

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta **Tese** será disponibilizado somente a partir de 20/12/2026.



UNIVERSIDADE ESTADUAL “JÚLIO MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS – CAMPUS ARARAQUARA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E
BIOTECNOLOGIA APLICADAS À FARMÁCIA

KELVIN SOUSA DOS SANTOS

Estudo do potencial terapêutico de peptídeos gerados por *Galleria mellonella*
utilizando a técnica de mascaramento de epítomos

Araraquara, SP
2025

KELVIN SOUSA DOS SANTOS

Estudo do potencial terapêutico de peptídeos gerados por *Galleria mellonella* utilizando a técnica de mascaramento de epítomos

Defesa de tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Andrei Moroz

Araraquara, SP
2025

S237e Santos, Kelvin Sousa dos.
Estudo do potencial terapêutico de peptídeos gerados por *Galleria mellonella* utilizando a técnica de mascaramento de epítomos / Kelvin Sousa dos Santos. – Araraquara, 2024.
106 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Andrei Moroz.

1. *Galleria mellonella*. 2. Mascaramento de antígeno. 3. Animais alternativos. 4. Interação fungo-hospedeiro. I. Moroz, Andrei, orient. II. Título.

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara
Kazumi Tomoyose - CRB 8/10904

CAPES: 33004030081P7

Esta ficha não pode ser modificada



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Estudo do potencial terapêutico de peptídeos gerados por *Galleria mellonella* utilizando a técnica de mascaramento de epítomos

AUTOR: KELVIN SOUSA DOS SANTOS

ORIENTADOR: ANDREI MOROZ

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Ciências, área de conhecimento: Citologia e Biologia Celular pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. ANDREI MOROZ (Participação Virtual)
Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da Unesp

Profa. Dra. LILIANA SCORZONI (Participação Virtual)
Universidade de Guarulhos (UNG)

Profa. Dra. RENATA ROSITO TONELLI (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Farmacêuticas / Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas do Campus Diadema da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp)

Dra. TATIANA MARIA DE SOUZA MOREIRA (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da Unesp

Araraquara, 20 de dezembro de 2024

Agradecimentos

Agradeço também, mais uma vez, às principais pessoas que me fizeram chegar até aqui. O início do meu interesse pela pesquisa foi graças ao incentivo de vocês três: minha mãe Angela, minha tia Odete e minha professora de Ciências, Erika. Muito obrigado!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Andrei Moroz, pelo incentivo desde o início da minha pós-graduação, pelos anos de orientação durante o mestrado e doutorado, e por ter me dado a oportunidade de aprender duas das coisas que mais amo na pesquisa: cultura celular e purificação de anticorpos. Agradeço e quero que saiba que irei levar essa linha de pesquisa comigo com muita felicidade, pois, em nenhum momento, foi difícil fazer o que eu gostava.

À Prof^a Maria José Soares Mendes Giannini, pelos ensinamentos durante a pós-graduação, pela atenção, e cuidado com meu trabalho, por me ensinar os detalhes da micologia, pela disposição em sempre me ajudar pessoalmente com o que precisava aprender, e principalmente, pelo estágio de docência, e a confiança em dividir suas aulas comigo. Foi muito bom aprender com você.

À Prof^a Ana Marisa Fusco-Almeida, agradeço por, assim como a Zezé, ter compartilhado tantos conhecimentos durante minha pós-graduação. Sou grato pelos ensinamentos nas práticas do estágio de docência, por permitir que eu tivesse esse contato como professor e, também pelos diversos trabalhos que realizamos juntos, nos quais pude ter uma visão além da academia, participando de projetos com empresas.

Ao pessoal do laboratório:

Agradeço à Rafa por toda a ajuda durante meu doutorado, pela confiança que teve em mim para ensiná-la. E, embora você não tenha sido minha primeira aluna de IC, sempre será a primeira que me vem à mente quando penso nisso. E aos alunos do laboratório Caio e Júlia pela ajuda durante esse trabalho.

À Samanta e ao William, por terem compartilhado todos esses anos de doutorado comigo, dividindo nossas experiências diariamente no laboratório.

À minha amiga Ana Karla, que sempre foi tão atenciosa comigo e com todos ao seu redor. Obrigado por compartilhar toda a sua experiência com a gente e pelo privilégio de termos nossa professora de micologia ali, ao nosso lado, todos os dias. Foi ótimo aprender com você também.

À Claudinha, agradeço, primeiramente, por ter me ensinado a usar o equipamento que mais gostei de utilizar durante o doutorado. Obrigado pelo carinho e pela atenção em cada

momento de aprendizado e pela sua companhia em todas as manhãs durante todos esses anos. Ao pessoal da micologia, agradeço ao Henrique e à Débora, que chegaram ao laboratório no momento mais propício, sempre prontos para ajudar quando precisei. Assim como ao Felipe e ao Henrique, que juntos tornaram os dias difíceis um pouco menos difíceis. Obrigado pela amizade, pelos almoços e por todos os dias juntos!

Ao Bruno, à Bia e ao Matheus, também sou grato pelos cafés e pelas companhias em todos os almoços (5 colheres e um tchãm!), e ao Marco pelos melhores enfeites e decorações do laboratório.

À Panta, também agradeço por toda a contribuição durante meu doutorado, pelas perguntas, pelo incentivo a buscar técnicas novas que poderiam me ajudar, pela atenção, paciência e por tudo que me ensinou.

À seção técnica de pós-graduação pelo suporte durante esses anos e à Cris, também do departamento, pela prontidão e ajuda.

À CAPES, pela bolsa no início do doutorado, e ao PROEX e à FAPESP pelo auxílio durante o restante da minha pós-graduação (Processo: 23/17852-1).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

Os estudos de patologias humanas são essenciais para a identificação de alvos terapêuticos e o desenvolvimento de novos tratamentos. Uma das questões centrais nessas pesquisas é a escolha de modelos experimentais, considerando os desafios éticos e científicos no uso de animais. Como alternativa, modelos *in vivo* com animais alternativos, como *Galleria mellonella*, têm se destacado devido à sua complexidade celular e biológica que é cada vez mais investigada, além de vias metabólicas que mimetizam aspectos relevantes para o estudo de doenças. A fase larval de *G. mellonella* é amplamente utilizada para investigar respostas imunes, especialmente as mediadas por hemócitos e peptídeos antimicrobianos, considerados parte da resposta humoral do inseto. Além disso, o animal é um modelo consolidado para estudos de interação fungo-hospedeiro, sendo aplicado para avaliar a patogênese de microrganismos como *Cryptococcus neoformans*. Pesquisas já demonstraram que esse modelo pode elucidar fatores de virulência do fungo e aspectos da imunidade inata do inseto. Nesse contexto, metodologias clássicas utilizadas em mamíferos, como a técnica de mascaramento de antígenos, têm se mostrado promissoras ao modular o sistema imune para direcionar a produção de anticorpos contra epítomos raros ou pouco expressos. Esses epítomos podem desempenhar papéis cruciais em doenças infecciosas, autoimunes e até no câncer. O presente estudo propõe o uso dessa técnica de mascaramento para investigar a resposta imune de *G. mellonella* quando infectada por *C. neoformans* com epítomos mascarados, comparando-a com a resposta a células não mascaradas, além de investigações relacionadas entre fatores nutricionais do fungo e sua relação com a virulência no modelo. Os experimentos envolveram a separação eletroforética e purificação de peptídeos antimicrobianos por cromatografia, seguidos de sua caracterização biológica frente ao próprio microrganismo utilizado como imunizante. A atividade antimicrobiana foi avaliada, em relação ao aspecto geral da hemolinfa de larvas imunizadas nas condições estabelecidas. Os resultados mostraram que *G. mellonella* é um modelo eficaz para avaliar a plasticidade do sistema imune frente ao mascaramento de antígenos, contribuindo para a compreensão de respostas imunes complexas. A técnica revelou alterações na produção de polipeptídeos antimicrobianos em condições de mascaramento, apontando potenciais biomarcadores e novos alvos terapêuticos. Assim, o estudo reforça o papel de *G. mellonella* como ferramenta versátil e ética para pesquisas imunológicas e patogênicas.

Palavras-chave: *Galleria mellonella*; mascaramento de antígeno; animais alternativos; interação fungo-hospedeiro; mascaramento de epítomos.

ABSTRACT

Studies on human pathologies are essential for the identification of therapeutic targets and the development of new treatments. One of the central issues in such research is the selection of experimental models, considering the ethical and scientific challenges associated with the use of animals. As an alternative, in vivo models with alternative animals, such as *Galleria mellonella*, have gained prominence due to their cellular and biological complexity, which is increasingly being investigated, and their metabolic pathways that mimic relevant aspects of disease studies. The larval stage of *G. mellonella* is widely used to investigate immune responses, particularly those mediated by hemocytes and antimicrobial peptides, which are considered part of the insect's humoral immune response. Furthermore, this organism is a well-established model for host-pathogen interaction studies, particularly in assessing the pathogenesis of microorganisms such as *Cryptococcus neoformans*. Studies have shown that this model can elucidate fungal virulence factors and aspects of the insect's innate immunity. In this context, classical methodologies used in mammals, such as the antigen-masking technique, have proven promising in modulating the immune system to direct the production of antibodies against rare or poorly expressed epitopes. These epitopes can play crucial roles in infectious diseases, autoimmune disorders, and even cancer. This study proposes the use of the masking technique to investigate the immune response of *G. mellonella* when infected with *C. neoformans* with masked epitopes, comparing it to the response to unmasked cells, alongside investigations into the nutritional factors of the fungus and their relationship with virulence in the model. The experiments involved electrophoretic separation and purification of antimicrobial peptides through chromatography, followed by their biological characterization against the microorganism used as an immunogen. Antimicrobial activity was assessed concerning the general aspect of the hemolymph of immunized larvae under the established conditions. The results showed that *G. mellonella* is an effective model for evaluating the immune system's plasticity in response to antigen masking, contributing to the understanding of complex immune responses. The technique revealed changes in the production of antimicrobial polypeptides under masking conditions, highlighting potential biomarkers and new therapeutic targets. Thus, the study reinforces the role of *G. mellonella* as a versatile and ethical tool for immunological and pathogenic research.

Keywords: *Galleria mellonella*; antigen masking; alternative animals; fungus-host interaction; epitope masking.

