



UNIVERSIDADE
DO BRASIL
UFRJ

INSTITUTO DE BIOLOGIA – CEDERJ



AVALIAÇÃO DO EFEITO DE BIOATIVO NATURAL EM MODELOS IN VIVO
DE *Drosophila melanogaster* INFECTADA COM *Candida albicans*

ALINE DA GRAÇA SAMPAIO

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
PÓLO UNIVERSITÁRIO DE NOVA IGUAÇU

2016



UNIVERSIDADE
DO BRASIL
UFRJ

INSTITUTO DE BIOLOGIA – CEDERJ



AVALIAÇÃO DO EFEITO DE BIOATIVO NATURAL EM MODELOS IN VIVO
DE *Drosophila melanogaster* INFECTADA COM *Candida albicans*

ALINE DA GRAÇA SAMPAIO

Monografia apresentada como atividade obrigatória à integralização de créditos para conclusão do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas - Modalidade EAD.

Orientador (a): Profa. Dra. CRISTIANE YUMI KOGA-ITO

Co-orientador (a): Profa. Dra. HELENA MARCOLLA ARAÚJO

Dra. ALINE VIDAL LACERDA GONTIJO

ORIENTADOR: Profa. Dra. CRISTIANE YUMI KOGA-ITO

CO-ORIENTADOR: Profa. Dra. HELENA MARCOLLA ARAÚJO

Dra. ALINE VIDAL LACERDA GONTIJO

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

PÓLO UNIVERSITÁRIO DE NOVA IGUAÇU

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Sampaio, Aline da Graça

Avaliação do efeito de bioativo natural em modelos in vivo de *Drosophila melanogaster* infectada com *Candida albicans*

. Nova Iguaçu, Ano. 2016 f. il: 31 cm

Orientadora: Cristiane Yumi Koga-Ito

Monografia apresentada à Universidade Federal do Rio de Janeiro para obtenção do grau de Licenciado (a) no Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas – Modalidade EAD. Ano 2016.

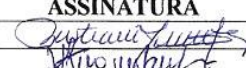
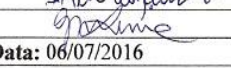


Referencias bibliográfica: f.49-52

1. Palavras Chaves: *Candida albicans*; *Drosophila melanogaster*; Imunidade inata; Receptor Toll. Receptor Toll-like; Bioativo natural; Patogenicidade.

I. KOGA-ITO, Cristiane Yumi

II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Licenciatura em Ciências Biológicas – Modalidade EAD

III. Avaliação do efeito de bioativo natural em modelos in vivo de *Drosophila melanogaster* infectada com *Candida albicans*

ATA - DEFESA DE MONOGRAFIA DE PROJETO FINAL		
NOME DO GRADUANDO (A)		MATRÍCULA
Aline da Graça Sampaio		12114020360
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – IB – UFRJ – EAD – POLO: Nova Iguaçu		
TÍTULO DA MONOGRAFIA		
"Avaliação do Efeito de Bioativos Naturais em Modelos in vivo de <i>Drosophila melanogaster</i> infectada com <i>Candida albicans</i> ".		
NOME DOS MEMBROS DA BANCA	TÍTULO	ASSINATURA
Cristiane Yumi Koga Ito	Doutora	
Marcia Hiromi Tanaka	Doutora	
Gabriela de Moraes Gouvêa Lima	Doutora	
		Data: 06/07/2016
<input checked="" type="checkbox"/> APROVADO (A)		<input type="checkbox"/> REPROVADO (A)
HAVENDO SUGESTÕES NA DEFESA, COLOCAR TÍTULO MODIFICADO DA MONOGRAFIA		
Sr.(a) Coordenador (a): encaminho, em anexo, a versão revisada do Trabalho Final de Curso nos formatos impresso e digital . Atesto que tal versão contempla as sugestões e/ou observações feitas pela banca durante a defesa.		
ORIENTADOR: 		
LOCAL E DATA: – UNESP: 06/07/2016		
COORDENADOR DO CURSO		
LOCAL E DATA: - UNESP : 06/07/2016		

“... A inteligência sem amor te faz perverso.
A justiça sem amor te faz implacável.
A diplomacia sem amor te faz hipócrita.
O êxito sem amor te faz arrogante.
A riqueza sem amor te faz avarento.
A docilidade sem amor te faz servil.
A pobreza sem amor te faz orgulhoso.
... A beleza sem amor te faz ridículo.
A autoridade sem amor te faz tirano.
O trabalho sem amor te faz escravo.
A simplicidade sem amor te deprecia.
A lei sem amor te escraviza.
A política sem amor te deixa egoísta.
A vida sem AMOR... não tem sentido. ”

(Padre Marcelo Rossi)

Dedico esse trabalho a Deus pela força,
coragem e realizações. Com muito amor e
carinho aos meus familiares, pelo apoio.

AGRADECIMENTOS

Meu agradecimento especial à minha orientadora, Prof.^a Cristiane Yumi Kogaito pela oportunidade para a realização deste trabalho. Muito obrigada por me receber em seu laboratório e me dar a oportunidade de estagiar no laboratório Genoma, por confiar no meu potencial e participar da minha formação acadêmica. Sempre serei grata por me conceder essa oportunidade.

À Co-orientação de Helena Marcolla Araújo por aceitar a nos ajudar a desenvolver esse projeto, sem sua ajuda não haveria esse trabalho. E também pela confiança e permitir que um dia eu participasse de sua equipe no Laboratório de Biologia do Desenvolvimento da UFRJ como IC e conhecer de perto a famosa *Drosophila melanogaster*.

À Co-orientação de Aline Gontijo por me acompanhar nesse projeto e confiar no meu trabalho. Obrigada por tudo o que me ensinou, pela paciência, cuidado, atenção e valiosas sugestões.

À minha grande família pelo apoio, estímulo e opiniões. Aos meus pais Olívia e Edson por confiarem em mim e me ajudarem constantemente. As minhas irmãs Alessandra, Andressa e Bianca por me divertirem e serem compreensivas na liberação do notebook para o meu estudo. Aos meus sogros Luciene e Eduardo e cunhada Ariene por apoio e sempre torcerem por mim.

Ao meu companheiro, Eduardo, por me apoiar nos estudos, ser compreensivo, não me permitir desistir e me acalmar nos momentos de desespero com algumas matérias.

As colegas do Laboratório Genoma, Aline Chiodi, Clélia, Gabriela e Márcia por sempre me ajudarem e tirarem minhas dúvidas quando eu precisava, pelas dicas e sugestões. E claro, pelas inúmeras caronas que sempre renderam divertidas e boas conversas. A ajuda de vocês também foi imprescindível para a realização desse projeto.

Aos funcionários Eduardo e Willian, pelas descontrações e divertidas conversas durante o almoço com a turma do laboratório. E agradeço ao Eduardo pelas dicas para a realização do estudo.

Ao Atillo Pane pelo curto tempo que teve em me ensinar o pouco que sei sobre o as fantásticas *Drosophilas melanogaster* e me fazer gostar desse mundo trabalhoso da pesquisa.

Aos meus colegas de turma, pelas divertidas horas que passamos juntos. Agradeço imensamente por tê-los conhecidos, pelas ajudas oferecidas nos estudos, principalmente as revisões emergenciais, as brincadeiras, risadas e surgimento das “alinisses”, em especial à Carol Ribeiro, Jéssica Franciele, Juliana Martins, Lorena Gomes, Natália Liacone, Paulo, Ronald e Wallace Ranquine.

Aos tutores presenciais e a distância e aos professores coordenadores das disciplinas, por me ensinarem tudo o que sei sobre biologia e pelas maravilhosas aulas práticas e dúvidas sanadas.

À UNESP, Instituto de Ciência e Tecnologia de São Jose dos Campos, por me permitir estagiar nesta Instituição.

Ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) pela concessão da bolsa.

RESUMO

Leveduras do gênero de *Candida* são patógenos oportunistas que podem levar ao desenvolvimento de infecções desde superficiais até sistêmicas. Com o aumento do número de pacientes imunodeprimidos e debilitados, observa-se elevação na incidência de infecções por *Candida* e taxa de mortalidade associada. Tendo em vista a ocorrência crescente de resistência aos antifúngicos convencionais, associado ao baixo número de opções terapêuticas disponíveis, a busca por novas moléculas antifúngicas é essencial. Bioativos naturais têm sido estudados para este fim. O ácido elágico tem apresentado atividade antifúngica promissora *in vitro*. Assim, este estudo teve o objetivo de avaliar a atividade antifúngica do ácido elágico em modelo de *Drosophila melanogaster* infectada por *Candida albicans*. Foram utilizadas moscas fêmeas, do tipo wild type (wt) e toll mutantes, com 4 a 10 dias de idade, distribuídas aleatoriamente em quatro grupos experimentais para os dois tipos de moscas: Grupo 1- Moscas alimentadas com meio de cultura contendo ácido elágico (3,2 µg/ml ou 6,4 µg/ml ou 32 µg/ml) e inoculadas com *C. albicans* SC 5314; Grupo 2 – Moscas alimentadas com meio de cultura controle (sem ácido elágico) e inoculadas com *C. albicans* SC 5314; Grupo 3 – Moscas alimentadas com meio de cultura controle, não puncionadas e não inoculadas com suspensão fúngica; Grupo 4 -Moscas alimentadas com meio de cultura controle, submetidas ao processo sham de inoculação (somente submetidas à punção, porém sem inoculação de *C. albicans*). Verificou-se que houve indução de infecção por *C. albicans* no modelo de estudo inoculado. Conclui-se que após infecção direta por *Candida albicans* SC5314 em moscas wt sobreviveram menos que as moscas Toll mutantes e que a mosca wt teve um nível de infecção fúngica maior que moscas Toll mutantes. Além disso, houve efeito protetor contra a infecção fúngica nas moscas Toll mutante em todas as concentrações de ácido elágico. Nas moscas wt notou-se efeito protetor de ácido elágico na concentração de 32 µg/ml.

Palavra-chave: *Candida albicans*; *Drosophila melanogaster*; Imunidade inata; Receptor Toll; Receptor Toll-like; Bioativo natural; Patogenicidade.

ABSTRACT

Candida spp. are opportunistic pathogens that can cause infections that can range from superficial to systemic. With the increase of immunodepressed patients, an increase in the prevalence of *Candida* related infections and associated mortality rates can be observed. Considering the increasing occurrence of resistance to the conventional antifungals, associated to the low number of available therapeutic options, the search for new antifungal molecules is essential. Natural bioactives have been studied for this purpose. Ellagic acid showed promising in vitro antifungal activity. This study aimed to evaluate the antifungal activity of ellagic acid in a *Drosophila melanogaster* model infected by *Candida albicans*. Female flies, wild type (wt) and mutant toll, with 4 to 10 days of age were randomly distributed into four experimental groups: Group 1 – Flies fed with culture medium containing ellagic acid (3.2 µg/ml, 6.4 µg/ml or 32 µg/ml) and inoculated with *C. albicans* SC 5314; Group 2 – Flies fed with control culture medium (without ellagic acid) and inoculated with *C. albicans* SC 5314; Group 3 – Flies fed with control culture medium, not inoculated with fungal suspension nor submitted to puncture; Group 4 – Flies fed with control culture medium and submitted to sham process of inoculation (submitted to puncture but not inoculation with fungal suspension). *C. albicans* infection could be induced in the studied model. After direct infection with *Candida albicans* SC 5314, wt flies showed lower survival rates when compared to Toll mutants. The level of fungal infection was higher in wt than in Toll mutants. A protective effect against fungal infection was observed in Toll mutant flies in all tested concentrations of ellagic acid. In wt flies, protective effect of ellagic acid was observed in the concentration of 32 µg/ml.

