1007/S12033-023-00796-X.

La Corte C, Baranzini N, Grimaldi A, Parisi MG. Invertebrate Models in Innate

Immunity and Tissue Remodeling Research. *Int J Mol Sci.* 2022;23(12). doi: 10.3390/IJMS23126843.

Lanz-Mendoza H, Gálvez D, Contreras-Gardunõ J. The plasticity of immune memory in invertebrates. *Journal of Experimental Biology.* 2024;227(Suppl_1). doi: 10.1242/JEB.246158/344035.

Lee Y, Puumala E, Robbins N, Cowen LE. Antifungal Drug Resistance: Molecular Mechanisms in *Candida albicans* and Beyond. *Chem Rev.* 2021;121(6):3390–411. doi: 10.1021/ACS.CHEMREV.0C00199.

Liang Y, Lu LM, Chen Y, Lin YK. Photodynamic therapy as an antifungal treatment (Review). *Exp Ther Med.* 2016;12(1):23–7. doi: 10.3892/ETM.2016.3336/HTML.

Lin L, Wang M, Zeng J, Mao Y, Qin R, Deng J, et al. Sequence Variation of *Candida albicans* Sap2 Enhances Fungal Pathogenicity via Complement Evasion and Macrophage M2-Like Phenotype Induction. *Adv Sci (Weinh).* 2023;10(20). doi: 10.1002/ADVS.202206713.

Lindemann-Perez E, Perez JC. *Candida albicans* natural diversity: a resource to dissect fungal commensalism and pathogenesis. *Curr Opin Microbiol.* 2024;80. doi: 10.1016/J.MIB.2024.102493.

Lohse MB, Gulati M, Johnson AD, Nobile CJ. Development and regulation of single- and multi-species *Candida albicans* biofilms. *Nature Reviews Microbiology* 2017 16:1. 2017;16(1):19–31. doi: 10.1038/nrmicro.2017.107.

Lopes JP, Lionakis MS. Pathogenesis and virulence of *Candida albicans*. *Virulence.* 2022;13(1):89–121. doi: 10.1080/21505594.2021.2019950.

Macias-Paz IU, Pérez-Hernández S, Tavera-Tapia A, Luna-Arias JP, Guerra-Cárdenas JE, Reyna-Beltrán E. *Candida albicans* the main opportunistic pathogenic fungus in humans. *Rev Argent Microbiol.* 2023;55(2):189–98. doi: 10.1016/J.RAM.2022.08.003.

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;34(10):1129–36. doi: 10.1016/j.dci.2010.06.005.

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

Martinez M, Garsin DA, Lorenz MC. Vertebrate and invertebrate animal infection models of *Candida auris* pathogenicity. *Curr Opin Microbiol.* 2024;80. doi: 10.1016/J.MIB.2024.102506.

Masuda T. Update on the source of phenoloxidase activity in the hemolymph of

kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*. *Fisheries Science* 2021 87:6. 2021;87(6):861–9. doi: 10.1007/S12562-021-01558-X.

Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*. 2013;4(2):119–28. doi: 10.4161/VIRU.22913.

Mba IE, Nweze EI. Mechanism of *Candida* pathogenesis: revisiting the vital drivers. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2020;39(10):1797–819. doi: 10.1007/S10096-020-03912-W.

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. doi: 10.3389/FCIMB.2021.782733.

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.

Nayak T, Mandal SM, Neog K, Ghosh AK. Characterization of a Gloverin-Like Antimicrobial Peptide Isolated from Muga Silkworm, *Antheraea assamensis*. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* 2017 24:2. 2017;24(2):337–46. doi: 10.1007/s10989-017-9618-0.

Nikou SA, Zhou C, Griffiths JS, Kotowicz NK, Coleman BM, Green MJ, et al. The *Candida albicans* toxin candidalysin mediates distinct epithelial inflammatory responses through p38 and EGFR-ERK pathways. *Sci Signal*. 2022;15(728). doi: 10.1126/SCISIGNAL.ABJ6915.