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Alvos terapêuticos.....	14
1.2 Animais Alternativos.....	14
1.3 <i>Galleria mellonella</i>	15
1.4 Uso de <i>G. mellonella</i> em estudos de infecção e fatores de virulência.....	19
1.5 Técnica de imunização por mascaramento de epítipo.....	21
1.6 Digestão de anticorpos.....	22
1.7 Criptococose.....	24
1.8 Hipótese.....	25
2. OBJETIVOS.....	26
2.1 Objetivo Principal.....	26
2.2 Objetivos Específicos.....	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS. Parte I – Digestão enzimática de anticorpos.....	27
3.1 Digestões enzimáticas de IgG anti-mouse utilizando a pepsina livre.....	27
3.2 Digestão enzimática de IgG murina em coluna manual utilizando a pepsina imobilizada.....	28
3.3 Análise da clivagem de anticorpos por eletroforese em gel de poliacrilamida – <i>SDS Page</i>	29
3.4 Forma de análise dos resultados.....	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO. Parte I – Digestão enzimática de IgG utilizando pepsina livre e imobilizada em coluna de CNBr <i>Sepharose Activated 4b</i>	31
4.1 Digestões enzimáticas.....	31
4.2 Análise da clivagem de anticorpos por digestão livre por eletroforese em gel de poliacrilamida – <i>SDS Page</i>	34
4.3 Digestão enzimática de IgG murina em coluna manual utilizando a pepsina imobilizada.....	36
3. MATERIAIS E MÉTODOS. Parte II – Efeito do mascaramento de epítomos de GXM com 18B7 e modificação causadas por meios de cultura no desenvolvimento de <i>C. neoformans</i> , influência na sobrevivência de <i>G. mellonella</i> e análise do perfil proteico da hemolinfa.....	39
3.5 Manutenção e cultivo das cepas H99 (<i>C. neoformans</i>) e CAP67 (mutante acapsular de <i>C. neoformans</i>) e reisolamento.....	39
3.6 Identificação bioquímica do isolado.....	39
3.7 Confirmação da cepa pela técnica de MALDI-TOF.....	40
3.8 Infecção das larvas de <i>G. mellonella</i> e re-isolamento da cepa.....	40
3.9 Infecção de larvas de <i>G. mellonella</i> utilizando a técnica de mascaramento de epítomos com anticorpo monoclonal 18B7 (anti-GXM) e análise da sobrevivência das larvas.....	41
3.10 Influência da modificação de diferentes meios de cultura na infecção de <i>C. neoformans</i> em <i>G. mellonella</i>	42
3.10.1 Modificação do meio de cultura DMEM.....	42
3.10.2 Modificação do meio de cultura YPD (Yeast Peptone Dextrose).....	42
3.10.3 Modificação do meio de cultura Sabouraud.....	42
3.10.4 Modificação do meio de cultura LIM (Low Iron Medium).....	43
3.11 Contagem das leveduras por hemocítmetro utilizando o método de exclusão por azul de <i>trypan</i>	43
3.12 Aquisição de imagem e medidas micrométricas dos componentes celulares.....	43
3.13 Infecção de larvas de <i>G. mellonella</i> utilizando a cepa H99 cultivada em diferentes condições, e análise da sobrevivência das larvas.....	44
3.14 Estratégias para purificação manual da hemolinfa de <i>G. mellonella</i>	44
3.14.1 Cromatografia por exclusão molecular estratégia I.....	44
3.14.2 Cromatografia estratégia II.....	45
3.15 Análise do perfil eletroforético de proteínas e peptídeos do mascaramento de epítomos de GXM com 18B7 e modificação causadas por meios de cultura no desenvolvimento de <i>C. neoformans</i> , influência na sobrevivência de <i>G. mellonella</i> por <i>SDS-Page</i>	45
3.15.1 Perfil da hemolinfa de larvas infectadas com mascaramento de epítomos de GXM utilizando o 18B7.....	45
3.15.2 Perfil da hemolinfa de larvas infectadas com <i>C. neoformans</i> submetido a diferentes condições	

de cultivo.....	46
3.16 Análise das bandas resolvidas no perfil eletroforético da hemolinfa.....	46
3.17 Inibição da fenoxidase e ensaio de sobrevivência fúngica <i>in vitro</i>.....	47
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO. Parte II – – Efeito do mascaramento de epítomos de GXM com 18B7 e modificação causadas por meios de cultura no desenvolvimento de <i>C. neoformans</i>, influência na sobrevivência de <i>G. mellonella</i> e análise do perfil proteico da hemolinfa.....	48
4.4 Crescimento e re-isolamento da cepa de <i>C. neoformans</i>.....	48
4.5 Infecção em modelo <i>G. mellonella</i> com a cepa H99 com antígenos GXM mascarados pelo 18B7.....	52
4.6 Influência da modificação de diferentes meios de cultura na infecção de <i>C. neoformans</i> em <i>G. mellonella</i>.....	63
4.6.1 DMEM.....	63
4.6.2 YPD.....	64
4.6.3 Sabouraud.....	65
4.6.4 LIM.....	66
5. CONCLUSÕES.....	75
REFERÊNCIAS.....	76
APÊNDICE A. Análises eletroforéticas dos géis das figuras 15 e 22, utilizando o <i>GelAnalyzer</i> 23.1.1.....	89

Índice de figuras

Figura 1 - Anatomia da <i>Galleria mellonella</i>	17
Figura 2 - Sistema de score de saúde em <i>Galleria mellonella</i>	21
Figura 3 - Curvas de calibração do kit Pierce BCA Assay (Thermofisher).....	27
Figura 4 - Digestão livre da IgG murina utilizando pepsina com e sem troca de tampão.....	33
Figura 5 - Digestão livre da IgG utilizando pepsina.....	33
Figura 6 - SDS-PAGE 12% sob condições redutoras e não redutoras referente as frações obtidas do fragmento F(ab') ₂ a partir da IgG murina durante a digestão livre com pepsina.....	35
Figura 7 - Concentrações dos componentes utilizados na digestão de IgG murina utilizando coluna poly-prep com pepsina imobilizada em sepharose CNBr – activated 4B.....	37
Figura 8 - SDS-PAGE 12% em condições não redutoras referente a digestão enzimática de IgG anti-mouse, utilizando coluna de CNBr sepharose- activated carregada com pepsina.....	38
Figura 9 - Curvas obtidas a partir dos padrões de peso molecular.....	47
Figura 10 - Re-isolamento e reativação da virulência de <i>C. neoformans</i> (H99) para experimentação..	48
Figura 11 - Identificação da espécie de <i>Cryptococcus</i> pela técnica de MALDI-TOF.....	51
Figura 12 - Efeitos do anticorpo monoclonal 18B7 anti-GXM na resposta imune de <i>G. mellonella</i> com GXM mascarados.....	52
Figura 13 - Cromatografia de exclusão por gel da hemolinfa de larvas de <i>G. mellonella</i> não desafiadas imunologicamente em colunas poly-prep bio-rad utilizando Sephadex G-50 medição da absorbância a 280 nm.....	55
Figura 14 - Cromatografia de exclusão por gel da hemolinfa de larvas de <i>G. mellonella</i> não desafiadas imunologicamente em colunas poly-prep bio-rad utilizando sephadex G-25 e sephadex G-50 com concentrações de TFA (ácido trifluoroacético) a 0,1% e 0,7% e medição da absorbância a 280nm.....	56
Figura 15 - SDS-PAGE 17% sob condições não redutoras da hemolinfa das larvas <i>G. mellonella</i> infectadas com mascaramento de epítomos em 24h.....	59
Figura 16 - Spotagem da inibição da atividade da fenoloxidase in vitro a partir da hemolinfa de <i>G. mellonella</i> desafiadas por mascaramento de epítomos.....	61
Figura 17 - Ensaio da inibição da atividade da fenoloxidase in vitro a partir da hemolinfa de <i>G. mellonella</i> desafiadas por mascaramento de epítomos.....	62
Figura 18 - Influência da modificação do meio de cultura DMEM no crescimento e na estrutura celular de <i>C. neoformans</i> (H99).....	69
Figura 19 - Influência da modificação do meio de cultura YPD no crescimento e na estrutura celular de <i>C. neoformans</i> (H99).....	70
Figura 20 - Influência da modificação do meio de cultura SD no crescimento e na estrutura celular de <i>C. neoformans</i> (H99).....	71
Figura 21 - Influência da modificação do meio de cultura LIM no crescimento e na estrutura celular de <i>C. neoformans</i> (H99).....	72
Figura 22 - Gel SDS-PAGE Gradiente de 5-17% de da hemolinfa de <i>G. mellonella</i> durante os desafios imunes com modificações de meio de cultura utilizando <i>C. neoformans</i> (H99) em 72h, cultivado em diferentes meios de cultura sob condições não desnaturantes.....	73
Figura 23 - A1 - SDS-PAGE 17% sob condições não redutoras da hemolinfa das larvas <i>G. mellonella</i> infectadas com mascaramento de epítomos.....	89
Figura 24 - A2 - SDS-PAGE 17% sob condições não redutoras da hemolinfa das larvas <i>G. mellonella</i> infectadas com mascaramento de epítomos.....	90
Figura 25 - A3 - SDS-PAGE 17% sob condições não redutoras da hemolinfa das larvas <i>G. mellonella</i> infectadas com mascaramento de epítomos.....	91
Figura 26 - A4 - SDS-PAGE 17% sob condições não redutoras da hemolinfa das larvas <i>G. mellonella</i> infectadas com mascaramento de epítomos.....	92
Figura 27 - A5 - Gel SDS-PAGE Gradiente de 5-17% de da hemolinfa de <i>G. mellonella</i> durante os desafios imunes com <i>C. neoformans</i> (H99), cultivado em diferentes meios de cultura sob condições não desnaturantes concentrado em VivaSpin 10kDa MWCO.....	93
Figura 28 - A6 - Gel SDS-PAGE Gradiente de 5-17% de da hemolinfa de <i>G. mellonella</i> durante os desafios imunes com <i>C. neoformans</i> (H99), cultivado em diferentes meios de cultura sob condições não desnaturantes concentrado em VivaSpin 10kDa MWCO.....	94

Figura 29 - A7 - Gel SDS-PAGE Gradiente de 5-17% de da hemolinfa de <i>G. mellonella</i> durante os desafios imunes com <i>C. neoformans</i> (H99), cultivado em diferentes meios de cultura sob condições não desnaturantes concentrado em VivaSpin 10kDa MWCO.....	95
Figura 30 - A8 - Gel SDS-PAGE Gradiente de 5-17% de da hemolinfa de <i>G. mellonella</i> durante os desafios imunes com <i>C. neoformans</i> (H99), cultivado em diferentes meios de cultura sob condições não desnaturantes concentrado em VivaSpin 10kDa MWCO.....	96
Figura 31 - A9 - Gel SDS-PAGE Gradiente de 5-17% de da hemolinfa de <i>G. mellonella</i> durante os desafios imunes com <i>C. neoformans</i> (H99), cultivado em diferentes meios de cultura sob condições não desnaturantes concentrado em VivaSpin 10kDa MWCO.....	97
Figura 32 - A10 - Gel SDS-PAGE Gradiente de 5-17% de da hemolinfa de <i>G. mellonella</i> durante os desafios imunes com <i>C. neoformans</i> (H99), cultivado em diferentes meios de cultura sob condições não desnaturantes concentrado em VivaSpin 10kDa MWCO.....	98
Figura 33 - A11 - Gel SDS-PAGE Gradiente de 5-17% de da hemolinfa de <i>G. mellonella</i> durante os desafios imunes com <i>C. neoformans</i> (H99), cultivado em diferentes meios de cultura sob condições não desnaturantes concentrado em VivaSpin 10kDa MWCO.....	102
Figura 34 - A12 - Gel SDS-PAGE Gradiente de 5-17% de da hemolinfa de <i>G. mellonella</i> durante os desafios imunes com <i>C. neoformans</i> (H99), cultivado em diferentes meios de cultura sob condições não desnaturantes concentrado em VivaSpin 10kDa MWCO.....	103
Figura 35 - A13 - Gel SDS-PAGE Gradiente de 5-17% de da hemolinfa de <i>G. mellonella</i> durante os desafios imunes com <i>C. neoformans</i> (H99), cultivado em diferentes meios de cultura sob condições não desnaturantes concentrado em VivaSpin 10kDa MWCO.....	104

Lista de abreviaturas e siglas

% - porcentagem
 μ - micromolar
 μL - microlitros
18B7 - Anticorpo monoclonal anti GXM de *Cryptococcus*
AMPs - Antimicrobial Peptides (Peptídeos antimicrobianos)
apL-III - apolipoproteína III
APS - Ammonium Persulfate (Persulfato de Amônio)
cap67 – Cepa mutante capsular de *Cryptococcus neoformans*
CNBr - Cyanogen Bromide (Brometo de Cianogênio)
DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium (Meio Modificado de Eagle de Dulbecco)
DO - Densidade Óptica
DTPA - Diethylenetriaminepentaacetic Acid (Ácido Dietilenotriaminopentacético)
DTT – ditioneitol
GTP - guanosina trifosfato
F(ab') - Fragmento monovalente de anticorpo
Fc – Fração cristalizante
F(ab')₂ - Fragmento bivalente de anticorpo
FeCl₃ - Cloreto de Ferro III
GXM - Glucuronoxylomannan (principal componente da cápsula de *Cryptococcus neoformans*)
h - horas
H99 - Cepa de *Cryptococcus neoformans*
IgG - Immunoglobulin G (Imunoglobulina G)
kDa - kilodalton
LIM - *Low Iron Medium* (Meio com Baixa Concentração de Ferro)
M - molar
Min - minutos
mL - mililitro
mM – milimolar
MW - Molecular Weight
MWCO - Molecular Weight Cut-Off (Corte de Peso Molecular)
Nm - nanometro
oC - graus Celsius
PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida
PBS - Phosphate-Buffered Saline (Solução Salina Tamponada com Fosfato)
PM - Peso Molecular
SDS - dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE - Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio)
SFB - Soro Fetal Bovino
TEMED - Tetramethylethylenediamine (Tetra Metiletilenodiamina)
TFA - Trifluoroacetic Acid (Ácido Trifluoroacético)
 β - letra grega que significa “beta”
 μM - micrômetro
Tris HCl - Tris(hidroximetil)aminometano cloridrato.
m/v - Massa/volume.
mol/L - Molaridade.
BCA - Bicinchoninic Acid (Ácido Bicinchonínico).
YPD – Yeast Peptone Dextrose
SD – Sabouraud Dextrose
MOPS - 3-(N-morfolino)propanossulfônico ácido
Rpm – rotação por minuto

1. INTRODUÇÃO

1.1 Alvos terapêuticos

A busca por alvos que possam ser utilizados para a ligação de moléculas capazes de interferir nos mecanismos de desenvolvimento e crescimento fúngico surge das limitações apresentadas pelos modelos e estratégias de tratamento atuais. A imunidade do hospedeiro desempenha um papel crucial na defesa contra doenças; no entanto, quando essa defesa falha, torna-se necessário recorrer a estratégias de imunoterapia, tratamentos medicamentosos ou terapias alternativas. Infelizmente, essas abordagens nem sempre são totalmente eficazes, especialmente no tratamento de doenças fúngicas.