Keyword: *Candida albicans*; *Drosophila melanogaster*; Toll receptor; Toll-like receptor; Bioactive natural; Pathogenicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Drosophila melanogaster</i> : visão lateral e visão superior	20
Figura 2 - Via padrão de resposta imunológica envolvendo o receptor Toll e Toll-Like.....	23
Figura 3 - Atuação de Toll na polarização dorso-ventral.....	24
Figura 4 - Estação anestésica de CO ₂	30
Figura 5 - <i>D. melanogaster</i> cultivada em garrafas.....	30
Figura 6 - Fluxograma de etapas de padronização do inóculo.....	33
Figura 7 - Método de Miles e Mirsa de contagem de UFC/ml.....	37
Figura 8 - Técnica de Gram para comprovação morfológica dos micro-organismos recuperados do modelo de <i>Drosophila melanogaster</i>	39
Figura 9 - Colônias sugestivas de <i>C. albicans</i> em meio CHROMagar crescidas a partir de material recuperado de <i>Drosophila melanogaster</i>	40
Figura 10 - Colônias sugestivas de <i>C. albicans</i> em meio CHROMagar crescidas a partir de material recuperado de <i>Drosophila melanogaster</i>	40
Figura 11 - Colônias observadas após 24h de incubação.....	41
Figura 12 - Curva de sobrevivência das moscas T1 mutantes infectadas com <i>C. albicans</i> e tratadas com concentrações de 3,2 (Figura 1-A) e 6,4 µg/mL (figura 1-B) de ácido elágico.....	41
Figura 13 - Curva de sobrevivência das moscas T1 mutante infectadas com <i>C. albicans</i> e tratadas com concentração de 32 µg/mL de ácido elágico.....	42
Figura 14 - Curva de sobrevivência das moscas wt infectadas com <i>C. albicans</i> e tratadas com concentração de 3,2 µg/mL de ácido elágico.....	42
Figura 15 - Curva de sobrevivência das moscas wt infectadas com <i>C. albicans</i> e tratadas com concentração de 6,4 µg/mL de ácido elágico.....	43

Figura 16 - Curva de sobrevivência das moscas wt infectadas com <i>C. albicans</i> e tratadas com concentração de 32 µg/mL de ácido elágico.....	43
Figura 17 – Curva de toxicidade das moscas Toll mutante e wt nas concentrações de 3.2 µg/mL, 6.4 µg/mL e 32 µg/mL de ácido elágico.....	44

TABELA

TABELA 1.....38

TABELA 2.....39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

TI – Toll

PRR – *Pattern Recognition Receptor*

PAMP – *Pathogen Associated Molecular Pattern*

TLR – Receptor Toll – Like

TIR – Receptor Toll interleucina (Receptor Toll-IL)

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

AE – Ácido Elágico

LBMD – Laboratório de Biologia Molecular do Desenvolvimento

UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

CO₂ – Dióxido de Carbono

SD – Sabouraud Dextrose

PBS – Phosphate Bufferd Saline

NaOH – Hidróxido de Sódio

UFC – Unidade Formadora de Colônia

Wt- *wild type* (cepa selvagem)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVO	18
2.1 Objetivo geral.....	18
2.2 Objetivo específico.....	18
3 REFERENCIAL TEÓRICO	19
3.1 <i>Drosophila melanogaster</i>	19
3.2 Receptor Toll no sistema imunológico da <i>Drosophila melanogaster</i> e homólogo em mamíferos	20
3.2.1 Receptor Toll – like em mamíferos.....	24
3.3 <i>Candida albicans</i>	26
3.4 Ácido Elágico	27
4 MATERIAIS E MÉTODOS	29
5 RESULTADOS	37
6 DISCUSSÃO	46
7 CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	49

1- INTRODUÇÃO

Leveduras do gênero *Candida* são geralmente comensais, porém, podem tornar-se patogênicos em pacientes imunodeprimidos e debilitados, causando, na maioria das vezes, a candidíase (WILLIAMS *et al.*, 2013). Com o aumento desta população observa-se uma alta incidência desta doença, conseqüentemente um aumento na taxa de mortalidade, principalmente de pacientes infectados por HIV (BRITO *et al.*, 2011). Doenças relacionadas a micro-organismos oportunistas em humanos são responsáveis por taxas de mortalidade acima de 30% em imunodeprimidos (GLITTENBERG *et al.*, 2011).

Candida spp. possuem vários mecanismos de virulência como a capacidade de invadir os tecidos do hospedeiro e escapar do mecanismo de defesa do organismo (CHAMILOS *et al.*, 2006). Considera-se como potencial de virulência ou patogenicidade desse fungo a capacidade de este simultaneamente aderir aos tecidos, infectar e causar a enfermidade podendo disseminar-se no hospedeiro. Os fatores de virulência são definidos pela expressão genética desses microrganismos, porém quando submetidos a determinadas condições que favoreçam o desenvolvimento da levedura, como: teor nutricional, atmosfera de oxigênio e temperatura. (TAMURA *et al.*, 2007). Tais circunstâncias são consideradas específicas para cada micro-organismo e para cada isolado de determinado agente, podendo variar em casos de hospedeiros diferenciados e diferentes tecidos do mesmo hospedeiro. Dentre os fatores de virulência que contribuem para a patogenicidade envolvendo *Candida albicans* podemos citar a capacidade de adesão, a hidrofobicidade de superfície celular, variabilidade genotípica, *switching* fenotípico, formação de biofilme, polimorfismo, a produção de enzimas extracelulares (exoenzimas) como a fosfolipase e proteinase e a atividade hemolítica (ÁLVARES *et al.*, 2007).

Desse modo, o surgimento de novos tratamentos contra agentes antifúngicos é de extrema relevância. O uso de bioativos naturais extraídos de plantas brasileiras, como o ácido elágico tem mostrado influência antimicrobiana promissora contra *Candida* (BRIGHENTI *et al.*, 2014). Dentre esses bioativos com essa ação a *C. albicans*,

destaca-se o ácido elágico, em estudos anteriores em nosso grupo de pesquisa (TEODORO *et al.*, 2015).

Os estudos dos fatores de virulência são essenciais para testar estes compostos bioativos. Assim, um modelo alternativo dos estudos *in vivo* é o uso do modelo de *Drosophila* que pode ser utilizado em grande escala. (CHAMILOS *et al.*, 2006).

A escolha do modelo de *Drosophila melanogaster* visa atender a necessidade de diminuir a utilização de espécies de mamíferos em estudos de pesquisa. A criação de métodos alternativos que sejam capazes de substituir o uso de animais, principalmente os mamíferos, em pesquisas científicas é um assunto muito discutido pelos grupos de ética em pesquisa. Um dos principais argumentos discutidos baseia-se no fato do sistema de investigação utilizado comumente com mamíferos têm algumas desvantagens tais como a demora e baixa resolução estatística, devido à longevidade das espécies e a pequena quantidade da amostra a ser estudada (GLINTTENBERG *et al.*, 2011).

Qualquer espécie animal usada como modelo deve atender requisitos básicos que se assemelha ao objeto imitado e tenha capacidade de ser manipulado sem os limites do alvo comparado. Além disso, devem atender aos requisitos que possibilitem a análise de fenômenos biológicos ou comportamental, envolva procedimentos patológicos seja ele espontâneo ou induzido que possam ser pesquisados e que o evento estudado seja em um ou mais aspectos parecidos aos fenômenos ocorridos em seres humanos (FAGUNDES E TAHA, 2004).

Dentre os invertebrados, os insetos como a *D. melanogaster* são modelos predominantes usados como modelos alternativos em pesquisas que contribuem para o conhecimento de diversos mecanismos biológicos existentes na maioria dos seres vivos (MORALES, 2008).

De acordo com Morales *et al.* (2008), o estudo com *D. melanogaster* se tornou ao longo do tempo um modelo importantíssimo na pesquisa em genética, além de também ser um elemento usado em modelos biológicos para diversos testes, tendo como benefício o estudo envolvendo patologias humanas, também é considerado significativo substituto para métodos alternativos de pesquisa científica visando o menor uso de mamíferos.

É sabido que a mosca *D. melanogaster* possui imunidade inata em uma de suas vias de sinalização denominada *Toll (Tl)* que desempenha controle a respostas imunes contra agentes fúngicos e patógenos Gram-positivos (CHAMILOS *et al.*, 2006).

O foco deste estudo consiste em analisar a ocorrência de infecção por *Candida albicans* e descrever os efeitos de substâncias bioativas em modelo *in vivo* de *D. melanogaster*.

Este estudo possui grande importância farmacológica e tem como intuito compreender o mecanismo que envolve o patógeno com o modelo de estudo, a fim de que futuramente se possam desenvolver beneficamente para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

2- OBJETIVOS

2.1- Objetivo Geral

Avaliar o efeito do bioativo natural ácido elágico no modelo *in vivo* de *Drosophila melanogaster* infectada por *Candida albicans*.

2.2 – Objetivos específicos

- Realizar levantamento bibliográfico sobre as espécies *Drosophila melanogaster* e *Candida albicans*.
- Realizar a infecção pelo patógeno em estudo no modelo *in vivo* *D. melanogaster*.
- Observar e descrever os efeitos do bioativo ácido elágico na espécie *D. melanogaster* infectada pelo microrganismo de estudo.
- Comparar a taxa de sobrevivência e toxicidade das moscas mutantes e selvagens infectadas em relação ao efeito do bioativo natural ácido elágico.

3- REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 – *Drosophila melanogaster*

Drosophila melanogaster (Fig 1), popularmente conhecida como mosca da banana (MORI, 2012) ou mosca da fruta (ROCHA, et. al., 2013) ou mosca do vinagre (SILVA, 2016), é uma espécie de extrema importância para a ciência. Os estudos científicos com esse modelo *in vivo* serviram de base para os fundamentos da Genética Moderna, provando a existência dos genes nos cromossomos (MORI, 2012).

Esse organismo é um dos diversos modelos animais usados em pesquisa e como tal possui atributos científicos que inclui: possuir um sistema genético de fácil manipulação, oferecer baixo custo, conter ciclo de vida curto que permite um processo reprodutivo rápido entre 10 a 12 dias, ter complexidade biológica correlata a dos mamíferos (FLYBASE, 2016), dimorfismo sexual, grande fecundidade e ter baixa exigência nutricional. (MORALES, 2008). Ademais possui sistemas e órgãos homólogos aos dos mamíferos. Por essas razões é um organismo modelo usado em inúmeros trabalhos científicos que envolvem variados assuntos, dentre eles a imunidade (FLYBASE, 2016), estudos de genética e doenças humanas. Possuem também a importância ecológica como bioindicadores na natureza e no ensino de ecologia e genética (ROCHA, et al., 2013).