Njus D, Kelley PM, Tu YJ, Schlegel HB. Ascorbic acid: The chemistry underlying its antioxidant properties. *Free Radic Biol Med*. 2020;159:37–43. doi: 10.1016/J.FREERADBIOMED.2020.07.013.

Parambath S, Dao A, Kim HY, Zawahir S, Izquierdo AA, Tacconelli E, et al. *Candida albicans*-A systematic review to inform the World Health Organization Fungal Priority Pathogens List. *Med Mycol*. 2024;62(6). doi: 10.1093/MMY/MYAE045.

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):56. doi: 10.1093/FEMSPD/FTAA056.

Pereira R, dos Santos Fontenelle RO, de Brito EHS, de Moraes SM. Biofilm of *Candida albicans*: formation, regulation and resistance. *J Appl Microbiol*. 2021;131(1):11–22. doi: 10.1111/JAM.14949.

Perumal P, Mekala S, Chaffin WLJ. Role for Cell Density in Antifungal Drug Resistance in *Candida albicans* Biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*.

2007;51(7):2454. doi: 10.1128/AAC.01237-06.

Piatek M, Sheehan G, Kavanagh K. Utilising *Galleria mellonella* larvae for studying in vivo activity of conventional and novel antimicrobial agents. *Pathog Dis.* 2020;78(8):59. doi: 10.1093/FEMSPD/FTAA059.

Ponde NO, Lortal L, Ramage G, Naglik JR, Richardson JP. *Candida albicans* biofilms and polymicrobial interactions. *Crit Rev Microbiol.* 2021;47(1):91–111. doi: 10.1080/1040841X.2020.1843400.

Quiles-Melero I, García-Rodríguez J. [Systemic antifungal drugs]. *Rev Iberoam Micol.* 2021;38(2):42–6. doi: 10.1016/J.RIAM.2021.04.004.

Rapala-Kozik M, Surowiec M, Juszcak M, Wronowska E, Kulig K, Bednarek A, et al. Living together: The role of *Candida albicans* in the formation of polymicrobial biofilms in the oral cavity. *Yeast.* 2023;40(8):303–17. doi: 10.1002/YEA.3855.

Robbins N, Cowen LE. *Candida*. *Current Biology.* 2025;35(11):R522–6. doi: 10.1016/j.cub.2025.01.063.

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.

Ryazanova AD, Alekseev AA, Slepneva IA. The phenylthiourea is a competitive inhibitor of the enzymatic oxidation of DOPA by phenoloxidase. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2012;27(1):78–83. doi: 10.3109/14756366.2011.576010;REQUESTEDJOURNAL:JOURNAL:IENZ20;WGROU:STRING:PUBLICATION.

Rzymiski P, Gwenzi W, Poniedziałek B, Mangul S, Fal A. Climate warming, environmental degradation and pollution as drivers of antibiotic resistance. *Environmental Pollution.* 2024;346:123649. doi: 10.1016/J.ENVPOL.2024.123649.

Sadanandan B, Vaniyamparambath V, Lokesh KN, Shetty K, Joglekar AP, Ashrit P, et al. *Candida albicans* biofilm formation and growth optimization for functional studies using response surface methodology. *J Appl Microbiol.* 2022;132(4):3277–92. doi: 10.1111/JAM.15402.

Santori D, Fausto AM, Gelli A, Pifferi AR, Dottarelli S, Cucci S, et al. Impact of *Salmonella enteritidis* Infection and Mechanical Stress on Antimicrobial Peptide Expression in *Hermetia illucens*. *Insects.* 2025;16(7):692. doi: 10.3390/INSECTS16070692.

Satala D, Gonzalez-Gonzalez M, Smolarz M, Surowiec M, Kulig K, Wronowska E, et al. The Role of *Candida albicans* Virulence Factors in the Formation of Multispecies Biofilms With Bacterial Periodontal Pathogens. *Front Cell Infect*

Microbiol. 2022;11. doi: 10.3389/FCIMB.2021.765942.