No caso de fungos como *Candida*, existem apenas três classes principais de medicamentos: polienos, azóis e equinocandinas. Este espectro terapêutico é limitado e frequentemente associado a efeitos adversos, como nefrotoxicidade, devido ao direcionamento não seletivo ao ergosterol (Lu *et al.*, 2023). Deficiências imunológicas desempenham um papel significativo na progressão das infecções fúngicas, sendo estimado que micoses invasivas causem cerca de 3,8 milhões de mortes anuais. Além disso, há uma crescente resistência dos patógenos a essas três classes de medicamentos, comprometendo sua eficácia e contribuindo para a obsolescência dessas terapias (Wang; Wang; Li, 2024).

Estudos têm sido conduzidos com o objetivo de compreender e desenvolver novos sistemas de tratamento, incluindo medicamentos panfúngicos e estratégias inovadoras de administração, entre outras alternativas promissoras (Meagher *et al.*, 2023; Wu *et al.*, 2023).

A parede celular é uma estrutura fundamental para os fungos, sendo essencial para a morfogênese, patogênese, ecologia e resposta aos desafios ambientais. O design dessa estrutura pode conferir vantagens adaptativas aos fungos, permitindo que atuem perante o sistema imune como escudos ou iscas imunológicas, dificultando a eliminação pelos mecanismos de defesa do hospedeiro (Gow *et al.*, 2017).

Durante a caracterização de alvos e substâncias que possam ser utilizadas de forma eficaz no tratamento de doenças, desde os ensaios *in vitro* até a fase de ensaios clínicos, é fundamental o uso de modelos de testagem apropriados para a pesquisa. Entre os métodos disponíveis, os modelos de animais alternativos desempenham um papel essencial nesse processo.

1.2 Animais Alternativos

Estudos do curso de patologias humanas são importantes fatores para descoberta de alvos terapêuticos e possíveis tratamentos (Childs *et al.*, 2015; Lu, *et al.*, 2019). Considerando

as pesquisas desenvolvidas atualmente, uma das problemáticas apresentadas se refere ao uso de quais animais podem ser utilizados para tais estudos, uma vez que esse assunto possui muitos desdobramentos científicos e éticos (Mikulak *et al.*, 2018; Human Society of USA, 2020). Após anos de pesquisa, no Congresso Nacional em 2008 foi estabelecida a “Lei Arouca”, que regulamenta o uso de animais em pesquisa, aliado ao CONCEA (Conselho Nacional de Controle Experimentação Animal) órgão ao qual está ligado ao Ministério da Ciência e Tecnologia – MCTI, e realiza o cadastramento de universidades aptas ao uso destes animais, respeitando as normas impostas (Fundação Oswaldo Cruz, 2008).

A Presidência da República reconhece como disposições preliminares a necessidade do uso de animais para ciência básica, ciência aplicada, desenvolvimento tecnológico, produção e controle da qualidade de drogas, medicamentos, alimentos, imunobiológicos, instrumentos, ou quaisquer outros testados em animais, conforme definido em regulamento próprio (Brasil, 2008).

Tendo em vista que animais como ratos e camundongos podem ser utilizados, mas são por lei monitorados e fiscalizados, o uso de animais alternativos propõe uma saída interessante para que haja a diminuição do uso de mamíferos como camundongos e coelhos, restringindo o uso destes somente quando estritamente necessário que é o caso da produção de anticorpos monoclonais pela técnica de hibridoma (Guimarães, Freire e Menezes, 2016; Scheidt *et al.*, 2017). Em adição possuímos também em território nacional o RENAMA (Rede de Métodos Alternativos), criado por demanda do MCTI e destinado a regulamentação de testes e validação de métodos utilizando animais alternativos como. *Galleria mellonella*, *Drosophila*, *Zebrafish*, *C. elegans* entre outros em atendimento a demanda da Lei Arouca (Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, 2022; Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações, 2024).

1.3 *Galleria melonella*

Os modelos animais têm desempenhado um papel crucial no avanço da pesquisa e na nossa compreensão das infecções humanas além das interações patógeno- hospedeiro, uma prática advinda da época de Aristóteles e Hipócrates (Carton, 2022). A evolução da microbiologia, demandou, significativamente o uso de modelos animais para demonstrar a patogenicidade dos microrganismos. Embora vertebrados como modelos murinos tenham sido tradicionalmente utilizados devido às suas semelhanças fisiológicas com os humanos, as preocupações éticas e os desafios regulamentares associados à sua utilização levaram a um interesse crescente em modelos alternativos. (Mylonakis; Casadevall; Ausubel, 2007).

A primeira diretiva europeia sobre proteção animal, estabelecida em 1986 e revista regularmente, enfatiza as regras dos 3Rs: Substituir, Reduzir e Refinar. As regras éticas e a complexidade de trabalhar com modelos de vertebrados, incluindo formação específica, licenças, tempos de adaptação e custos significativos, colocam desafios à investigação científica. Para resolver estas questões, os cientistas recorrem cada vez mais a modelos de invertebrados, como a mosca da fruta *Drosophila melanogaster*, o nematódeo *Caenorhabditis elegans* e a larva conhecida como traça da cera ou traça do mel *Galleria mellonella*. Esses invertebrados, sem nociceptores, apresentam uma alternativa econômica e eticamente vantajosa em relação a modelos murino por exemplo (Russel, 1959; Maccallum, 2012).

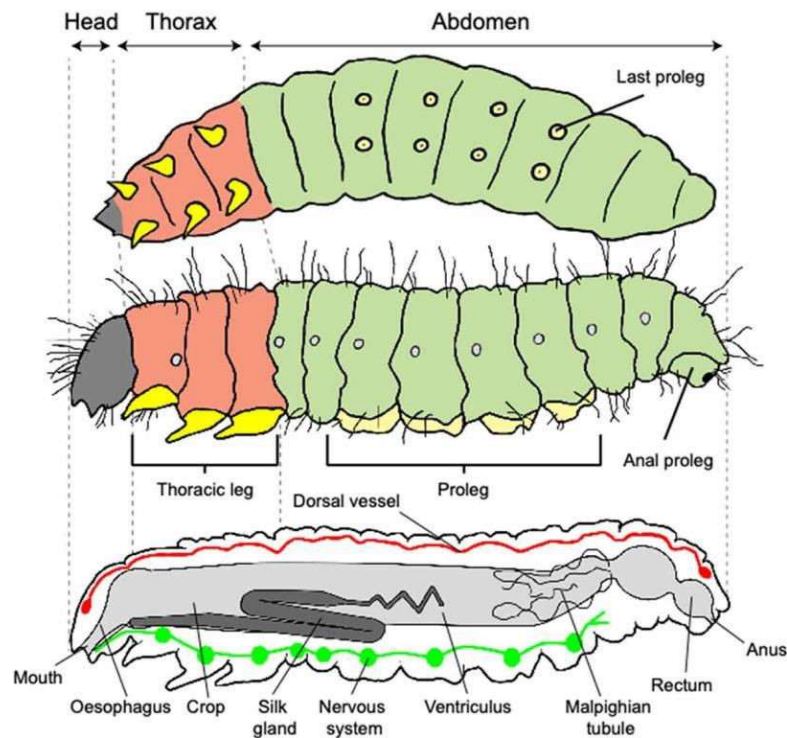
O ciclo reprodutivo da *G. mellonella* começa com a postura das fêmeas de 50 a 150 ovos agrupados, cuja duração da eclosão depende da temperatura, com melhor desenvolvimento observado em temperaturas mais quentes. Os ovos são capazes de eclodir influenciados pela temperatura, com duração entre 3 e 30 dias. As larvas medem 1-23 mm, exibindo cor branco-creme com uma cabeça avermelhada que escurece à medida que crescem através de 8 a 10 instares. As larvas têm três partes anatômicas – cabeça, tórax e abdômen – compreendendo seis pernas torácicas e pró-patas no abdômen como observado na Figura 1.

O sistema tegumentar inclui uma cutícula e uma fina camada epitelial, enquanto a cavidade interna abriga o corpo gorduroso e a hemolinfa, coordenando a resposta imune e servindo como sistema circulatório larval. A região dorsal funciona como o “novo tecido imunológico”, enquanto a região ventral contém gânglios que constituem o sistema nervoso. O último ínstar larval produz seda para a formação do casulo, sinalizando o estágio pré-pupa.

As pupas, imobilizadas em casulos, sofrem alterações de cor do branco ao avermelhado escuro. As mariposas adultas variam em cor e são noturnas, abstendo-se de se alimentar.

Os machos, menores e mais leves que as fêmeas, têm uma vida útil mais longa de 21 dias em comparação com os 12 dias das fêmeas. (Ménard *et al.*, 2021^b). Seu sistema imune possui certa proximidade com o dos mamíferos sendo a resposta principalmente mediada por hemócitos e capaz de desenvolver a resposta com moléculas efetoras solúveis, os hemócitos estão predominantemente na hemolinfa, apesar de também poderem ser encontrados nos corpos gordurosos e ao redor do trato digestivo, estas células são capazes de migrar para o local da lesão e possuem características morfológicas, histológicas e funcionais específicas e podem ser isoladas *in vitro* para estudos de interação com patógenos (Senior; Titball, 2020; Lavine; Strand, 2002). Em 1987, Boman; Hultmark descreveram seis tipos celulares, prohemócitos, plasmatócitos, células granulares, coagulócitos, esfelurócitos e oenocitoides.

Figura 1 - Anatomia da *Galleria mellonella*



Fonte: Durieux *et al.*, 2021

O processo de fagocitose envolve primeiro o granulócito que através de opsoninas reconhecem o microrganismo responsáveis pela degranulação em seguida os plasmatócitos aderem ao patógeno, o processo de fagocitose completo inclui a produção de espécies reativas de oxigênio. (Kavanagh; Reeves 2004).

Os coagulócitos estão envolvidos no processo de coagulação que pode ser dividido em duas partes, a primeira envolve a polimerização de proteínas coaguláveis chamadas de lipoforinas, e o segundo processo é a cascata de coagulação derivada de hemócitos onde são liberados grânulos citoplasmáticos advindos das proteínas deste hemócitos (Kavanagh; Reeves 2004). Oenocitoides são células grandes e ovais que possui materiais cristalinos e microtúbulos no citoplasma, este tipo celular possui precursores de profenoloxidase, e as produzem constantemente além de não serem adesivos (Eleftherianos *et al.*, 2021). Os esferulócitos ou adipohemócitos são células da hemolinfa que possuem tamanhos variados estão envolvidos com fatores quimiotáticos, antibacterianos, aglomeração celular e encapsulamento.