Esse espécime modelo possui vantagem de manutenção laboratorial, além de também sobreviver bem em temperatura ambiente, serem observáveis facilmente com o uso de lupa e terem um genoma relativamente menor em comparação de outros eucariontes (ROCHA, et. al., 2013).

Estudos realizados com insetos, como *D. melanogaster* provaram que são capazes de permitir a investigação de cargas microbianas que podem ser letais para muitos mamíferos (STOKES, 2015).

Em suma, *Drosophila melanogaster* são modelos alternativos que podem ser utilizados nas pesquisas básicas para imunologia e outras áreas biomédicas, porque são animais fáceis de manipular, tem ciclo reprodutivo curto e são geneticamente bem caracterizados.



Figura. 1- *Drosophila melanogaster*: visão lateral (SHUTTERSTOCK, 2016) e visão superior (BUGGUIDE, 2016)

3.2 Receptor Toll no sistema imunológico da *Drosophila melanogaster* e homólogo em mamíferos

O sistema imunológico de um ser vivo de qualquer espécie se constitui em um grupo de órgãos, células, estruturas e mecanismos que tem como objetivo garantir a integridade do indivíduo contra a invasão e colonização de seres da mesma espécie ou de espécies diferentes. A resposta imune contra a invasão por um patógeno envolve variados mecanismos de interações e reações moleculares e celulares do hospedeiro contra o patógeno que se encontra no organismo, a fim de preservar a integridade do organismo que foi invadido pelo antígeno (OLIVEIRA e KANASHIRO, 2013).

O conjunto de eventos envolvendo a imunidade atua com a finalidade de manter a homeostase do organismo invadido através do combate ao agente agressor. Dentro desse contexto, a imunidade inata atua junto à imunidade adaptativa caracterizando uma rápida resposta a invasões, defendendo o organismo através de variados mecanismos que envolvam componentes moleculares e celulares e barreiras físicas, químicas e biológicas (SOUZA *et al*, 2010).

Na década de 90 foram descobertas importantes moléculas envolvidas na imunidade em modelos de *D. melanogaster* (ref. em FERRAZ *et al.*, 2011). Foi identificado na superfície de células da hemolinfa um grupo de receptores do tipo PRRs (do inglês *pattern recognition receptors*) que são estruturas capazes de reconhecer padrões moleculares encontrados em micro-organismo, os quais se encontram presentes na superfície de células componentes da imunidade inata. Essas estruturas são

encontradas em células como: macrófagos, neutrófilos e nas células dendríticas. Esse receptor também possui capacidade de reconhecer PAMPs (do inglês *Pathogen Associated Molecular Pattern*) outro tipo de padrão de reconhecimento molecular, porém associado a patógenos, capaz de distinguir as moléculas do hospedeiro (OLIVEIRA e KANASHIRO, 2013).

Esses receptores PRRs descobertos denominam-se Toll e possuem importância contra as infecções fúngicas (FERRAZ *et al*, 2011) e detecção de bactérias Gram-positivas. (STOKES *et al.*,2015). Estes são capazes de induzir o único tipo de resposta imune em *Drosophila*, a inata, tornando a mosca um adequado modelo para o estudo dessa resposta imunológica envolvendo interações hospedeiro-patógeno. Contudo, estudos referentes à ação da imunidade fúngica na mosca reforçam a influência da ativação da via Toll através do receptor Toll (codificado como Tl) (FERRAZ *et al.*, 2011).

O receptor Toll é uma proteína transmembrana composta por ricas repetições extracelular de leucina e um domínio citoplasmático denominado receptor Toll-interleucina-1 (TIR), responsável por iniciar a sinalização (STOKES *et al.*,2015) na espécie *D. melanogaster*, sendo essenciais na proteção imunológica do gênero (FERRAZ *et al*, 2011).

Conforme ref em Strokes (2015), o Tl da mosca não interage diretamente com a estrutura do patógeno. Para ativá-lo é necessário receber sinalização de proteínas de reconhecimento que se encontram na hemolinfa do animal, as quais convertem a presença microbiana em um tipo de Ligante, o Spaetzle capaz de interagir com Toll e acioná-lo. Porém, antes dessa ligação para Toll exercer sua função é necessário que proteínas reconhecedoras do patógeno invasor desencadeiem uma reação em cascata de serina proteases que ativam uma enzima Spaetzle (SPE) que posteriormente cliva a proteína Spaetzle (SPZ ligand) no fragmento que irá se ligar a Toll. Sem a sinalização dessas proteases extracelulares não há ativação de Toll e o animal fica suscetível a infecções.

Esta proteína induz a sinalização intracelular, recrutando a presença de proteínas adaptadoras. A transdução da sinalização intracelular ativa a resposta de Toll a expressão de genes envolvidos na imunidade, incluindo genes que codificam peptídeos antifúngicos. (ABREU, *et al.* 2013).

Inicialmente, Toll se comunica com MyD88 (do inglês Myeloid Differentiation Primary Response 88) e sequencialmente recruta as proteínas Tube e Pelle. Pelle induz a fosforilação de Cactus, proteína que se liga a fatores transcricionais da família NFκB/c-Rel como que se liga a domínios de fatores transcricionais relacionados com a Dorsal Immunity Factor (Dif) e Dorsal (DI) através de 6 unidades repetidas de anquirina (*ankyrin-repeats*). Após ocorre um processo de fosforilação, ubiquitinação e degradação de Cactus no proteossoma, liberando Dif e DI para translocação ao núcleo, levando ao controle da expressão gênica (MOUSSIAN & ROUTH, 2005). (Fig. 2)

Além do envolvimento imunológico durante a sinalização da imunidade inata, o receptor Toll de característica transmembrana é componente de um grupo contendo 12 genes responsáveis pela via conservada de polarização dorsoventral e desenvolvimento de embriões desse inseto (MOUSSIAN & ROUTH, 2005).

Como descrito para o sistema imune, após a fertilização há ativação de Stz, componente extracelular derivado da linhagem. Spz ativado por proteases maternas faz ligação específica com o receptor de Toll, sendo este sinal transduzido no embrião pelas proteínas Pelle (Pll), Tube (Tub), Dorsal (DI) e Cactus (Cact). Mais tarde Toll também é requerido zigoticamente para o desenvolvimento tecidual e muscular, porém ao longo da formação do embrião sua ativação vai diminuindo (BRODY, 1997).

Toll encontra-se no espaço perivitelínico em volta de todo o embrião, tanto na região dorsal quanto ventral, porém somente é ativado a região ventral devido ao ligante Spatzle (SPZ) agir somente nessa região durante a ativação dessa via. (BRODY, 1997) (Fig 3).

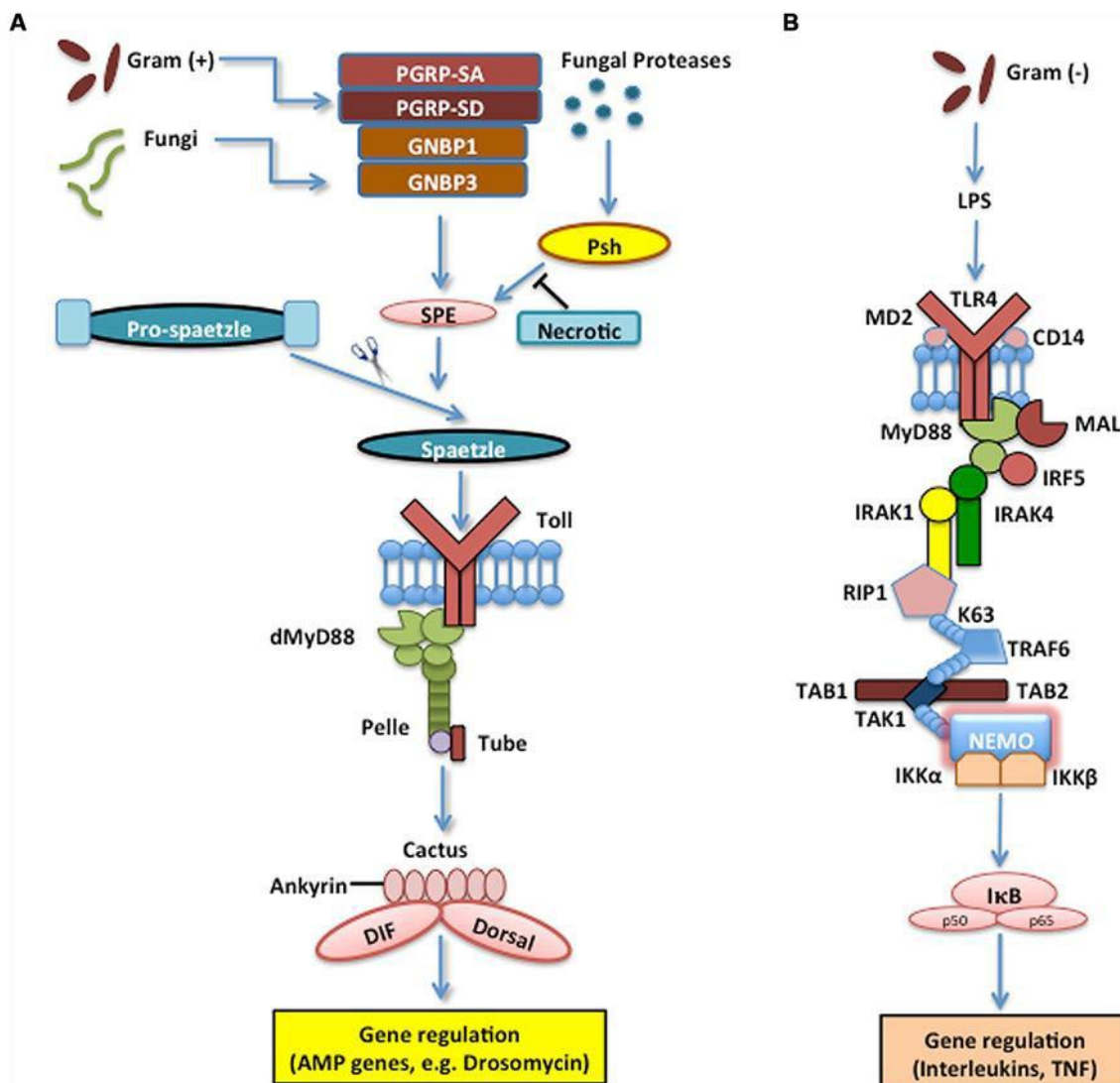


Figura 2: Via padrão de resposta imunológica envolvendo o receptor Toll e Toll-Like. Em a) resposta imune envolvendo o receptor Toll, em *Drosophila*, contra invasão de bactérias gram-positivas e infecções fúngicas e em b) resposta imunologia em mamíferos, ratos, envolvendo o receptor Toll TLR4. (STOKES *et al.*, 2015)

Fundamentados nessas informações, alguns estudos de investigação sobre a virulência de *Candida albicans* em moscas se baseiam exclusivamente na utilização de estirpes de *Drosophila* com Toll mutante, moscas que possuem falta de função da via Toll (DAVIS, *et al.*, 2011).