Seneviratne CJ, Jin LJ, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Cell Density and Cell Aging as Factors Modulating Antifungal Resistance of *Candida albicans* Biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(9):3259. doi: 10.1128/AAC.00541-08.

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

Sharma K, Parmanu PK, Sharma M. Mechanisms of antifungal resistance and developments in alternative strategies to combat *Candida albicans* infection. *Arch Microbiol*. 2024;206(3). doi: 10.1007/S00203-023-03824-1.

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, Garvey A, Croke M, Kavanagh K. Innate humoral immune defences in mammals and insects: The same, with differences ? *Virulence*. 2018; doi: 10.1080/21505594.2018.1526531.

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.

Silva LN, Mello TP de, Ramos L de S, Branquinha MH, Santos ALS dos. New and Promising Chemotherapeutics for Emerging Infections Involving Drug-resistant Non-*albicans* *Candida* Species. *Curr Top Med Chem*. 2019;19(28):2527–53. doi: 10.2174/1568026619666191025152412.

Silva-Dias A, Miranda IM, Branco J, Monteiro-Soares M, Pina-Vaz C, Rodrigues AG. Adhesion, biofilm formation, cell surface hydrophobicity, and antifungal planktonic susceptibility: Relationship among *Candida* spp. *Front Microbiol*. 2015;6(MAR):133307. doi: 10.3389/fmicb.2015.00205.

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.

Skafar D, Shumeyko D, Skafar D, Shumeyko D. EDTA-Na 2 - anticoagulant for hemolymph of australian red claw crayfish (*Cherax quadricarinatus*). *Genetics and Breeding of Animals*. 2022;0(2):61–9. doi: 10.31043/2410-2733-2022-2-61-69.

Smith DFQ, Casadevall A. Fungal immunity and pathogenesis in mammals versus the invertebrate model organism *Galleria mellonella*. *Pathog Dis*. 2021;79(3). doi: 10.1093/FEMSPD/FTAB013.

Smith DFQ, Dragotakes Q, Kulkarni M, Hardwick JM, Casadevall A. *Galleria mellonella* immune melanization is fungicidal during infection n.d.; doi: 10.1038/s42003-022-04340-6.

Söderhäll K, Smith VJ. Separation of the haemocyte populations of *Carcinus Maenas* and other marine decapods, and prophenoloxidase distribution. *Dev Comp Immunol*. 1983;7(2):229–39. doi: 10.1016/0145-305X(83)90004-6.

Souza BMN, Miñán AG, Brambilla IR, Pinto JG, Garcia MT, Junqueira JC, et al. Effects of antimicrobial photodynamic therapy with photodithazine® on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): Studies in biofilms and experimental model with *Galleria mellonella*. *J Photochem Photobiol B*. 2024;252:112860. doi: 10.1016/J.JPHOTOBIOB.2024.112860.

Stączek S, Zdybicka-Barabas A, Wiater A, Pleszczyńska M, Cytryńska M. Activation of cellular immune response in insect model host *Galleria mellonella* by fungal α -1,3-glucan. *Pathog Dis*. 2020;78(9). doi: 10.1093/FEMSPD/FTAA062.

Staniszewska M. Virulence Factors in *Candida* species. *Curr Protein Pept Sci*. 2020;21(3):313–23. doi: 10.2174/1389203720666190722152415.

Su Y, Sun L, Li C. Immune priming in sea cucumber *Apostichopus japonicus* against repeated *Vibrio splendidus* infections. *Aquaculture*. 2026;612:743095. doi: 10.1016/J.AQUACULTURE.2025.743095.