Os Peptídeos Antimicrobianos (AMPs) desempenham um papel crucial na imunidade

inata/humoral de *G. mellonella* (traça da cera). Com um repertório de pelo menos 20 peptídeos, eles são amplamente distribuídos em diferentes órgãos e concentrações nas larvas, tanto não infectadas quanto infectadas.

Os AMPs podem ser categorizados em dois tipos principais: catiônicos e aniônicos. Os catiônicos, especialmente os α -helicoidais lineares, aqueles com pontes dissulfeto e os ricos em prolina e/ou glicina, são os mais caracterizados e predominantes na *G. mellonella*. Suas ações incluem a indução da lise bacteriana por vazamento iônico, envolvendo diferentes mecanismos, como a formação de poros na membrana citoplasmática (Wojda, 2017). Os AMPs apresentam amplo espectro antibacteriano, agindo sobre bactérias Gram-negativas, Gram-positivas ou fungos filamentosos. Além disso, os peptídeos aniônicos AP1 e AP2, membros conhecidos dos AMPs aniônicos, foram identificados na hemolinfa, com o AP2 demonstrando atividade constante, embora limitada contra *Micrococcus luteus* e leveduras. Essas descobertas destacam a diversidade e eficácia dos AMPs na resposta imunológica da *G. mellonella* (Brown *et al.*, 2009; Mak; Zdybicka-Barabas; Cytrynska, 2010).

Em relação a resposta imune humoral, estão presentes as opsoninas que são capazes de reconhecer e se ligar a componentes microbianos, a apolipoproteína-II (apoLpII) é uma molécula de transporte lipídico capaz de atuar como reconhecedora de padrões na resposta inata, esta proteína é descrita como ligante de LPS e ácido lipoteicoico, além de beta-1-3 glucano de fungos, influenciando no aumento de encapsulamento celular, e também é capaz de aumentar a atividade antibacteriana da hemolinfa induzindo a produção de superóxido por hemócitos e aumenta a produção de cecropina (Halwani; Niven; Dunphy, 2000; Tsai; Loh; Proft, 2015).

Os peptídeos antimicrobianos de *G. mellonella* compreendem um amplo espectro de atividade microbicida, um estudo de (Brown *et al.*, 2009) identificou 18 AMPs enquanto (Lee *et al.*, 2004) descreveu a Galleria defensina a partir de imunizações contra *E. coli*. A lisozima desempenha um papel na degradação do peptidoglicano da parede celular, realizando a hidrólise da ligação β -1,4 entre a N-acetilglucosamina e o ácido N-acetilmurâmico. Além de sua atividade enzimática, a lisozima de *G. mellonella* também exibe uma ação não enzimática contra fungos, de maneira semelhante aos peptídeos catiônicos de defesa. Embora o mecanismo exato não seja totalmente compreendido, sugere-se a possibilidade de um efeito sinérgico com o peptídeo aniônico 2 (AP2). As cecropinas e as moricinas são membros da família de Peptídeos Antimicrobianos (AMPs) α -helicoidais anfipáticos. Esses peptídeos têm a capacidade de penetrar nas paredes das células bacterianas, formando poros na membrana citoplasmática e, conseqüentemente, resultando em vazamento de íons. Peptídeos semelhantes

à moricina foram inicialmente identificados em *G. mellonella* por (Brown *et al.*, 2009) Esses AMPs demonstraram uma atividade particularmente robusta contra fungos filamentosos, destacando sua eficaz resposta imunológica da *G. mellonella*. (Brown *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2004).

1.4 Uso de *G. mellonella* em estudos de infecção e fatores de virulência.

A *G. mellonella* é um inseto pertencente aos lepidópteros, também conhecida como traça do mel, possui seu estágio larval que desperta bastante interesse na ciência devido a sua alta gama de possibilidades investigativas, como resposta imune gerada por hemócitos e peptídeos, descritos por alguns autores como uma resposta humoral da larva (Trevijano-Contador; Zagaroza, 2018; Pereira *et al.*, 2018). Apesar do modelo de animal utilizando camundongos ser bastante versátil, outra desvantagem é o custo da manutenção desses animais, as logísticas e legislações envolvidas em seu uso como citado anteriormente e variações genéticas em alguns estudos (Macholán, *et al.*, 2007).

Além disso, como alternativa ao tempo de infecção, ou exposição a drogas e camundongos, que em geral é prolongado, os pesquisadores procuram métodos alternativos que possam se mostrar mais eficazes em relação a estes ensaios (Brennan *et al.*, 2002; Smith; Casadevall, 2021). A *G. mellonella* possui dentre seus estágios de desenvolvimento o estágio larval gerando larvas de 1-3 cm de tamanho que podem ser facilmente manuseadas e utilizadas para estudos de mecanismos de patogenicidade fungica (Cotter; Doyle; Kavanagh, 2000; Singulani *et al.*, 2018; Singulani *et al.*, 2019). Existe uma relação enorme de publicações no *NCBI Pubmed* demonstrando a utilização deste modelo para estudos de doenças e cursos de infecções. (Singulani *et al.*, 2018; Bismuth; Aussel; Ezraty, 2019; Trevijano-Contador; Zagaroza, 2018; Kavanagh; Sheehan, 2018). (Mylonakis *et al.*, 2005) foi um dos pesquisadores que demonstrou a utilização desse modelo para estudo da interação fungo-hospedeiro de *C. neoformans* delineando resultados que mostravam o curso da patogênese no inseto com fatores de virulência do fungo e resposta imune inata. Além disso outros estudos fizeram uso deste modelo animal para investigação de interações envolvendo outros microrganismos como bactérias (Tsai; Loh; Proft, 2016).

Diversos autores validaram o modelo de *G. mellonella* comparando seus resultados com os do modelo murino, geralmente observando uma boa correlação. Estudos de fatores de virulência de fungos como *Mucor circinelloides*, espécies de *Fusarium* e *Candida albicans* foram conduzidos em *G. mellonella* e camundongos, revelando genes ativados para produzir virulência semelhante em larvas e camundongos imunodepletados. No entanto,

algumas discrepâncias foram observadas, como em estudos sobre a virulência de *C. albicans*, onde houve 50% de concordância entre resultados em camundongos e larvas.

Ao analisar mutantes de *Aspergillus fumigatus* em *G. mellonella*, cerca da metade das comparações mostrou boa correlação. Esses resultados sugerem semelhanças nos mecanismos de infecção fúngica entre os modelos de roedores e *G. mellonella*, embora as discrepâncias apontem para a influência do sistema imunitário adaptativo ausente nas larvas, perturbando a correspondência perfeita entre os dois tipos de modelos. Portanto, embora a maioria dos dados estejam bem correlacionada, os resultados em mamíferos podem diferir devido à interação com um sistema imunológico mais complexo do que o encontrado em insetos. (Durieux *et al.*, 2021).

O processo de melanização, desempenhando um papel crucial no sistema imunológico dos artrópodes, é ativado pela entrada de partículas estranhas no corpo da larva. A síntese de melanina, catalisada pela fenoloxidase, limita a disseminação de microrganismos através da formação de nódulos visíveis em cortes histológicos. Após a penetração de *A. fumigatus* na larva, ocorre um aumento na densidade de hemócitos nos estágios iniciais da infecção. No entanto, toxinas fúngicas, como a fumagilina e a gliotoxina, podem contrabalançar essa ação, inibindo os hemócitos. Com o tempo, *A. fumigatus* pode invadir larvas com hifas, resultando na formação de nódulos disseminados por todo o corpo da larva. Se o sistema imunológico controlar a infecção, a larva sobrevive; caso contrário, as larvas se tornam melanizadas e morrem.

Diversos fatores, como estresse físico, nutricional, térmico ou exposição a componentes da parede celular, podem influenciar a resposta imune das larvas. (Kavanagh; Sheehan, 2018 e Pereira *et al.*, 2018) recentemente descreveram a resposta imune das larvas de *G. mellonella* e os fatores que a influenciam. (Durieux *et al.*, 2021). Recentemente dentre os métodos de avaliação das características apresentadas pelas larvas durante estudos de infecção o score de saúde ou pontuação/índice de saúde, está sendo utilizado com o intuito de estabelecer avaliações multiparamétricas na interação fungo hospedeiro, esta tabela avalia diversas características como: formação de casulo, melanização, movimentação e vitalidade (Loh *et al.*, 2013), a Figura 2. apresenta as características gerais deste índice.

Figura 2 - Sistema de *score* de saúde em *Galleria mellonella*

Categoria	Descrição	Score
Atividade	Sem movimento	0
	Movimento mínimo sob estímulo	1
	Movimento sob estímulo	2
	Movimento sem estímulo	3
Formação de casulo	Casulo ausente	0
	Casulo parcial	0.5
	Casulo presente	1
Melanização	Completamente melanizada	0
	Pontos marrons na larva escurecida	1
	> 3 pontos marrons em larva bege	2
	< 3 pontos marrons em larva bege	3
	Ausência de melanização	4
Sobrevivência	Morta	0
	Viva	2

Fonte: Adaptado de Loh *et al.*, 2013

1.5 Técnica de imunização por mascaramento de epítipo

Em trabalhos desenvolvidos que estudaram o câncer, a análise e estudo de antígenos envolvidos no desencadeamento da doença e de sua progressão, é de extrema valia para o entendimento da biologia tumoral (Topalian; Drake; Pardoll, 2015).

Na busca por metodologias que possam contribuir na descoberta de novos biomarcadores tumorais ou até mesmo novos alvos terapêuticos, a técnica de imunização subtrativa tem se mostrado atraente, pois modula o sistema imune, ao passo de direcionar a geração de anticorpos contra epítipos raros, de baixa expressão, que podem possuir um papel relevante no estabelecimento de doenças, incluindo doenças infecciosas, auto-imunes e o próprio câncer (Almeida *et al.*, 2018^a; Almeida, *et al.*, 2018^b) O princípio da técnica é reduzir o número de antígenos dominantes, compartilhados entre ambas as células, direcionando a geração de anticorpos contra epítipos de interesse clínico (Almeida *et al.*, 2018^a; Almeida *et al.*, 2018^b).

Nesse sentido, outras técnicas também foram desenvolvidas a partir da imunização subtrativa, incluindo a imunização por mascaramento de epítipos, que busca bloquear previamente epítipos específicos ou compartilhados por dois constituintes semelhantes, com o uso de anticorpos dirigidos a estes e possibilitar a geração de resposta imune somente contra epítipos que estão expostos, que são passíveis de serem enxergados pelo sistema

imune do animal, especialmente àqueles de baixa dominância e imunogenicidade (Hodgins; Shewen, 2012; Bassani-Sternberg; Coukos, 2016; Zarnitsyna, *et al.*, 2016; Bowdish *et al.*, 2009). (Beekman *et al.*, 2018), relata componentes já presentes em fungos como *Aspergillus fumigatus* como hidrofobinas e melanina que possuem um efeito natural de mascarar epitopos de e ainda assim ativar a melanização da larva, porém gerando uma resposta mais fraca do que quando infectadas com a bactéria *P. destructans*, preservando a viabilidade do animal.

1.6 Digestão de anticorpos

As enzimas proteolíticas têm sido utilizadas no estudo da estrutura de imunoglobulinas desde 1902. Atualmente, diversos kits comerciais permitem a clivagem de anticorpos utilizando pepsina. Sob condições altamente ácidas ($\text{pH} \leq 2$), a pepsina é capaz de gerar fragmentos F(ab')_2 , eliminando a porção Fc e mantendo a ligação entre duas estruturas Fab' . Além disso, a pepsina frequentemente cliva o terminal C de leucina (L), fenilalanina (F), tirosina (Y) e triptofano (W), gerando subprodutos inativos de baixo peso molecular (Jones; Landon, 2003; Imray, 1902; Tsiatsiani e Heck, 2015).