Davis *et al* (2011) complementa que este modelo mutante possui algumas limitações experimentais que podem comprometer o uso do sistema desse hospedeiro. Essas moscas mutantes da via Toll são intensamente imunocomprometidas, comprometendo o uso de algumas estirpes fúngicas. A infecção torácica de moscas wt e Tl mutante por *C.*

albicans demonstraram disseminação por todas as moscas e também após a infecção aguda inicial com duração de 3 dias, a mosca mostrou um aparente equilíbrio na interação patógeno-hospedeiro que parece resultar numa resistência infecciosa.

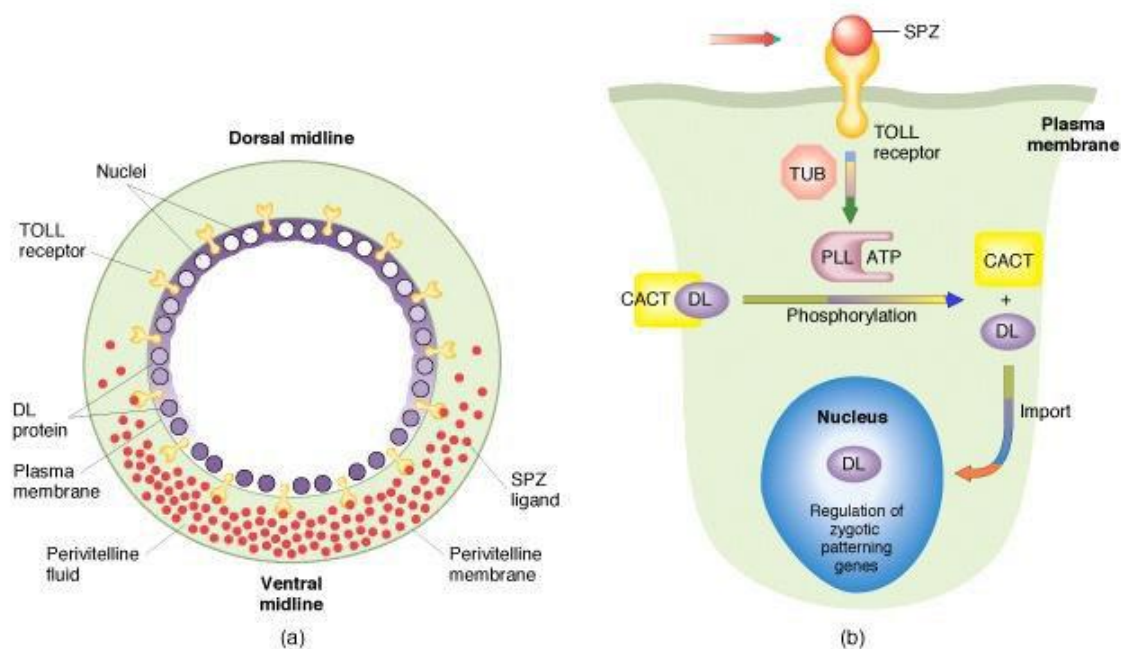


Figura 3: Atuação de Toll na polarização dorso-ventral (UNIVERSITY OF MIAMI, 2016).

3.2.1 Receptor Toll - like em mamíferos

Em 1997, foram identificadas proteínas homólogas a Toll em humanos as quais foram denominadas de receptores Toll-like (TLR). Foram identificados 10 tipos de Tolls e classificados como TLR1-10. (FERRAZ *et. al.*, 2011). Os TLRs são considerados receptores similares aos Tolls e foram encontrados na superfície de fagócitos e assim como os receptores Toll possuem a capacidade de reconhecimento de PAMPs que são expressos por um vasto repertório de agentes infecciosos envolvendo bactérias Gram-positivas e negativas, vírus DNA e RNA, fungos e protozoários (OLIVEIRA e KANASHIRO, 2011). Também funcionam como receptores PRRs encontrados em células de macrófagos, células dendríticas e neutrófilos. Contudo, a associação envolvendo PRR-PAMP age beneficemente na ativação da imunidade inata e também atua como fator importante no desencadeamento da atuação da atividade adquirida no combate aos patógenos. (FERRAZ *et. al.*, 2011).

Segundo Ferraz *et al.* (2011) essas proteínas transmembranas Toll-like (TLR) representam um papel significativo tanto para localização como para o reconhecimento de agentes microbianos infecciosos quanto na produção de sinais enviados para gerar proteínas e citocinas pró-inflamatórias, operando na ativação do sistema da imunidade inata e adquirida. Para Souza *et al* (2010) o Toll-like exerce um elo entre esses dois tipos de imunidade e além disso trabalham no reconhecimento específicos de auto-antígenos DNA e ribonucleoproteínas, o que os capacitam a distinguir o que é próprio (*self*) e não próprio (*no self*) ao organismo evitando ativar desnecessariamente uma resposta imune. No entanto, há relatos dos TLRs induzirem a autoimunidade a indivíduos geneticamente susceptíveis, devido à geração de citocinas pró-inflamatórias.

Os TLR 1-10 possuem associação com receptores de proteína Interleucina formando um domínio comum denominado TIR (receptor Toll-IL) que divide esses receptores em subgrupos diferenciados pelo local de ação do domínio (THOMAS, 2016). Esse tipo de domínio é requisitado para começar a gerar sinais intracelulares. Os TLRs 1, 2, 4, 5 e 6 encontram-se sobre a membrana plasmática e possuem domínio intracelular e extracelular, por causa do TIR e LRR (repetições ricas em leucina), enquanto os TLRs restantes, 3, 7, 8, 9 e 10 encontram-se presentes no interior da célula nos endossomos e diferente dos outros TLRs não possuem o domínio extracelular. (FERRAZ *et al*, 2011). Uma proteína relevante associada ao tipo TIR é a MyD88, mobilizada quando um receptor Toll-Like específico reconhece um PAMP, a qual opera recrutando cinases envolvidas com o TIR ativando uma cascata de reações imunológicas (FERRAZ *et al*, 2011).

Estudos baseados nos receptores Toll-like, indicam que embora esses receptores desempenhem uma função significativa no combate de infecções e processos inflamatórios, algumas doenças ocorrem devido ao polimorfismo destes receptores. O receptor TLR4 é bastante citado pela sua relação entre o polimorfismo e infecções por *Candida albicans* e periodontites crônicas, entre outras doenças. TLR5 (FERRAZ *et al*, 2011).

Conforme Oliveira e Kanashiro (2013), polimorfismo caracteriza-se quando existem múltiplos alelos para um mesmo gene que constituem uma variação fenotípica.

Considera-se o TLR4 (Fig. 2) o primeiro homólogo dos receptores Toll-Like, descoberto em humanos. Os genes Toll-like mais investigados são os TLR2 e TLR4

devido a diversidade de células que os expressam em sua superfície e a forma da expressão gênica no organismo humano. O receptor TLR4 tem importante papel no reconhecimento de patógenos, estruturas fúngicas, agentes microbacterianos patogênicos, lipopolissacarídeos e também bactérias Gram-negativas (FERRAZ *et al*, 2011).

Ferraz *et al*. (2011) relata que devido ao papel desempenhado pelos Receptores Toll-Like em cargas virais, as proteínas virais que se conectam as TLRs podem ser alvos terapêuticos de estudos em diversos contextos clínicos.

3.3 *Candida albicans*

As leveduras do gênero *Candida* são muito estudadas aos longos dos anos devido à sua capacidade de infectar o organismo humano. É uma espécie comensal que faz parte da microbiota normal de indivíduos saudáveis (COSTA, 2008). No entanto, em indivíduos imunodeprimidos pode causar doenças oportunistas como a candidíase ou candidose. Esta caracteriza-se por ser uma patologia que pode ocasionar sintomas como: lesões leves ou graves envolvendo a área da boca, garganta, pele, genitálias e órgãos internos. A ocorrência da patologia depende da resposta imune do hospedeiro (BARBEDO e SGARBI, 2010).

Candida apresenta-se em formato de micélio e hifa (na maioria das vezes) e exibe características de pseudomicélio em determinados ambientes. (CASTRO *et al*, 2006). Existem aproximadamente 200 espécies desse gênero (BARBEDO e SGARBI, 2010) e dentre elas *C. albicans* é considerada o principal agente etiológico desse gênero (CASTRO *et al*, 2006).

Os métodos de estudo laboratoriais envolvem cultivo em ágar Sauboraud que apresenta colônias esféricas com coloração creme e aspecto pastoso. Pode ser utilizado também meio de cultura específico Chromagar que contém um substrato com capacidade de diferenciar de forma sugestiva *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei* por meio de sua coloração (BARBEDO e SGARBI, 2010).

Na resposta do hospedeiro contra infecção por *Candida* atuam a imunidade inata como a primeira linha de defesa do organismo e a imunidade adaptativa. Estudos citam

alguns receptores de fagócitos como iniciadores da ativação da resposta imune ao reconhecerem as moléculas patogênicas, são eles: receptores Toll - like (TLRs), receptores de manose e receptores dectina-1 (COSTA, *et al*, 2008).

3.4 Ácido Elágico

Ao longo dos anos, os microrganismos estão tendo uma evolução acelerada a resistência a antimicrobianos, tornando obsoletos os métodos tradicionais de combate aos patógenos, como os antibióticos, concomitantemente com uso inadequado e excessivo dessas drogas. Por isso, é necessária a busca por novas estratégias terapêuticas para controlar as infecções causadas por esses agentes patogênicos (ABREU *et al*, 2013).

Procedimento terapêutico a base de extratos de plantas é conhecido e vem sendo valorizado por séculos, devido a seus efeitos benéficos sempre foram aplicados no tratamento de inúmeras doenças e infecções. Diversos estudos relataram a ação antimicrobiana de bioativos naturais frente a diversos agentes patogênicos. Apesar de apresentarem potencial menor, em geral, comparando-se aos antibióticos convencionais, os fitoterápicos podem aumentar a atividade destes fármacos, colaborando para o combate aos micro-organismos resistentes (ABREU *et al*, 2013).

Abreu *et al* (2013) ressalta que a pesquisa em fitoterápicos pode contribuir de forma importante na busca por novos compostos de interesse clínico. Deste modo, o uso de compostos bioativos naturais na combinação de novas drogas antimicrobianas naturais ou sintéticas está se tornando importante, a fim de desenvolver novos agentes terapêuticos.

Espécies de plantas como a da família *Combretaceae*, de classe *Myrtales*, (GLÓRIA, E. C., 2014) são modelos de plantas utilizadas como medicamento que consiste de entorno 20 gêneros (TEODORO, *et al.*, 2015) e 600 espécies e possuem predominância em regiões tropicais e subtropicais ao redor do mundo, inclusive na América do Sul. (GLÓRIA, E. C. 2014). Dentre elas, um dos gêneros estudados é *Buchenavia* que tem apresentado resposta promissora a atividades biológicas e resposta

a atividades antimicrobianas (TEODORO, *et al.*, 2015). O isolamento de compostos dessas plantas resultou na identificação de compostos, como o ácido elágico (GLÓRIA, E. C., 2014).

Recentemente, a ação antifúngica frente a *C. albicans* do ácido elágico foi descrita *in vitro* (TEODORO *et al.*, 2015) por nosso grupo de pesquisa. Assim, este estudo tem o propósito de avaliar a ação desse bioativo natural em metodologia *in vivo*, com *D. melanogaster*.