Sun C, Zhao X, Jiao Z, Peng J, Zhou L, Yang L, et al. The Antimicrobial Peptide AMP-17 Derived from *Musca domestica* Inhibits Biofilm Formation and Eradicates Mature Biofilm in *Candida albicans*. *Antibiotics* 2022, Vol 11,. 2022;11(11). doi: 10.3390/antibiotics11111474.

Tao Y, Duma L, Rossez Y. *Galleria mellonella* as a Good Model to Study *Acinetobacter baumannii* Pathogenesis. *Pathogens*. 2021;10(11). doi: 10.3390/PATHOGENS10111483.

Terra Garcia M, Castro Pedroso LL, Do Carmo PHF, da Silva LAN, Bueno TL, dos Santos VGR, et al. Functionalization of cationic porphyrins with peripheral platinum(II) complexes to optimize photodynamic therapy against *Candida*-associated infections: a focus on denture stomatitis and burn wounds. *Mycology*. 2025;16(4):1734–53. doi: 10.1080/21501203.2025.2468756.

Trevijano-Contador N, Zaragoza O. Immune Response of *Galleria mellonella* against Human Fungal Pathogens. *Journal of Fungi*. 2019;5(1). doi: 10.3390/JOF5010003.

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/SUPPL_FILE/KVIR_A_1135289_SM3709.D OCX.

Vanhoffelen E, Michiels L, Brock M, Lagrou K, Reséndiz-Sharpe A, Velde G Vande. Powerful and Real-Time Quantification of Antifungal Efficacy against Triazole-Resistant and -Susceptible *Aspergillus fumigatus* Infections in *Galleria mellonella* by Longitudinal Bioluminescence Imaging. *Microbiol Spectr*. 2023;11(4). doi: 10.1128/SPECTRUM.00825-23.

Vertyporokh L, Kordaczuk J, Mak P, Hułas-Stasiak M, Wojda I. Host-pathogen interactions upon the first and subsequent infection of *Galleria mellonella* with *Candida albicans*. *J Insect Physiol*. 2019;117:103903. doi: 10.1016/J.JINSPHYS.2019.103903.

Vertyporokh L, Wojda I. Immune response of *Galleria mellonella* after injection with non-lethal and lethal dosages of *Candida albicans*.

Wagner AS, Vogel AK, Lumsdaine SW, Phillips EK, Willems HME, Peters BM, et al. Mucosal Infection with Unmasked *Candida albicans* Cells Impacts Disease Progression in a Host Niche-Specific Manner. *Infect Immun*. 2022;90(12). doi: 10.1128/IAI.00342-22.

Welander M. The Effect of Mercaptoethanol on the Activity of Enzymes of Nitrogen Metabolism in Leaves from *Urtica dioica* and *Spinacia oleracea*. *Physiol Plant*. 1978;43(3):242–6. doi: 10.1111/j.1399-3054.1978.tb02571.x.

Willaert RG. Adhesins of Yeasts: Protein Structure and Interactions. *J Fungi (Basel)*. 2018;4(4). doi: 10.3390/JOF4040119.

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, Sułek M, Kordaczuk J. The greater wax moth *Galleria mellonella*: biology and use in immune studies. *Pathog Dis*. 2020;78(9):57. doi: 10.1093/FEMSPD/FTAA057.

World Health Organization. *WHO fungal priority pathogens list to guide research, development and public health action*. Geneva: World Health Organization; 2022.

Wrońska AK, Boguś MI, Włóka E, Kazek M, Kaczmarek A, Zalewska K. Cuticular fatty acids of *Galleria mellonella* (Lepidoptera) inhibit fungal enzymatic activities of pathogenic *Conidiobolus coronatus*. *PLoS One*. 2018;13(3):e0192715. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0192715.

Zdybicka-Barabas A, Stączek S, Kunat-Budzyńska M, Cytryńska M. Innate Immunity in Insects: The Lights and Shadows of Phenoloxidase System Activation. *Int J Mol Sci*. 2025;26(3):1320. doi: 10.3390/IJMS26031320.