Na imunoterapia, um avanço recente envolve o uso de fragmentos Fab , gerados pela digestão de IgG com a enzima vegetal papaína, no tratamento de envenenamentos por serpentes. Esses fragmentos Fab possuem vantagens em relação ao F(ab')_2 , como a ausência de reações de hipersensibilidade do tipo III, devido à sua ligação univalente ao antígeno, o que impede a formação de grandes complexos imunes.

Além disso, apresentam maior distribuição nos tecidos e cinética mais rápida, sendo ideais para neutralizar venenos de baixo peso molecular, como neurotoxinas encontradas em venenos de elapídeos. Embora o F(ab')_2 seja eficaz em configurações experimentais, sua eficácia clínica é limitada contra neurotoxinas pré-sinápticas. Já os fragmentos Fab , com sua rápida ação, são mais adequados para tratar envenenamentos graves, incluindo necroses, antes da hospitalização. A digestão com papaína, ao remover a região Fc , reduz o peso molecular dos fragmentos Fab , aumentando sua difusão através de barreiras biológicas. Apesar de serem eliminados rapidamente pelos rins, os fragmentos Fab' apresentam potencial como antivenenos mais eficientes, exigindo doses menores (Theakston; Smith, 1977).

O estudo de Parke; Avis (1964) investigou o impacto da digestão enzimática com papaína e pepsina na atividade antitóxica de anticorpos de coelho direcionados contra as toxinas α e ϵ de *Clostridium welchii*. Os resultados indicaram que a digestão com papaína pode reduzir a atividade antitóxica em até 50%, enquanto a digestão parcial com pepsina não afetou significativamente essa atividade. Além disso, a interação com soro anti-globulina

umentou a atividade antitóxica das globulinas digeridas. Os autores sugerem que essas alterações na atividade estão relacionadas a mudanças no tamanho efetivo das moléculas antitóxicas, influenciando a inibição estérica das toxinas.

Os anticorpos e seus fragmentos ativos são amplamente utilizados em diversas aplicações médicas e clínicas, incluindo diagnósticos, terapias, biossensores e processos de purificação por afinidade. Fragmentos de anticorpos podem ser obtidos por meio da clivagem da molécula de anticorpo usando enzimas proteolíticas como pepsina, papaína, tripsina, elastase, bromelaína e ficina. Algumas proteases, como clostripaina, lisil endopeptidase, metaloendopeptidase e protease V8, são alegadamente mais específicas de substrato do que pepsina e papaína. De particular interesse é a aplicação de anticorpos policlonais como antivenenos para envenenamentos que ocorrem amplamente nas regiões tropicais de quatro continentes (África, Ásia, Austrália e Américas). Os antivenenos constituem a única solução conhecida para essas lesões.

Por serem extraídos de soros hiperimunes de animais, são muito eficazes na neutralização dos efeitos do veneno devido às suas características poliespecíficas, que lhes permitem reconhecer e neutralizar diferentes epítomos ou determinantes antigênicos na molécula do veneno. Inicialmente administrados como soro integral, os antivenenos progrediram para formulações mais seguras nos formatos Fab ou $F(ab')_2$, obtidos por meio da clivagem da molécula de anticorpo com enzimas proteolíticas como papaína e pepsina.

Recentemente, demonstrou-se que a pepsina é adequada para a digestão de soro integral para formar $F(ab')_2$, além de fragmentos de baixo peso molecular de outras proteínas do soro, enquanto a tripsina mostrou-se inadequada para tal processo. Além disso, a digestão da IgG pela pepsina resulta em uma molécula de ligação antigênica divalente $F(ab')_2$ e elimina a porção Fc, responsável por efeitos colaterais quando administrada com antitoxinas no formato de IgG integral. Ao contrário da papaína, a pepsina digere o fragmento Fc e outros componentes do soro em moléculas de baixo peso molecular (13 kDa), preservando a atividade de ligação antigênica. (Boushaba; Kumpalume; Slater, 2003)

O fragmento divalente $F(ab')_2$ resultantes da digestão com pepsina beneficiam-se de tempos de retenção mais longos nos tecidos do hospedeiro devido ao seu peso molecular ser maior que o limiar renal, ao contrário do fragmento Fab univalente resultante da digestão com papaína. Assim, as antitoxinas $F(ab')_2$ são mais seguras do que as antitoxinas IgG, mais avidas e tenazes do que as antitoxinas Fab, sendo mais bem toleradas pelos pacientes e exibindo farmacocinética otimizada. A digestão de soro integral é vista como um processo econômico,

simples e seguro para a fabricação de antivenenos, em comparação com a digestão tradicional de IgG purificada.

O processo de digestão de soro integral com pepsina para gerar $F(ab')_2$ é uma etapa crítica em que o soro é tratado diretamente com a enzima após extração do sangue hiperimune de ovinos por centrifugação. O soro hiperimune contém uma variedade de proteínas, sendo as principais a albumina e as IgG. A digestão direta de soro integral, em vez de IgG purificada, é mais atraente do ponto de vista econômico, pois evita a etapa preliminar de purificação de IgG. No entanto, tal modificação não pode ser implementada sem uma análise comparativa dos produtos de digestão resultantes do processamento de soro integral e IgG pura. Este estudo descreve a cinética de digestão de soro integral e IgG pura, avaliada por análise densitométrica de géis de eletroforese em *SDS-PAGE*. O método permitiu seguir com precisão a digestão de IgG com pepsina, além de avaliar simultaneamente a pureza do produto $F(ab')_2$.

Utilizando anticorpos anti-Fc de ovelha, a técnica proporcionou uma análise prática e relativamente rápida. O estudo utiliza anticorpos anti-FITC de ovelha como modelo para antivenenos, sendo um modelo adequado para investigar rotas de fabricação de antivenenos. (Boushaba; Kumpalume; Slater, 2003).

1.7 Criptococose

A criptococose é uma doença causada pelo complexo *C. neoformans*, atualmente composto por duas espécies (*C. neoformans* e *Cryptococcus gatti*) (Consenso de Criptococose, 2006; Moretti *et al.*, 2008).

A principal causa de morte pela doença é a meningoencefalite, além disso, em vertentes de infecção crônica, a doença pode gerar compressão física do tecido e defeitos na reabsorção do líquido cefalorraquidiano devido ao aumento da viscosidade do líquido em consequência da quantidade de polissacarídeos produzidos (Spil, *et al.*, 2015; Casadevall; Coelho; Alanio, 2018).

A mortalidade por criptococose é estimada em 10% nos países desenvolvidos, chegando a 43% nos países em desenvolvimento como a Tailândia, exibindo um tempo médio de sobrevivência de 14 dias. O curso da doença tem como alvo as células macrofágicas que predisõem o aumento da carga fúngica, frente aos mecanismos de virulência desencadeados pelas leveduras, incluindo a formação do fagolisossomo dentro do macrófago, que permite a sobrevivência e proliferação do agente patogênico, sendo esse fator o auxílio na persistência da infecção (Kon *et al.*, 2008; Gibson; Johnston, 2015). Ademais, uma das mais relevantes

problemáticas da doença é a resistência aos antifúngicos disponíveis para seu tratamento, e plasticidade genética, citada como um fator para a persistência da meningite causada pelo fungo (Zafar *et al.*, 2019).

Outro fator clássico de característica morfológica desse fungo é sua grande cápsula que envolve a parede celular da célula fúngica e também se enquadra como principal fator de virulência do mesmo, além de ser peça chave no diagnóstico da doença em exames diretos usando tinta nanquim a partir do líquido coletado, a produção de melanina atua em conjunto como fator de virulência, e como forma de resistência para sobreviver as adversidades do ambiente o fungo ainda é capaz de aumentar e alterar sua cápsula (Casadevall *et al.*, 2019; Trevijano-Contador *et al.*, 2015).

Durante o desenvolvimento de estudos que possuíam a finalidade de diagnosticar e tratar a doença em 1998 foi caracterizado um anticorpo monoclonal murino que até os dias atuais é amplamente utilizado o 18B7, durante sua validação o anticorpo foi capaz de se ligar a todos os quatro sorotipos de *C. neoformans*, e também de opsonizar alguns através da reação de deposição do complemento (Casadevall *et al.*, 1998). Posteriormente foi investigado qual a atividade que este anticorpo poderia exercer diante do fungo, então foram descritas atividade hidrolítica do anticorpo contra substratos de oligossacarídeos e contra a própria cápsula fúngica, esse mecanismo acontece através da quebra de pelo menos duas ligações glicosídicas, a consequência desta ação é a detecção de altos níveis de GXM livre (Bowen *et al.*, 2017).

1.8 Hipótese

Com a contextualização abordada, a ideia presente neste projeto baseia-se no uso da técnica de mascaramento de epítopos em leveduras causadoras da criptococose e o bloqueio de epítopos dominantes deste fungo com o anticorpo 18B7 (anti-GXM - Anti-Glucuronoxylomannan) seguido de sua inoculação em modelo alternativo de *G. mellonella*. Pretende-se verificar se a levedura com seus epítopos bloqueados é capaz de mudar a composição de aminoácidos presentes em peptídeos produzidos por *G. mellonella*. Os produtos da imunidade deste animal, em especial, os peptídeos presentes na hemolinfa, podem possuir alguma atividade frente a antígenos ocultos, de baixa imunogenicidade deste fungo e que poderiam ter papel relevante na virulência do patógeno e até mesmo servirem como novos biomarcadores da doença (Singulani *et al.*, 2018; Almeida *et al.*, 2018^a; Almeida, *et al.* 2018^b).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Principal

Estudar a resposta do sistema de defesa da *G. mellonella* frente a leveduras de *C. neoformans* cepa H99 com epítomos bloqueados pelo anticorpo 18B7 e não bloqueados (célula inteira sem tratamento com anticorpo), utilizando a técnica de mascaramento de epítomos, estudando o papel dos peptídeos gerados a partir da inoculação das leveduras nestas condições.

2.2 Objetivos Específicos

- Implementar a obtenção de fragmentos do tipo F(ab')₂ por digestão enzimática utilizando métodos convencionais e não convencionais, para utilização em estudos de bloqueio de epítomos independentes da porção Fc.
- Realizar a imunização/infecção de *G. mellonella* com leveduras de *C. neoformans* previamente tratadas com anticorpo comercial anti-antígeno capsular GXM nas condições de antígenos bloqueado com a molécula de IgG e ausência de antígenos utilizando cepa mutante de cápsula cap67.
- Verificar a possível atividade antimicrobiana de peptídeos gerados a partir de técnica de mascaramento de antígeno, e analisar a eficácia destas moléculas em contraposição aos peptídeos que serão produzidos sem o uso da técnica.

5. CONCLUSÕES

- A otimização do processo de digestão enzimática utilizando pepsina, tanto em métodos livres quanto imobilizados, possibilitou a obtenção eficaz de fragmentos F(ab')₂, essenciais para o bloqueio de epítomos.
- O modelo de *G. mellonella* demonstrou ser eficaz na análise de respostas imunológicas e interações fungo-hospedeiro diante dos desafios imunológicos impostos, através da produção de proteínas de baixo peso molecular.
- A técnica de mascaramento permitiu investigar alterações na resposta imunológica através do bloqueio de antígenos de *C. neoformans*, abrindo caminho para a identificação de novos alvos.
- A modificação de meios de cultura afetou a virulência de *C. neoformans* e a sobrevivência de *G. mellonella*, evidenciando a influência do ambiente nutricional nos fatores de virulência fúngica.
- A análise do perfil proteico da hemolinfa indicou a presença de proteínas e polipeptídeos que podem ser explorados em terapias antifúngicas.
- O estudo contribuiu para a compreensão da complexidade da resposta imunológica e propõe novos métodos para explorar biomarcadores e estratégias terapêuticas antifúngicas.