4- MATERIAIS E MÉTODOS

1- Estoque *Drosophila melanogaster*

Para o estudo utilizou-se como modelo de infecção, moscas do tipo Canton-Special (Canton-S) como moscas selvagens (*wt- wild type*) e para Toll-deficiente (Tl-deficiente) usou-se moscas mutantes heterozigotas de genótipo Tl[r3]/TM3,Sb[1].

Todas as linhagens de *Drosophila* foram fornecidas pelo Laboratório de Biologia Molecular do Desenvolvimento da Universidade Federal do Rio de Janeiro (LBMD/UFRJ), com colaboração da Professora Helena Marcolla Araújo. Foi realizado os procedimentos padrões para manipulação, alimentação e armazenamento das moscas em todos os experimentos.

2- Cepa fúngica

As cepas padrão de *Candida albicans* ATCC 18804 e SC 5314 foram incluídas neste estudo. Antes de cada experimento, as cepas fúngicas foram repicadas em meio de cultura Sabouraud dextrose e crescidas a 37° C por 24 horas.

3- Estação anestésica de CO₂

A estação anestésica de dióxido de carbono (CO₂) implementada no laboratório de Genoma do ICT-UNESP foi baseado no estudo de Artiss (2007).

Para a montagem da estação anestésica, utilizou-se um rack de prolipileno adaptado com uma altura de 2 cm. O fundo foi totalmente vedado com cola quente e um pedaço de madeira MDF. Os orifícios maiores localizados na parte superior do rack foram vedados com cola quente e para melhor fixação envolveu-se por fita adesiva. Para finalizar o sistema de estação anestésica de CO₂, em uma das laterais menores do objeto

fez-se um furo e encaixou-se uma rolha de garrafa com um orifício ao centro para fixar e estabilizar o cano de borracha que conecta o ar do balão de CO₂ ao sistema anestésico de manipulação do inseto (Figura 4).



Fig 4 Estação anestésica de CO₂

4- Cultivo de *Drosophila melanogaster*

As moscas, da espécie *D. melanogaster* foram cultivadas dentro de garrafas estéreis de 200 ml, tampadas com chumaço de algodão. No interior da garrafa colocou-se o meio de cultura (item 5 de metodologia) das moscas. Todas as garrafas foram identificadas com especificação genotípica da mosca e data da troca da alimentação (Fig. 5). As moscas foram armazenadas em temperatura ambiente, exceto garrafas estoques em ambiente com temperatura próxima a 20°C.



Fig. 5 *Drosophila melanogaster* cultivada em garrafas

5- Meio de cultura para *Drosophila melanogaster*

A composição do meio de cultura foi a mesma utilizada no grupo do LBMD/UFRJ (Profa. Helena Marcolla Araújo e Pós-doutorando Márcio Fontenele) que desenvolvem estudos com *Drosophila*.

Mensalmente, foram produzidos aproximadamente 2300 ml de meio. O preparo consistiu na dissolução de 75 ml de melado em 1050 ml de água destilada durante 1 minuto. Após, acrescentou-se lentamente 75 ml de fubá. A mistura foi aquecida por 1 minuto e agitada novamente. O procedimento foi repetido por 3 vezes homogeneizando a solução. Com a mistura a uma temperatura mais elevada foi adicionado lentamente 31g de levedura (fermento biológico seco). A mistura foi aquecida, agitando-a constantemente. O procedimento foi repetido por 4 vezes. Em seguida, 11g de Agar bacteriológico foi adicionado à mistura lentamente, agitando a mistura. Novamente, a mistura foi aquecida por 10 minutos em temperatura baixa. A seguir, a mistura foi mantida em repouso por 30 minutos, até alcançar uma temperatura próxima de 60°C. Para finalizar, foi acrescentado Tegosept 10% (agente antifúngico para *Drosophila*; p-Hydroxybenzoic acid methyl ester, Methyl 4-hydroxybenzoate, BioReagent) e, em seguida, 6 ml de ácido propiônico.

6- Meio de cultura para cepa *C. albicans*

Os meios de cultivo utilizados para as cepas *C. albicans* foram Sabouraud dextrose e Chromagar.

6.1- Preparo de placas com meio Sabouraud dextrose (SD)

O meio de cultura Sabouraud dextrose é próprio para o cultivo de bolores, leveduras e fungos (BIOSYSTEMS, 2016).

As placas com meio SD em garrafas de 500 ml, sendo para a composição do meio utilizado 300 ml de água destilada e 19,5g de Sabouraud dextrose. Os ingredientes

foram misturados até total homogeneização e depois autoclavados. Posteriormente, o meio de cultura foi distribuído em 20 placas de Petri, em condições de assepsia.

6.2- Preparo de placas com meio CHROMagar

Utiliza-se o meio de cultura CHROMagar para isolar levedura e filamentos fúngicos, além de diferenciar de forma sugestiva espécies de *Candida*, ou seja, usa-se como um meio seletivo (DICKINSON, 2014).

O meio CHROMagar foi preparado em garrafas de 200 ml. Ao volume de 100 ml de água destilada, foi adicionado 4,77 g de CHROMagar e misturado até total homogeneização. Após, o meio de cultura foi aquecido em micro-ondas por 1 minuto. O procedimento foi repetido até obter total dissolução do pó na água. O meio de cultura foi mantido a temperatura ambiente até atingir cerca de 50°C e em seguida foi distribuído em placas de Petri em condições de assepsia.

7- Padronização da inoculação de *Candida albicans* em *Drosophila melanogaster*

O procedimento baseia-se nas metodologias descritas por Chamilos *et al* (2006) e Glinttenberg *et al*. (2011). Para a padronização da metodologia, foram avaliadas diferentes condições, tais como:

- 1- Tipo de cepa *C. albicans* (ATCC 18804 e SC 5314);
- 2- Inoculação *C. albicans* em suspensão (2×10^8 células/ml) e inoculação direta a partir do crescimento em placa de SD;
- 3- Lavagem das células de *C. albicans* com PBS antes do preparo da suspensão.

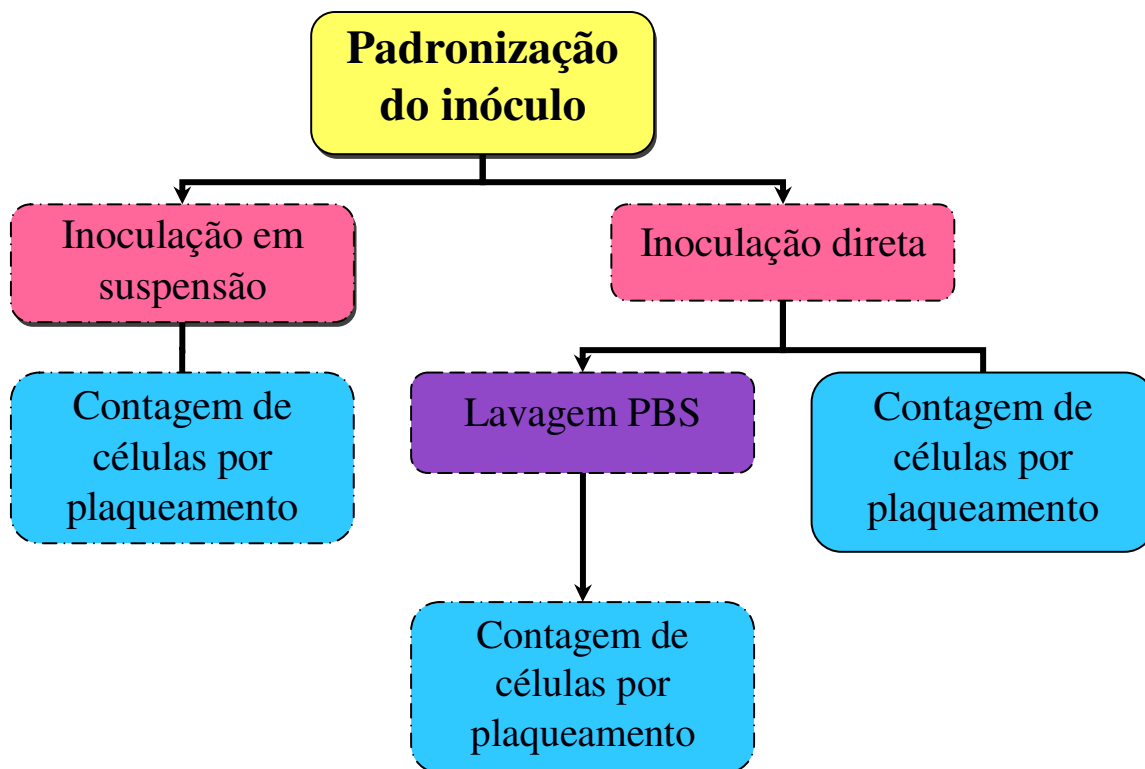


Fig. 6: Fluxograma de etapas de padronização do inóculo

O experimento foi subdividido em 4 etapas realizadas durante o período de 4 dias subsequentes, sendo todo o procedimento iniciado dentro de 24 horas.

Na primeira etapa, a cepa foi repicada em ágar Sabouraud dextrose e incubada a 37°C por período de 24 horas. Os vials contendo 6 ml de meio de cultura para *D. melanogaster* para serem usados na etapa 2 foram preparados.

Na etapa 2, a suspensão padronizada de *C. albicans* foi obtida. Para tanto, algumas colônias de *C. albicans* foram transferidas da placa de ágar com o auxílio de uma alça calibrada para um tubo Falcon contendo 1 ml de solução NaCl 0.9%. A concentração de *Candida*/ml foi determinada com o auxílio de uma câmara de Neubauer. Os ajustes necessários a fim de obter uma concentração final de 2×10^8 *Candida*/ml foram realizados.

Para a inoculação direta a partir do crescimento em placa SD, as colônias de *C. albicans* foram retiradas diretamente da placa de SD (repicada 24 horas antes) e imediatamente injetadas nas moscas.

Adicionalmente, realizou-se lavagem da suspensão de *C. albicans* com solução fisiológica tamponada (PBS) a fim de utilizar um inóculo mais puro para a infecção. Com o auxílio de uma alça calibrada, colônias de *Candida* foram retiradas diretamente da placa SD e adicionadas a 3 ml de solução PBS, em um tubo Falcon de 15 ml. Após, a suspensão foi centrifugada por 10 minutos a 1500 rpm e o sobrenadante foi descartado. Repetiu-se o procedimento. As células lavadas foram inoculadas. O procedimento de inoculação das moscas foi baseado nas metodologias descritas por Chamilos *et al* (2006) e Glittenberg *et al* (2011). Moscas (*D. melanogaster*) fêmeas com idade aproximada entre 4 a 10 dias de idade foram incluídas. Cada grupo foi composto por 10 moscas. Em todos os experimentos, as moscas foram inoculadas na região lateral do tórax com agulha estéril.

Cada grupo experimental incluiu 10 moscas, de cada de linhagem de *D. melanogaster*. Após a injeção os insetos foram colocados em seus respectivos potes (vials) identificados.