REFERÊNCIAS

- ANDREJKO, M. Effect of *Pseudomonas aeruginosa* crude proteolytic fraction on antibacterial activity of *Galleria mellonella* haemolymph. **Folia Biologica-Krakow-**, v. 52, p. 91-96, 2004.
- ANDREJKO, M.; MIZERSKA-DUDKA, M.; JAKUBOWICZ, T. Antibacterial activity in vivo and in vitro in the hemolymph of *Galleria mellonella* infected with *Pseudomonas aeruginosa*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 152, n. 2, p. 118–123, 1 fev. 2009. Pmid:18996217.
- ANDREJKO, M; MIZERSKA-DUDKA, M; JAKUBOWICZ, T. Antimicrobial peptides of *Galleria mellonella* degraded in vitro and in vivo by *Pseudomonas aeruginosa* protease B. **Acta Biochimica Polonica**, v. 54, n. Supplement 4, 2007.
- DE ARAUJO, A. E. V. *et al.* Production and characterization of F(ab')₂ fragments obtained by enzymatic digestion from murine anti-MRSA PBP2a monoclonal antibodies. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 185, p. 72–80, 2018.
- BASSANI-STERNBERG, M.; COUKOS, G. Mass spectrometry-based antigen discovery for cancer immunotherapy. **Current Opinion in Immunology**, v. 41, p. 9–17, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.coi.2016.04.005>. Acesso em: 25 nov. 2024.
- BEEKMAN, C. N. *et al.* *Galleria mellonella* as an insect model for *P. destructans*, the cause of white-nose syndrome in bats. **PLOS ONE**, v. 13, n. 9, p. e0201915, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201915>. Acesso em: 25 nov. 2024.
- BISMUTH, H.; AUSSEL, L.; EZRATY, B. The greater wax moth, *Galleria mellonella* to study host-pathogen interactions. **Medicine Sciences: M/S**, v. 35, n. 4, p. 346, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1051/medsci/2019071>. Acesso em: 25 nov. 2024.
- BOJARCZUK, A. *et al.* *Cryptococcus neoformans* intracellular proliferation and capsule size determines early macrophage control of infection. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 21489, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep21489>. Acesso em: 25 nov. 2024.
- BOMAN, H. G.; HULTMARK, D. Cell-free immunity in insects. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 41, n.1, p. 103–126, 1987. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.41.100187.000535>. Acesso em: 25 nov. 2024.
- BONDT, A. *et al.* Immunoglobulin G (IgG) Fab glycosylation analysis using a new mass spectrometric high-throughput profiling method reveals pregnancy-associated changes. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 13, n. 11, p. 3029–3039, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/mcp.M114.039537>. Acesso em: 25 nov. 2024.
- BOUSHABA, R; KUMPALUME, P; SLATER, N. K. H. Kinetics of whole serum and prepurified IgG digestion by pepsin for F(ab')₂ manufacture. **Biotechnology Progress**, v. 19, n. 4, p. 1176–1182, 2003. Pmid:12892479.
- BOWDISH, K. S. *et al.* Antibodies against cancer produced using masked cancer cells as immunogen. **U.S. Patent n. 7,598,030**, 6 out. 2009.

BOWEN, A. *et al.* A monoclonal antibody to *Cryptococcus neoformans* lucuronoxylomannan manifests hydrolytic activity for both peptides and polysaccharides. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 2, p. 417–434, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.767582>. Acesso em: 25 nov. 2024.

BRASIL. Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Estabelece procedimentos para o uso científico de animais. **Diário Oficial da União: seção 1**, Brasília, DF, 9 out. 2008. Disponível em: <https://www.planalto.gov.br>. Acesso em: 16 nov. 2024.

BRENNAN, M. *et al.* Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 153–157, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0928-8244\(02\)00374-7](https://doi.org/10.1016/S0928-8244(02)00374-7). Acesso em: 25 nov. 2024.

BREZSKI, Randall J.; JORDAN, Robert E. Cleavage of IgGs by proteases associated with invasive diseases: an evasion tactic against host immunity?. In: **MABs**. Taylor & Francis, 2010. p. 212–220. Disponível em: <https://doi.org/10.4161/mabs.2.3.11780>. Acesso em: 25 nov. 2024.

BROWN, S. E.; A.; KASPRZAK, A. B.; GORDON, K. H.; EAST, P. D. A peptidomics study reveals the impressive antimicrobial peptide arsenal of the wax moth *Galleria mellonella*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 39, n. 11, p. 792–800, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2009.09.004>. Acesso em: 23 nov. 2024.

BRUNELLE, J. L.; GREEN, R. Standardization of a western blot imaging system with fishersci-protein. **Analytical Biochemistry**, v. 30, n. 44, p. 1123–1128, 2014.

BRYAN, A. M. *et al.* Macrophage cholesterol depletion and its effect on the phagocytosis of *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Visualized Experiments: JoVE**, n. 94, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3791/52432>. Acesso em: 25 nov. 2024.

BUHEGGER, F. *et al.* Different behaviour of mouse-human chimeric antibody F(ab')₂ fragments of IgG1, IgG2 and IgG4 sub-class in vivo. **International Journal of Cancer**, v. 50, n. 3, p. 416–422, jan. 1992. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ijc.2910500316>. Acesso em: 25 nov. 2024.

CARTON, Y. Louis Pasteur face à la maladie du ver à soie (1865–1870): du chimiste au biologiste. **Comptes Rendus. Chimie**, v. 25, p. 315–340, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.5802/crchim.204>. Acesso em: 25 nov. 2024.

CASADEVALL, A. *et al.* Characterization of a murine monoclonal antibody to *Cryptococcus neoformans* polysaccharide that is a candidate for human therapeutic studies. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 6, p. 1437–1446, 1 jun. 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AAC.42.6.1437>. Acesso em: 25 nov. 2024.

CASADEVALL, A. *et al.* The capsule of *Cryptococcus neoformans*. **Virulence**, v. 10, n. 1, p. 822–831, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/21505594.2018.1431087>. Acesso em: 25 nov. 2024.

CHANG, Y. C.; KWON-CHUNG, K. J. Isolation and characterization of *Cryptococcus*

neoformans mutants deficient in capsule biosynthesis. **Current Genetics**, v. 25, n. 4, p. 299–304, 1981.

CHILDS, B. G. *et al.* Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. **Nature Medicine**, v. 21, n. 12, p. 1424–1435, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nm.4000>. Acesso em: 25 nov. 2024.

CHRISTENSEN, W. B. Urea decomposition as a means of differentiating *Proteus* and paracolon cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella* types. **Journal of Bacteriology**, v. 52, n. 5, p. 461–466, 1946. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/jb.52.4.461-466.1946>. Acesso em: 25 nov. 2024.

COTTER, Gary; DOYLE, Sean; KAVANAGH, Kevin. Development of an insect model for the in vivo pathogenicity testing of yeasts. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 27, n. 2, p. 163–169, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2000.tb01427.x>. Acesso em: 25 nov. 2024.

CRAWFORD, L. A. *et al.* Investigating the capsule as a virulence determinant in *Cryptococcus neoformans* infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 234, 2020.

CYTRYŃSKA, M. *et al.* Purification and characterization of eight peptides from *Galleria mellonella* immune hemolymph. **Peptides**, v. 28, n. 3, p. 533–546, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2006.11.010>. Acesso em: 25 nov. 2024.

DAVID, M. P.; CHINO, F.; REISFIELD, R. A. Preparation and properties of cyanogen bromide-activated Sepharose. **The Journal of Immunology**, v. 112, n. 6, p. 2005–2011, 1974.

DE ALMEIDA, R. *et al.* Multiple tolerization reduces antibody binding against tolerogen cells: implications for the production of monoclonal antibodies. **Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy**, v. 37, n. 2, p. 100–104, 2018a. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/mab.2017.0055>. Acesso em: 25 nov. 2024.

DE ALMEIDA, R. Enhanced immunization techniques to obtain highly specific monoclonal antibodies. In: **MAbs**. Taylor & Francis, 2018b. p. 46–54. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/19420862.2017.1331804>. Acesso em: 25 nov. 2024.

DE LIMA FONTES, M. *et al.* Multiple Tolerization Subtractive Immunization (MTSI) Protocol: Effects on Mice and Monoclonal Antibody Specificity. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 7 dez. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.760817>. Acesso em: 25 nov. 2024.

DURIEUX, M.-F. *et al.* *Galleria mellonella* as a screening tool to study virulence factors of *Aspergillus fumigatus*. **Virulence**, v. 12, n. 1, p. 818–834, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1893945>. Acesso em: 25 nov. 2024.

DYLAG, M.; COLON-REYES, R.; KOZUBOWSKI, L. Fetal bovine serum-triggered Titan cell formation and growth inhibition are unique to the *Cryptococcus* species complex. **bioRxiv**, 435842, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/435842>. Acesso em: 25 nov.

2024.

ELEFThERIANOS, I. *et al.* Haemocyte-mediated immunity in insects: Cells, processes and associated components in the fight against pathogens and parasites. **Immunology**, v. n 164, n. 3, p. 401–432, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/imm.13390>. Acesso em: 25 nov. 2024.

F. Q. SMITH, D.; CASADEVALL, A. Fungal immunity and pathogenesis in mammals versus the invertebrate model organism *Galleria mellonella*. **Pathogens and Disease**, v. 79, n. 3, 5 fev. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/femspd/ftab013>. Acesso em: 25 nov. 2024.

FAN, W. *et al.* Eca1, a Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase, is involved in stress tolerance and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 7, p. 3394–3405, 1 jul. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/IAI.01977-06>. Acesso em: 25 nov. 2024.

FIRACATIVE, C. *et al.* Rearing and maintenance of *Galleria mellonella* and its application to study fungal virulence. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 3, p. 130, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jof6030130>. Acesso em: 25 nov. 2024.

FREGONEZI, N. F. *et al.* Heat shock protein 60, insights to its importance in *Histoplasma capsulatum*: From biofilm formation to host-interaction. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 591950, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.591950>. Acesso em: 25 nov. 2024.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Sancionada a lei que estabelece procedimentos para o uso de animais em pesquisa científica. **Agência Fiocruz de Notícias**, 2008. Disponível em: <https://agencia.fiocruz.br/sancionada-a-lei-que-estabelece-procedimentos-para-o-uso-de-animais-em-pesquisa-cient%C3%ADfica>. Acesso em: 20 nov. 2024.

GIBSON, J. F.; JOHNSTON, S. A. Immunity to *Cryptococcus neoformans* and *C. gattii* during cryptococcosis. **Fungal Genetics and Biology**, v. 78, p. 76–86, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.11.006>. Acesso em: 25 nov. 2024.

GOLDMAN, D. L. *et al.* Persistent *Cryptococcus neoformans* pulmonary infection in the rat is associated with intracellular parasitism, decreased inducible nitric oxide synthase expression, and altered antibody responsiveness to cryptococcal polysaccharide. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 2, p. 832–838, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/IAI.68.2.832-838.2000>. Acesso em: 25 nov. 2024.

GOLDSTEIN, N. I.; FISHER, P. B. Surface-Epitope Masking (SEM). **Cancer Genomics and Proteomics**, p. 245–258, 2007. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-59745-335-6_16. Acesso em: 25 nov. 2024.

GRANGER, D. L.; CALL, D. M. Combination of nutrients in a mammalian cell culture medium kills cryptococci. **Medical Mycology**, v. 57, n. 3, p. 374–383, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/mmy/myy040>. Acesso em: 25 nov. 2024.

HORIANOPOULOS, L. C.; KRONSTAD, J. W. Connecting iron regulation and

mitochondrial function in *Cryptococcus neoformans*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 52, p. 7–13, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.04.002>. Acesso em: 25 nov. 2024.

GUIMARÃES, M. V.; FREIRE, J. E. C.; MENEZES, L. M. B. Utilização de animais em pesquisas: breve revisão da legislação no Brasil. **Revista Bioética**, v. 24, n. 2, p. 217–224, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1983-80422016242121>. Acesso em: 25 nov. 2024.

HALWANI, A. E.; NIVEN, D. F.; DUNPHY, G. B. Apolipoprotein-III and the interactions of lipoteichoic acids with the immediate immune responses of *Galleria mellonella*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 76, n. 4, p. 233–241, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1006/jipa.2000.4978>. Acesso em: 25 nov. 2024.

HARDING, C. R. *et al.* Use of *Galleria mellonella* as a model organism to study *Legionella pneumophila* infection. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 81, p. e50964, 2013.
HODGINS, D. C.; SHEWEN, P. E. Vaccination of neonates: problem and issues. *Vaccine*, v. 30, n. 9, p. 1541–1559, 2012.

HOMAEI, A. Biochemical applications of immobilized enzymes. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, p. 1131–1147, 2015.

HWANG, J., KIM, Y. (2011). RNA interference of an antimicrobial peptide, gloverin, of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*, enhances susceptibility to *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Invertebrate Pathology**, 108(3), 194-200.

IMRAY, O. A process for removing albumin from bacterial and animal antitoxines and toxines. **Br. Patent No. 18,340**, 1902.

INOUE, O. Pepsin digestion of a mouse monoclonal antibody of IgG1 class formed F(ab')₂ fragments in which the light chains as well as the heavy chains were truncated. **Journal of Biochemical Biophysical Methods**, v. 48, n. 1, p. 23, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0165-022X\(00\)00141-X](https://doi.org/10.1016/S0165-022X(00)00141-X). Acesso em: 25 nov. 2024.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA. Treinamento aborda métodos alternativos ao uso de animais em laboratório. **Inmetro**, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/inmetro/pt-br/centrais-de-conteudo/noticias/treinamento-aborda-metodos-alternativos-ao-uso-de-animais-em-laboratorio>. Acesso em: 20 nov. 2024.

ISBISTER, G. K. *et al.* Population pharmacokinetics of an Indian F(ab')₂ snake antivenom in patients with Russell's viper (*Daboia russelii*) bites. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 7, p. e0003873, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003873>. Acesso em: 25 nov. 2024.

JACOBSON, E. S.; GOODNER, A. P.; NYHUS, K. J. Ferrous Iron Uptake in *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 9, p. 4169–4175, 1 set. 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/.66.9.4169-4175.1998>. Acesso em: 25 nov. 2024.

JAQUET, H.; CEBRA, J. J. Comparison of two precipitating derivatives of rabbit antibody: fragment I dimer and the product of pepsin digestion. **Biochemistry**, v. 4, n. 5, p. 954–963,

1965. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/bi00881a024>. Acesso em: 25 nov. 2024.

JESUS, M. D. *et al.* Capsule structure and function in *Cryptococcus neoformans*. **Trends in Microbiology**, v. 18, n. 8, p. 387–392, 2010.

JONES, R. G. A.; LANDON, J. A protocol for ‘enhanced pepsin digestion’: a step by step method for obtaining pure antibody fragments in high yield from serum. **Journal of Immunological Methods**, v. 275, n. 1–2, p. 239–250, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(03\)00005-X](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(03)00005-X). Acesso em: 25 nov. 2024.

JORJÃO, A. L. *et al.* From moths to caterpillars: Ideal conditions for *Galleria mellonella* rearing for in vivo microbiological studies. **Virulence**, v. 9, n. 1, p. 383–389, 2018. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5955185/>. Acesso em: 20 nov. 2024.

KAPOOR, K. N. *et al.* Estimation of peptide concentration by a modified bicinchoninic acid assay. **Analytical Biochemistry**, v. 393, n. 1, p. 138–140, out. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.06.016>. Acesso em: 25 nov. 2024.

KAVANAGH, K.; REEVES, E. P. Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 28, n. 1, p. 101–112, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2003.09.002>. Acesso em: 25 nov. 2024.

KAVANAGH, K.; SHEEHAN, G. The use of *Galleria mellonella* larvae to identify novel antimicrobial agents against fungal species of medical interest. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 3, p. 113, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jof4030113>. Acesso em: 25 nov. 2024.

KAVRAN, J. M.; LEAHY, D. J. Practical guide to methods of analysis for protein-ligand interactions. **Analytical Chemistry**, v. 87, n. 1, p. 75–85, 2015.

KAVRAN, J. M.; LEAHY, D. J. Coupling antibody to cyanogen bromide- activated sepharose. **Methods in Enzymology**, v. 541, p. 27, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420119-4.00003-3>. Acesso em: 25 nov. 2024.

KIM, B. S. *et al.* Characterization and immunological analysis of ferritin from the hemolymph of *Galleria mellonella*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 129, n. 2–3, p. 501–509, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(01\)00287-2](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(01)00287-2). Acesso em: 25 nov. 2024.

KIM, C. H. *et al.* Purification and cDNA cloning of a cecropin-like peptide from the great wax moth, *Galleria mellonella*. **Molecules & Cells**, v. 17, n. 2, p. 162–169, 2004. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1016-8478\(23\)13036-6](https://doi.org/10.1016/S1016-8478(23)13036-6). Acesso em: 25 nov. 2024.

KINMAN, A. W.; POMPANO, R. R. Protein digestion and sample preparation for proteomics analysis. **Journal of Proteomics**, v. 213, n. 3, p. 111–120, 2019a.

KINMAN, A. W. L.; POMPANO, R. R. Optimization of enzymatic antibody fragmentation for yield, efficiency, and binding affinity. **Bioconjugate Chemistry**, v. 30, n. 3, p. 800–807,

2019b. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00912>. Acesso em: 25 nov. 2024.

KIRLEY, T. L.; GREIS, K. D.; NORMAN, A. B. Selective disulfide reduction for labeling and enhancement of Fab antibody fragments. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 480, n. 4, p. 752–757, 25 nov. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.10.128>. Acesso em: 25 nov. 2024.

KLEIN, B. S. *et al.* Melanin and pathogenesis in fungi. **Current Topics in Medical Mycology**, v. 2, p. 33-61, 2009.

KON, A. Satie *et al.* **Consenso em criptococose**–2008. 2008.

KORDACZUK, J. *et al.* Cationic protein 8 plays multiple roles in *Galleria mellonella* immunity. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 11737, 11 jul. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-15929-6>. Acesso em: 25 nov. 2024.

KUIPERS, B. J. H; GRUPPEN, H. Prediction of molar extinction coefficients of proteins and peptides using UV absorption of the constituent amino acids at 214 nm to enable quantitative reverse phase high-performance liquid chromatography– mass spectrometry analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 14, p. 5445-5451, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf070337l>. Acesso em: 25 nov. 2024.

KWON-CHUNG, K. J.; POLACHEK, I.; BENNETT, J. E. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* and var. *gattii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 10, n. 3, p. 535-537, 1980.

LAVINE, M. D.; STRAND, M. R. Insect hemocytes and their role in immunity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 32, n. 10, p. 1295-1309, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(02\)00092-9](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(02)00092-9). Acesso em: 25 nov. 2024.

LAWRENCE, D. A. *et al.* Immunoglobulins cytophilic for human lymphocytes, monocytes, and neutrophils. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 55, n. 2, p. 368-376, 1975. Disponível em: <https://doi.org/10.1172/JCI107940>. Acesso em: 25 nov. 2024.

LEE, W.-J.; ANSTEE, J. H. Purification and characterization of a male-specific protein in the hemolymph of *Galleria mellonella*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 1, p. 33-45, 1998.

LEE, Y. S. *et al.* Purification, cDNA cloning and expression of an insect defensin from the great wax moth, *Galleria mellonella*. **Insect Molecular Biology**, v. 13, n. 1, p. 65-72, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2004.00462.x>. Acesso em: 25 nov. 2024.

LIN, J. *et al.* Virulence factors in fungal pathogenesis. **Annual Review of Microbiology**, v. 75, p. 23-45, 2021a.

LIN, L. *et al.* *Cryptococcus neoformans* CAP10 gene regulates the immune response in mice. **Journal of Medical Mycology**, v. 31, n. 4, p. 101160, 2021b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2021.101160>. Acesso em: 25 nov. 2024.

- LOH, J. M. *et al.* Development of a novel health index scoring system for *Galleria mellonella* and its application to study fungal virulence. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 1- 12, 2013.
- LU, H. *et al.* Candidiasis: From cutaneous to systemic, new perspectives of potential targets and therapeutic strategies. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 199, p. 114960, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2023.114960>. Acesso em: 25 nov. 2024.
- MACCALLUM, D. M. Hosting the pathogen: animal models of fungal infection. **Virulence**, v. 3, n. 3, p. 329–331, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2012/363764>. Acesso em: 22 nov. 2024.
- MACHOLÁN, M. *et al.* Genetic variation and phylogeography of free-living mouse species (*genus Mus*) in the Balkans and the Middle East. **Molecular Ecology**, v. 16, n. 22, p. 4774-4788, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03526.x>. Acesso em: 25 nov. 2024.
- MAK, P.; ZDYBICKA-BARABAS, A.; CYTRYŃSKA, M. A different repertoire of *Galleria mellonella* antimicrobial peptides in larvae challenged with bacteria and fungi. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 34, n. 10, p. 1129-1136, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.dci.2010.06.005>. Acesso em: 23 nov. 2024.
- McFADDEN, D. C.; JESUS, M. D.; CASADEVALL, A. The impact of capsule architecture on fungal virulence. **Microbial Pathogenesis**, v. 41, n. 4, p. 156-165, 2006.
- MEAGHER, R. B. *et al.* DectiSomes: C-type lectin receptor-targeted liposomes as pan-antifungal drugs. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 196, p. 114776, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2023.114776>. Acesso em: 25 nov. 2024.
- MÉNARD, A. *et al.* Modulation of fungal virulence in alternative animal models. **PLoS Pathogens**, v. 17, n. 3, p. e1009457, 2021a.
- MÉNARD, G. *et al.* *Galleria mellonella* as a suitable model of bacterial infection: past, present and future. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 782733, 2021b. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.782733>. Acesso em: 25 nov. 2024.
- MIKULAK, E. *et al.* *Galleria mellonella* L. as a model organism used in biomedical and other studies. **Przegl Epidemiol**, v. 72, p. 57-73, 2018.
- MIMICA, M. J.; MARTINO, M. D. V.; PASTERNAK, J. MALDI-TOF MS in the clinical microbiology laboratory. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 49, n. 4, p. 256–259, ago. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1676-24442013000400004>. Acesso em: 25 nov. 2024.
- MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÕES. **Rede Nacional de Métodos Alternativos (Renama)**. Disponível em: <https://antigo.mctic.gov.br/mctic/opencms/ciencia/SEPED/Saude/renama/renama.html>. Acesso em: 20 nov. 2024.
- MORETTI, M. L. *et al.* Guidelines in cryptococcosis--2008. **Revista da Sociedade**

B brasileira de Medicina Tropical, v. 41, n. 5, p. 524, 2008.
Disponível em:

<https://doi.org/10.1590/S0037-86822008000500022>. Acesso em: 25 nov. 2024.

MUKHERJEE, J.; SCHARFF, M. D.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* infection can elicit protective antibodies in mice. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 10, p. 888-892, 1994.

MYLONAKIS, E. *et al.* *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis and antifungal drug efficacy. **Fungal Genetics and Biology**, v. 42, n. 5, p. 405-409, 2005.

MYLONAKIS, E.; CASADEVALL, A.; AUSUBEL, F. M. Exploiting amoeboid and non-vertebrate animal model systems to study the virulence of human pathogenic fungi. **PLoS Pathogens**, v. 3, n. 7, p. e101, 2007. Disponível em:

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030101>. Acesso em: 22 nov. 2024.

NEVES, F. M. L. Produção de anticorpos monoclonais para diagnóstico de paracoccidiodomicose causada por *Paracoccidioides lutzii*. 2019. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos) – **Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara**, 2019.

NISONOFF, A.; WISSLER, F. C.; LIPMAN, L. N. Properties of the major component of a peptic digest of rabbit antibody. **Science**, v. 132, n. 3441, p. 1770-1771, 1960. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.132.3441.1770>. Acesso em: 25 nov. 2024.

O'MEARA, T. R.; ALSPAUGH, J. A. The *Cryptococcus neoformans* Capsule: a Sword and a Shield. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 3, p. 387-408, 1 jul. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/CMR.00001-12>. Acesso em: 25 nov. 2024.