Na etapa 3, após 24h de infecção, realizou-se a determinação de unidades formadoras de colônia (UFC), segundo o método de Miles e Mirsa (1938). Três moscas fêmeas de cada linhagem foram sacrificadas por excesso de anestesia. A seguir, foram maceradas com auxílio de uma alça calibrada em um tubo eppendorf. Cada mosca foi macerada separadamente. Após, 1 ml NaCl 0,9% foi transferido para cada microtubo. Os microtubos foram agitados em vortex por 10 minutos e sonicados (50W) por 1 minuto para dispersão das células fúngicas.

O tubo inicial foi denominado 0 (puro) e com ele foram feitas 3 diluições seriadas na base 10 em NaCl 0,9%, obtendo-se as diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} . Após, em condições assépticas, 10 microlitros de cada suspensão foram semeados em placas contendo meio Sabouraud dextrose e/ ou em meio CHROMagar pelo método da gota. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas.

Na Etapa 4, foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônias/ mosca (UFC/ mosca).

8- Preparação ácido elágico (AE)

Em ambiente estéril, adicionou-se em tubo Falcon estéril 9,5 ml de água destilada autoclavada com pipeta sorológica. Após adicionou-se a 0,5 ml de NaOH 2M estéril com auxílio de uma pipeta automática de 1ml. Após, a solução foi agitada em vórtex por 2 minutos, preparando a solução de NaOH 0,1M.

Após, para o preparo de 5 ml de solução AE 5 mg/ml, 25 mg AE foi pesado diretamente no tubo de 15 ml e 5 ml de NaOH 0.1M estéril foi adicionado com o auxílio de uma pipeta automática. Após, a solução foi agitada em vórtex por 2 minutos e sonicada por 10 minutos. Ao final, filtrou-se utilizando uma membrana de 0,22 μ m acoplada a uma seringa.

9- Ensaio de efeito do ácido elágico

Inicialmente, as moscas dentro do padrão de idade estabelecido no modelo de infecção foram coletadas, conforme item 5 de metodologia. As moscas desse ensaio ficaram em vials vazios por 6-8 horas e depois foram transferidas para seus respectivos vials: grupo controle com alimentação normal e grupo da avaliação do bioativo, a concentração específica do AE em cada momento. Após, a cepa de *C. albicans* SC 5314 foi repicada, conforme item 2 de metodologia. No dia anterior ao ensaio, o meio de cultura para as moscas foi colocado em tubos Falcon de 50 ml. Utilizou-se volume padrão de 5 ml de meio de cultura para cada tubo.

Também em ambiente asséptico, uma parte do meio de cultura da mosca contendo AE foi preparado formando uma composição homogênea. A solução de AE foi sonicada por 10 minutos antes do preparo para homogeneização. Cada ensaio realizado constituiu-se de uma concentração específica do AE. As concentrações avaliadas foram 3,2 μ g/ml, 6,4 μ g/ml e 32 μ g/ml. Os ensaios foram realizados com as moscas wt e TL, sendo n=20 para cada grupo.

Para avaliação do efeito do ácido elágico, 4 grupos experimentais foram incluídos no estudo.

Grupo 1- Moscas alimentadas com meio de cultura contendo ácido elágico (3,2 μ l/ml ou 6,4 μ l/ml ou 32 μ l/ml) e inoculadas com *C. albicans* SC 5314;

Grupo 2 – Moscas alimentadas com meio de cultura controle (sem ácido elágico) e inoculadas com *C. albicans* SC 5314;

Grupo 3 – Moscas alimentadas com meio de cultura controle, não puncionadas e não inoculadas;

Grupo 4 – Moscas alimentadas com meio de cultura controle, submetidas ao processo sham de inoculação (somente submetidas à punção, porém sem inoculação de *C. albicans*).

As moscas foram armazenadas em temperatura ambiente. Após 3 horas do ensaio, as moscas que morreram foram excluídas da análise de sobrevivência. Diariamente, a avaliação de sobrevivência foi realizada durante 8 dias, sempre no mesmo horário. Foram anotadas as quantidades de moscas vivas, mortas e outras ocorrências (como a fuga de moscas). O meio de cultura de cada vial foi trocado diariamente.

10- Toxicidade

Inicialmente, as moscas dentro do padrão de idade estabelecido no modelo de infecção foram coletadas, conforme item 5 de metodologia. Para o preparo do meio de cultura para as moscas, primeiramente o ácido elágico foi sonificado (50 W) por 10 minutos e depois adicionado nas concentrações-teste. A seguir, um volume de 5 ml foi distribuído em vials identificados.

O efeito do ácido elágico foi avaliado por 4 grupos em diferentes concentrações para moscas wt e Toll mutante, não infectadas, com N= 20 para cada grupo avaliado. Antes de serem alimentadas com o preparo, ficaram sem alimentação por aproximadamente 3 horas. A toxicidade do ácido elágico foi analisada por 8 dias consecutivos, realizando troca diária dos vials com o conteúdo específico.

As concentrações-teste do ácido elágico foram: Grupo 1 – 3,2 µg/ml AE; Grupo 2- 6,4 µg/ml AE e Grupo 3- 32 µg/ml AE. Foi incluído um grupo controle (grupo 4), no qual não foi adicionado o ácido elágico.

5- RESULTADOS

As inoculações fúngicas nas moscas wt e T1 mutantes foram feitas inicialmente com cepas de *Candida albicans* ATCC 18804, pelo método de suspensão de células. Essa cepa não causou infecção no modelo *Drosophila melanogaster*. Por essa razão utilizou-se uma cepa de *Candida albicans* mais virulenta, a SC 5314.

Os animais receberam o inóculo de *C. albicans* SC 5314 com suspensão de 2×10^8 células/ml, conforme o realizado por Chamilos *et al.* (2006). Nesse caso, o processo de infecção para cada grupo de moscas, houve apenas 10% de sobreviventes, para wt. No período de 24h, as colônias crescidas na placa de meio SD eram relativamente pequenas e assim a placa foi incubada por mais um período de 24h, totalizando 48 horas (Fig 7). A seguir, foi realizada contagem de UFC (Unidade Formado de Colônias) / moscas.

Obtivemos um valor de $1,8 \times 10^3$ UFC/ mosca. Esses valores estão de acordo com Chamilos *et al.* (2006) e Glittenberg *et al.* (2011), que prepararam uma suspensão de *Candida* contendo, respectivamente, 1×10^8 e 2×10^8 células/ml, e estimaram, respectivamente, uma contagem de 8×10^2 e $2,1 \times 10^3$ UFC/ mosca. Embora esses valores estejam de acordo com a literatura, o número de moscas sobreviventes após esse modo de injeção foi baixo (apenas 10%). Além disso, em alguns casos, não foi verificada infecção em certas moscas. Por essa razão, decidiu-se trabalhar com inoculação direta de *C. albicans* a partir do crescimento em placa de SD.

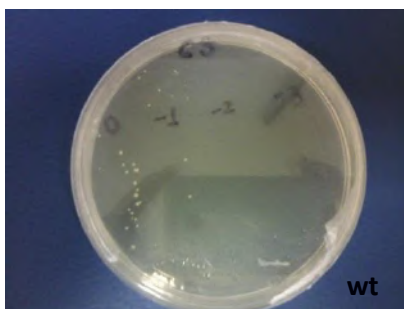


Fig. 7: Método de Miles e Mirsa de contagem de UFC/ml.

Com a infecção das moscas retirando o patógeno diretamente da placa e injetando na região torácica lateral do animal, obtiveram-se os seguintes dados tabelados de UFC/ mosca (Tabela 1).

Experimento	Tipo de linhagem <i>D. melanogaster</i>	Sobreviventes	Contagem (UFC/ mosca)	
Experimento 1 (sem lavagem das células de <i>C. albicans</i> em PBS)	wt	50%	wt 1	$1,5 \times 10^4$
			wt 2	$2,9 \times 10^5$
			wt 3	$2,3 \times 10^5$
	Toll	70%	Toll 1	$2,7 \times 10^4$
			Toll 2	$2,6 \times 10^4$
			Toll 3	9×10^3
Experimento 2 (com lavagem das células de <i>C. albicans</i> em PBS)	wt	10%	wt 1	$1,1 \times 10^3$
	Toll	30%	Toll 1	8×10^3
			Toll 2	11×10^3
			Toll 3	7×10^2

Tabela 1: Contagem UFC/ mosca após os experimentos

O experimento de inoculação direta da placa foi realizado em duplicata em dias diferenciados e obtiveram-se os seguintes resultados de UFC/mosca (Tabela 2).

Experimento	Tipo de linhagem <i>D. melanogaster</i>	Sobreviventes	Contagem (UFC/ mosca)	
Experimento 3 (sem lavagem das células de <i>C. albicans</i> em PBS)	wt	10%	wt 1	8×10^3
	Toll	30%	Toll 1	5×10^2
			Toll 2	4×10^2

Tabela 2: Contagem UFC/ mosca após os experimentos

Os experimentos realizados em meio SD demonstraram crescimento de colônias de *Candida*, porém muito pequenas em relação ao costumeiro e com isso fez-se necessária a obtenção de esfregaços corados pela técnica de Gram para analisar as células crescidas em placa. Foram observadas células Gram-positivas leveduriformes (Fig.8). No entanto, como no meio de cultura para a *Drosophila melanogaster* há fermento biológico composto por fungos, fez-se necessário realizar novos experimentos em placas com meio de cultura Chromagar, diferencial para cepas de *Candida albicans* e que, conseqüentemente, comprovou a presença das mesmas.

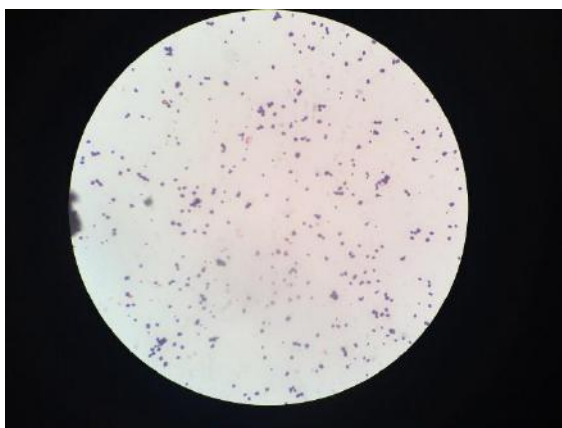


Fig. 8: Técnica de Gram para comprovação morfológica dos micro-organismos recuperados do modelo de *Drosophila melanogaster*.

Nesse procedimento foi possível verificar o crescimento de colônias nas placas com meio seletivo para *C. albicans*, em todas as placas cultivadas em estufa no período

de 24h (Fig.9). Foi observado a coloração esverdeada, típico para *C. albicans*. Esse experimento foi realizado em duplicada.

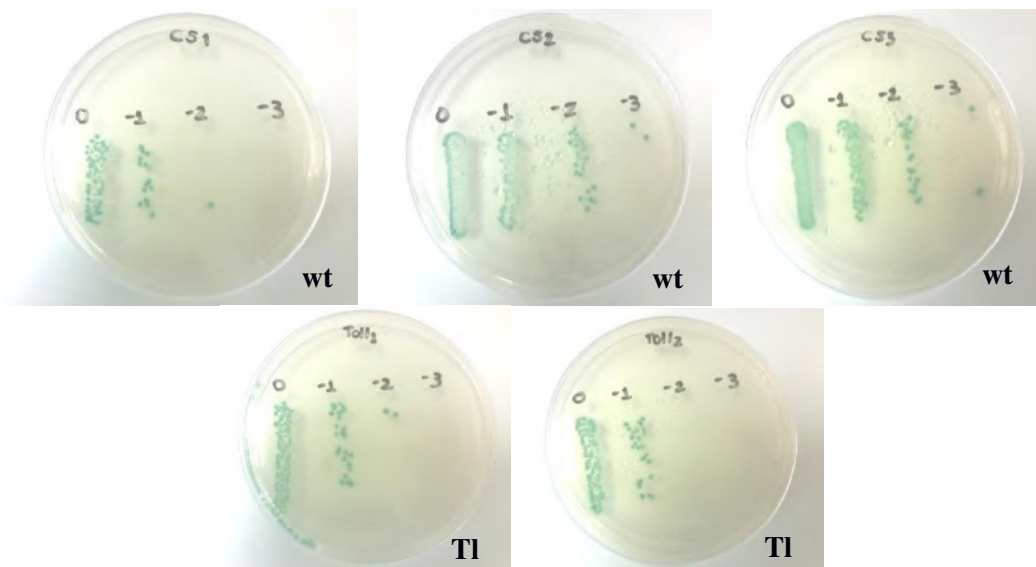


Fig.9: Colônias sugestivas de *C. albicans* em meio CHROMagar crescidas a partir de material recuperado de *Drosophila melanogaster*.

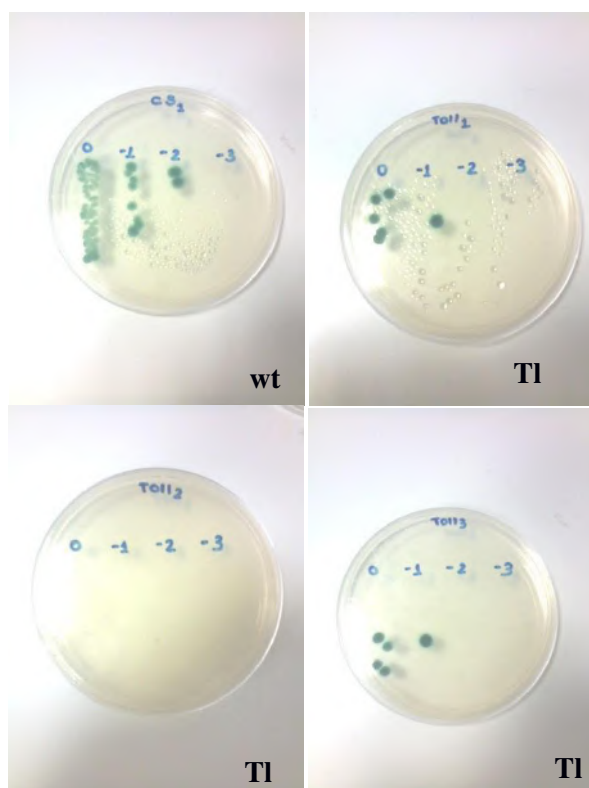


Fig.10: Colônias sugestivas de *C. albicans* em meio CHROMagar crescidas a partir de material recuperado de *Drosophila melanogaster*.

No experimento com cepas de *Candida* previamente lavada com solução PBS também houve crescimento de colônias de *Candida* em meio de cultura seletivo, no período de 24 horas. Somente a placa referente a Toll 1 encontrava-se ainda esverdeada. (Fig.10)

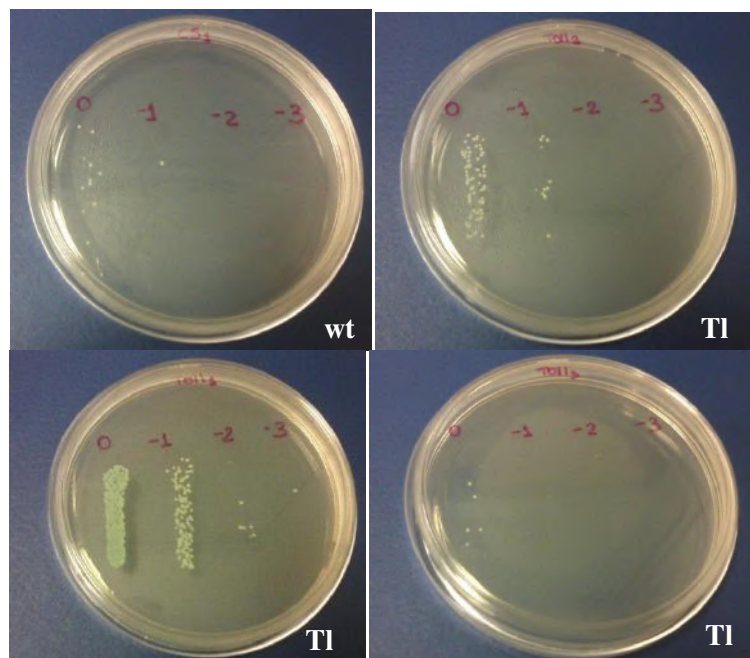


Fig.11: Colônias observadas após 24h de incubação. Material recuperado das moscas homogeneizadas em solução de PBS e semeadas em ágar Sabouraud dextrose.

Observou-se que o ácido elágico nas concentrações 3,2 e 6,4 $\mu\text{g/mL}$ apresentou um efeito protetor para as moscas Toll mutante infectadas com *C. albicans*.

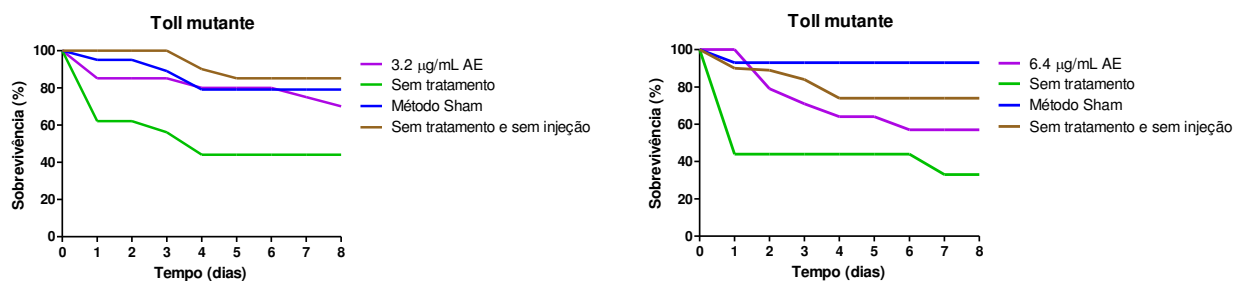


Figura 12. Curva de sobrevivência das moscas Tl mutantes infectadas com *C. albicans* e tratadas com concentrações de 3,2 (Figura 1-A) e 6,4 $\mu\text{g/mL}$ (figura 1-B) de ácido elágico.

O ácido elágico nas concentrações 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ apresentou um efeito protetor para as moscas Toll mutante infectadas com *C. albicans*.

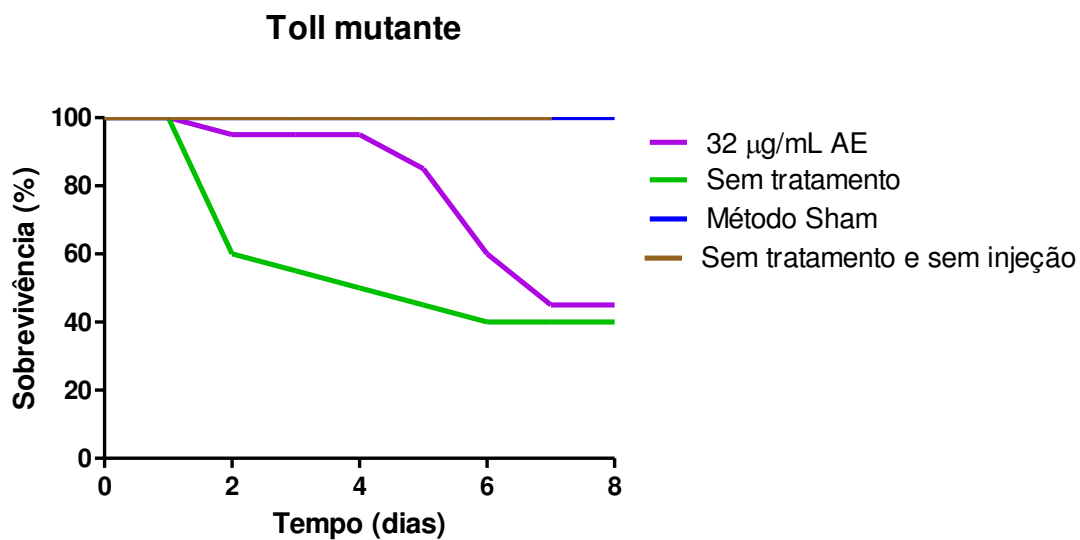


Figura 13 - Curva de sobrevivência das moscas Tl mutante infectadas com *C. albicans* e tratadas com concentração de 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ácido elágico.

Para as moscas wt infectadas com *C. albicans* não houve um efeito protetor do ácido elágico a 3,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

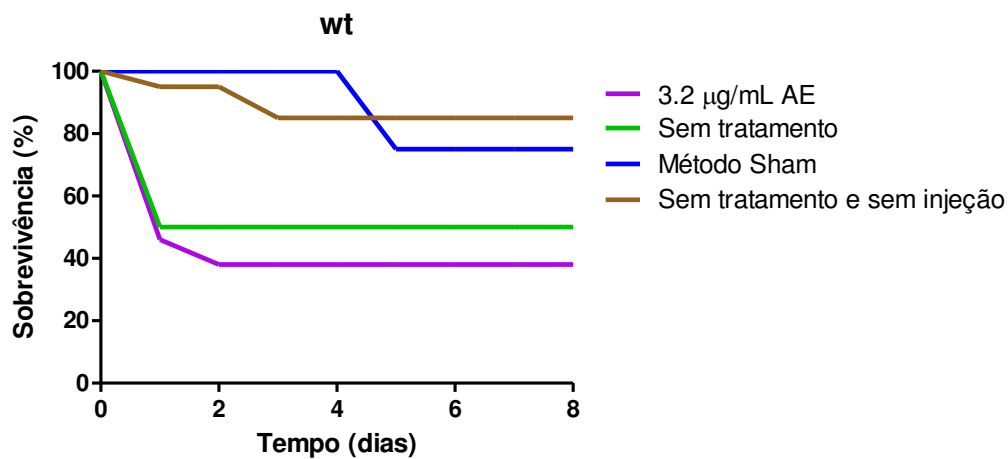


Figura 14 - Curva de sobrevivência das moscas wt infectadas com *C. albicans* e tratadas com concentração de 3,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ácido elágico

O ácido elágico nas concentrações 6,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ não apresentou um efeito protetor para as moscas wt infectadas com *C. albicans*.