PARKE, A.; AVIS, H. A. The influence of enzymic digestion on the antitoxic activity of rabbit antibodies against *Clostridium welchii* toxins. **Journal of Experimental Medicine**, v. 119, n. 2, p. 227-238, 1964. Disponível em: <https://doi.org/10.1084/jem.119.2.227>. Acesso em: 23 nov. 2024.

PASTERNAK, J. New methods of microbiological identification using MALDI-TOF. *Einstein (São Paulo)*, v. 10, n. 1, p. 118-119, mar. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1679-45082012000100026>. Acesso em: 25 nov. 2024.

PEREIRA, T. C. *et al.* Recent advances in the use of *Galleria mellonella* model to study immune responses against human pathogens. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 4, p. 128, 2018.

PERFECT, J. R. *Cryptococcus neoformans*: the yeast that likes it hot. **FEMS Yeast Research**, v. 5, n. 1, p. 1-9, 2005a.

PERFECT, J. R. *Cryptococcus neoformans*: a sugar-coated killer with designer genes. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 395-404, 2005b. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jof4040128>. Acesso em: 25 nov. 2024.

PERKINS, J. C.; HAHN, J. J. Enhancement of phagocytosis of group A streptococci by

antibody fragments derived from rabbit immunoglobulin by pepsin digestion. *The Journal of Immunology*, v. 100, n. 4, p. 898-901, 1968. Disponível em: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.100.4.898>. Acesso em: 25 nov. 2024.

PIRES, A. C. M. Avaliação da influência dos micronutrientes metálicos Ferro e Zinco na formação do biofilme e na virulência de *Histoplasma capsulatum*. 2018. 118 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – **Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"**, 2018. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/items/e304de05-7b88-4f18-9310-7480a03ee045>. Acesso em: 18 nov. 2024.

PINOS, D., ANDRÉS-GARRIDO, A., FERRÉ, J., & Hernández-Martínez, P. (2021). Response mechanisms of invertebrates to *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 85(1), 10-1128.

RENAMA (Rede Nacional de Métodos Alternativos). 09 de abril de 2019. Disponível em: <https://www4.inmetro.gov.br/node/3561#:~:text=A%20Renama%20%C3%A9%20um%20projeto,em%20atendimento%20%C3%A0%20Lei%20Arouca>. Acesso em: 07 set. 2020.

RUSSELL, W. M. S. *et al.* The principles of humane experimental technique. London: Methuen, 1959.

SCHEIDT, M. *et al.* Applications and limitations of mouse models for understanding human atherosclerosis. *Cell Metabolism*, v. 25, n. 2, p. 248-261, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.11.001>. Acesso em: 25 nov. 2024.

SCORZONI, L. *et al.* Antifungal efficacy during *Candida krusei* infection in non-conventional models correlates with the yeast *in vitro* susceptibility profile. *PLOS ONE*, v. 8, n. 3, p. e60047, 2013. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0060047>. Acesso em: 20 nov. 2024.

SCORZONI, L. *et al.* Comparison of virulence between *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii* using *Galleria mellonella* as a host model. *Virulence*, v. 6, n. 8, p. 766-776, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26552324/>. Acesso em: 20 nov. 2024.

SENIOR, N. J.; TITBALL, R. W. Isolation and primary culture of *Galleria mellonella* hemocytes for infection studies. *F1000Research*, v. 9, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.12688/f1000research.27504.1>. Acesso em: 25 nov. 2024.

SHEN, R. *et al.* Surface-epitope masking: a strategy for the development of monoclonal antibodies specific for molecules expressed on the cell surface. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 86, n. 2, p. 91-98, 1994. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jnci/86.2.91>. Acesso em: 25 nov. 2024.

SINGULANI, J. L. *et al.* Evaluation of the efficacy of antifungal drugs against *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii* in a *Galleria mellonella* model. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 48, n. 3, p. 292-297, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27444116/>. Acesso em: 20 nov. 2024.

SINGULANI, J. *et al.* Antifungal activity, toxicity, and membranolytic action of a

mastoparan analog peptide. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 9, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00419>. Acesso em: 25 nov. 2024.

SINGULANI, J. L. *et al.* Applications of invertebrate animal models to dimorphic fungal infections. *Journal of Fungi*, v. 4, n. 4, p. 118, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jof4040118>. Acesso em: 25 nov. 2024.

SLEISTER, H. M.; RAO, A. GURURAJ. Subtractive immunization: a tool for the generation of discriminatory antibodies to proteins of similar sequence. *Journal of Immunological Methods*, v. 261, n. 1-2, p. 213–220, mar. 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(01\)00567-1](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(01)00567-1). Acesso em: 25 nov. 2024.

SMITH, D. F. Q. *et al.* *Galleria mellonella* immune melanization is fungicidal during infection. *Communications Biology*, v. 5, n. 1, p. 1364, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s42003-022-04340-6>. Acesso em: 25 nov. 2024.

SMITH, R. L.; CASADEVALL, A. Immune signaling in *Galleria mellonella*: Parallels with mammalian inflammatory pathways. *Cell Host & Microbe*, v. 29, n. 6, p. 897-908, 2021.

SONG, M. *et al.* *Cryptococcus neoformans* can utilize ferritin as an iron source. *Medical Mycology*, v. 60, n. 8, p. myac056, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/mmy/myac056>. Acesso em: 25 nov. 2024.

STEMPINSKI, P.; SMITH, D.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* Virulence Assay Using a *Galleria mellonella* Larvae Model System. *BIO-PROTOCOL*, v. 12, n. 15, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.4480>. Acesso em: 25 nov. 2024.

SVENSSON, I., *et al.*, (2005). Antimicrobial activity of conditioned medium fractions from *Spodoptera frugiperda* Sf9 and *Trichoplusia ni* Hi5 insect cells. *Applied microbiology and biotechnology*, 69, 92-98.

TANG, J. Gastricsin and Pepsin. In: *Methods in Enzymology*. Academic Press, 1970. p. 406-421. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(70\)19030-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(70)19030-6). Acesso em: 25 nov. 2024.

TARANTA, A.; FRANKLIN, E. C. Complement fixation by antibody fragments. *Science*, v. 134, n. 3494, p. 1981-1982, 1961. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.134.3494.1981>. Acesso em: 25 nov. 2024.

THEAKSTON, R. D.G.; SMITH, D. C. Antivenoms: a review of current status and future developments. *Biodrugs*, v. 7, p. 366-375, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.2165/00063030-199707050-00004>. Acesso em: 25 nov. 2024.

THOMAZ, Luciana *et al.* *Galleria mellonella* as a model host to study *Paracoccidioides lutzii* and *Histoplasma capsulatum*. *Virulence*, v. 4, n. 2, p. 139-146, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.4161/viru.23047>. Acesso em: 25 nov. 2024.

TOPALIAN, S. L.; DRAKE, C. G.; PARDOLL, D. M. Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell*, v. 27, n. 4, p. 450-461, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.03.001>. Acesso em: 25 nov. 2024.

TREVIJANO-CONTADOR, N. *et al.* *Cryptococcus neoformans* can form titan-like cells *in vitro* in response to multiple signals. **PLOS Pathogens**, v. 14, n. 5, p. e1007007, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007007>. Acesso em: 25 nov. 2024.

TREVIJANO-CONTADOR, N.; ZARAGOZA, O. Immune response of *Galleria mellonella* against human fungal pathogens. **Journal of Fungi**, v. 5, n. 1, p. 3, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jof5010003>. Acesso em: 25 nov. 2024.

TREVIJANO-CONTADOR, N. *et al.* *Cryptococcus neoformans* induces antimicrobial responses and behaves as a facultative intracellular pathogen in the non-mammalian model *Galleria mellonella*. **Virulence**, v. 6, n. 1, p. 66-74, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25531532/>. Acesso em: 20 nov. 2024.

TSAI, C. J. Y.; LOH, J. M. S.; PROFT, T. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. **Virulence**, v. 7, n. 3, p. 214-229, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/21505594.2015.1135289>. Acesso em: 25 nov. 2024.

TSIATSIANI, L.; HECK, A. J. R. Proteomics beyond trypsin: alternative proteases for mass spectrometry-based proteomics. **FEBS Journal**, v. 282, n. 14, p. 2612-2626, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/febs.13287>. Acesso em: 23 nov. 2024.

VELAGAPUDI, R. *et al.* Spores as infectious propagules of *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 10, p. 4345-4355, out. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/IAI.00542-09>. Acesso em: 25 nov. 2024.

WHITEHOUSE JR, Frank; KILDUFF, J. T. Loss of cytotoxicity of rabbit anti-*Ehrlich ascites tumor cell* antibody following pepsin digestion. **The Journal of Immunology**, v. 97, n. 3, p. 386-392, 1966. Disponível em: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.97.3.386>. Acesso em: 25 nov. 2024.

WOJDA, I. Immunity of the greater wax moth *Galleria mellonella*. **Insect Science**, v. 24, n. 3, p. 342-357, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12325>. Acesso em: 25 nov. 2024.

WU, S. *et al.* Antifungal therapy: Novel drug delivery strategies driven by new targets. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 199, p. 114967, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2023.114967>. Acesso em: 25 nov. 2024.

ZAFAR, H. *et al.* A titanic drug resistance threat in *Cryptococcus neoformans*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 52, p. 158-164, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.11.001>. Acesso em: 25 nov. 2024.

ZARAGOZA, O.; CASADEVALL, A.. Experimental modulation of capsule size in *Cryptococcus neoformans*. **Biological Procedures Online**, v. 6, p. 10-15, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1251/bpo68>. Acesso em: 25 nov. 2024.

ZARAGOZA, O.; TABORDA, C. P.; CASADEVALL, A.. The efficacy of complement-mediated phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* is dependent on the location of C3 in the

polysaccharide capsule and involves both direct and indirect C3-mediated interactions. **European Journal of Immunology**, v. 33, n. 7, p. 1957-1967, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/eji.200323848>. Acesso em: 25 nov. 2024.

ZARNITSYNA, V. I. *et al.* Multi-epitope models explain how pre-existing antibodies affect the generation of broadly protective responses to influenza. **PLoS Pathogens**, v. 12, n. 6, p. e1005692, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005692>. Acesso em: 25 nov. 2024.

ZDYBICKA-BARABAS, A. *et al.* Different forms of apolipoprotein III in *Galleria mellonella* larvae challenged with bacteria and fungi. **Peptides**, v. 68, p. 105–112, jun. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2014.12.013>. Acesso em: 25 nov. 2024.

ZDYBICKA-BARABAS, A.; CYTRYŃSKA, M. Involvement of apolipoprotein III in antibacterial defense of *Galleria mellonella* larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, v. 158, n. 1, p. 90-98, 2011.

ZEBEDEE, S. L. *et al.* Mouse-human immunoglobulin G1 chimeric antibodies with activities against *Cryptococcus neoformans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 38, n. 7, p. 1507-1514, 1994. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AAC.38.7.1507>. Acesso em: 25 nov. 2024.

ZENG, M. *et al.* Antiviral active peptide from oyster. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, v. 26, n. 3, p. 307–312, ago. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00343-008-0307-x>. Acesso em: 25 nov. 2024.

ZHAO, P. *et al.* Broad-spectrum antimicrobial activity of the reactive compounds generated *in vitro* by *Manduca sexta* phenoloxidase. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37, n. 9, p. 952–9, 1 set. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2007.05.001>. Acesso em: 25 nov. 2024.

ZHOU, X.; BALLOU, E. R. The *Cryptococcus neoformans* Titan Cell: From *In Vivo* Phenomenon to *In Vitro* Model. **Current Clinical Microbiology Reports**, v. 5, n. 4, p. 252–260, 14 set. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40588-018-0107-9>. Acesso em: 25 nov. 2024.

ZIELIŃSKA, E.; KARAŚ, M.; BARANIAK, B.; JAKUBCZYK, A. Evaluation of ACE, α -glucosidase, and lipase inhibitory activities of peptides obtained by *in vitro* digestion of selected species of edible insects. **European Food Research and Technology**, v. 246, n. 7, p. 1361–1369, 2020. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00217-020-03495-y>. Acesso em: 20 nov. 2024.