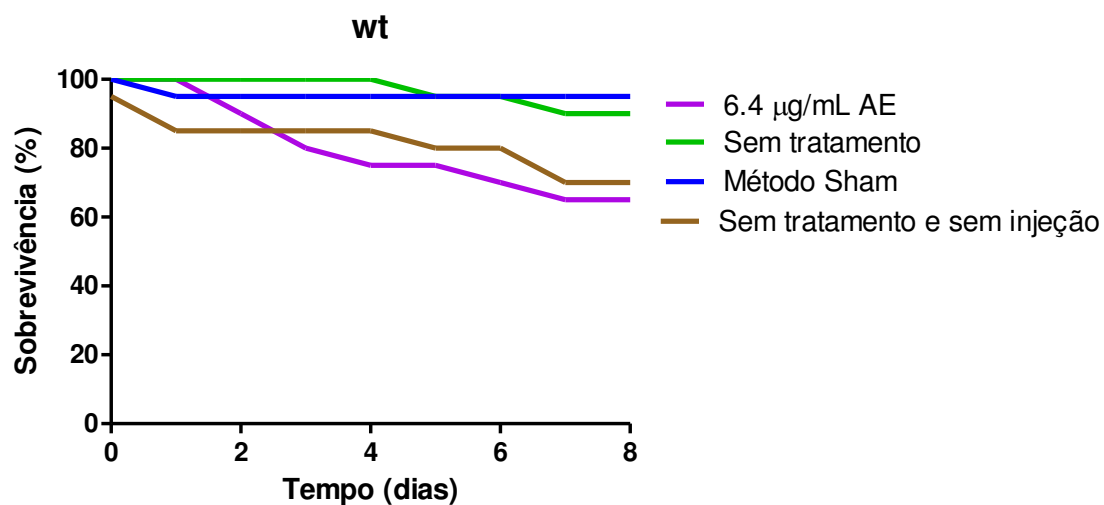


Figura 15 - Curva de sobrevivência das moscas wt infectadas com *C. albicans* e tratadas com concentração de 6,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ácido elágico

Na concentração mais elevada (32 $\mu\text{g}/\text{mL}$) nota-se um efeito protetor do ácido elágico para moscas wt.

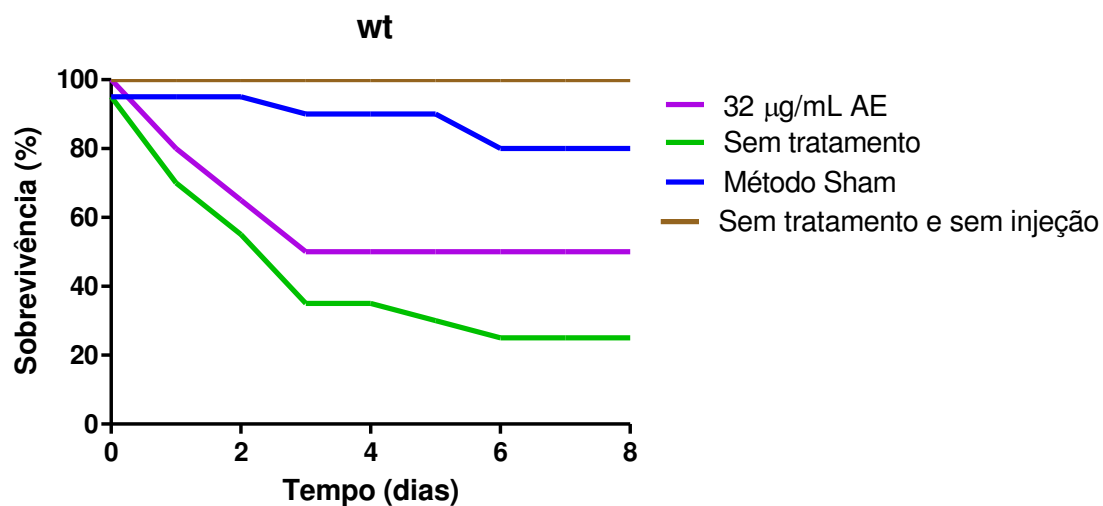


Figura 16 - Curva de sobrevivência das moscas wt infectadas com *C. albicans* e tratadas com concentração de 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ácido elágico

Observou-se no ensaio de toxicidade que o bioativo não se mostrou tóxico para ambas as linhagens de moscas (Figura 17). Tanto para moscas Toll mutante como para wt, a porcentagem de sobrevivência manteve-se acima dos 80% com tratamento com até 32 $\mu\text{g/ml}$ e 8 dias de tratamento.

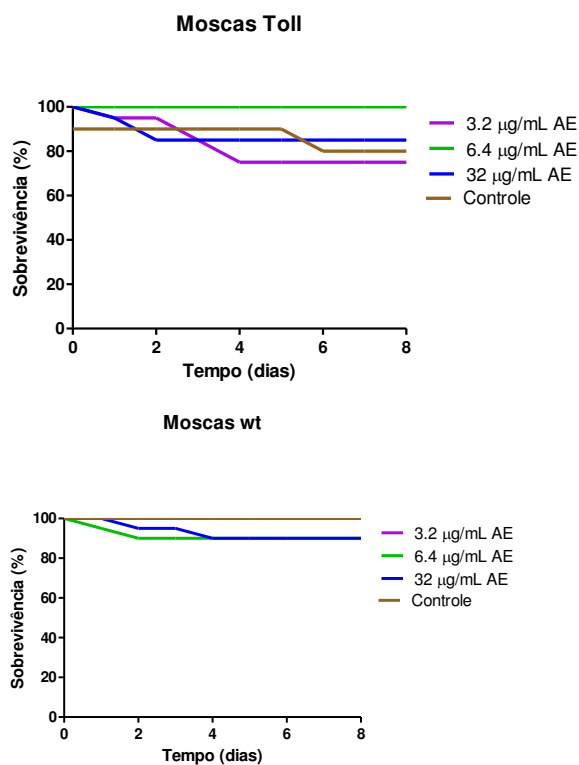


Figura 17 - Curva de toxicidade das moscas Toll mutante e wt , nas concentrações de 3.2 $\mu\text{g/mL}$, 6.4 $\mu\text{g/mL}$ e 32 $\mu\text{g/mL}$ de ácido elágico

6- DISCUSSÃO

A estação anestésica de CO₂, instalada no laboratório para manipular a espécie de *Drosophila melanogaster* durante todo o estudo, mostrou-se efetivas, com resultados semelhantes aos obtidos por um sistema anestésico padrão. (ARTISS & HUGHES, 2007). É necessária a precaução de se controlar o nível da saída do CO₂ para evitar o excesso de absorção do gás pelas moscas. Portanto, o sistema implementado ofereceu um custo/benefício baixo com o uso de objetos fáceis de encontrar. O sistema empregado ainda oferece benefício sustentável, por utilizar a reciclagem de material laboratorial.

Em relação ao modelo de infecção na espécie *Drosophila melanogaster* foi padronizado o método invasivo de retirada do inóculo diretamente da placa devido à dificuldade de infecção à mosca pelo método de diluição das leveduras, na concentração de 2×10^8 células/ml.

Os resultados mostraram que as moscas *D. melanogaster* foram infectadas com sucesso por *C. albicans* SC 5314. O experimento 1 (sem lavagem da suspensão de *C. albicans* em PBS) demonstrou maior sobrevivência das moscas e uma menor variação do número de UFC/mosca, sendo a metodologia que foi adotada para os próximos passos.

A inoculação de *C. albicans* SC 5314 foi um procedimento trabalhoso, porém não impossível de ser realizado, demonstrando-se um procedimento que requer cuidado, dedicação e repetições.

Por razões ainda não elucidadas foi possível perceber que foi mais difícil manter a infecção fúngica nas moscas wt em relação as moscas Tl mutantes. Contudo, foi possível observar pela contagem de células por plaqueamento que foram as wt que apresentaram maior nível de inoculação quando comparadas com as Toll, parecendo mais suscetíveis à colonização fúngica. Porém, tal fato também pode acontecer devido à quantidade fúngica inoculada em cada mosca que não foi possível de ser medida. Por isso, desejamos em estudos futuros padronizar a quantidade inoculada, para uma melhor análise estatística.

Em relação ao ensaio realizado com ácido elágico foi possível verificar um efeito protetor nas moscas Toll mutante, não ocorrendo o mesmo para as moscas wt.

Hipoteticamente, acredita-se que pode haver um efeito diminuído do ácido elágico nas moscas wt devido à maior carga fúngica observada nessa linhagem em relação as Toll. Estudos futuros aumentando a concentração de ácido elágico para o tratamento desse grupo podem elucidar essa hipótese.

Em relação ao ensaio de toxicidade observou uma sobrevivência elevada das moscas analisadas, demonstrando que o AE não se mostrou tóxico para as *D. melanogaster* avaliadas.

Os resultados realizados no estudo comprovam a infecção de *C. albicans* em modelo de *D. melanogaster* no período de 24 horas e um efeito do bioativo sobre moscas Toll mutante. Espera-se, com o domínio da técnica de inoculação de *Candida* em *D. melanogaster* e padronização do inóculo, aumentar o número de sobreviventes, possivelmente controlando melhor a profundidade da agulha na lateral do tórax da mosca anestesiada e determinando a quantidade inoculada. Em perspectiva, far-se-á a realização das próximas etapas do estudo, que consiste na repetição da verificação do efeito de ácido gálico *in vitro* e em modelo de *Drosophila melanogaster*, através da curva de sobrevivência, da contagem da carga microbiana e a realização de novos experimentos envolvendo a determinação da toxicidade com uma concentração de bioativo mais elevada e análise histopatológica.

7- CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, conclui-se que: wt sobreviveram menos que as Toll mutantes após infecção fúngica;

- A aplicação do modelo de *Drosophila melanogaster* para o estudo do efeito antifúngico contra *Candida albicans* foi bem sucedida.
- wt teve maior nível de infecção fúngica que moscas Toll mutantes.

A respeito do efeito do bioativo natural, ácido elágico:

- Houve efeito protetor nas moscas Toll mutante em todas as concentrações;
- Na concentração mais elevada de 32 $\mu\text{g/mL}$ notou-se um efeito protetor do ácido elágico em moscas wt.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABREU, *et al.* **Resurgence of the interest in plants as sources of medicines and resistance-modifying agents.** *Formatex.* p. 1287 – 1297. 2013

ÁLVARES, *et al.* **Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras.** *Bra. Patol. Med. Lab.* V. 43 n. 5 p. 319-327. Out 2007.

ARTISS, T. & HUGHES, B. **Taking the headaches out of anesthetizing drosophila.** *The American Biology Teacher.* Online publication. October 2007.

BARBEDO, L. S. & SGARDI, D. BG. **Candidíase. DST - J. Bras. Doenças Sex Transm.** p. 22-38. 2010. Disponível em: <http://www.dst.uff.br/revista22-1-2010/4-%20Candidiase.pdf>. Acessado em 28 maio 2016.

THOMAS, Julian. **Bio solutions. Toll-like receptor.** Disponível em: <http://bioisolutions.blogspot.com.br/2009/05/toll-like-receptor.html>. Acessado em: 31 maio 2016

BIOSYSTEMS. Disponível em: <http://www.biosystems.com.br/produto/1441/o-agar-sabouraud-dextrose-e-usado-para-cultivo-de-bolores-leveduras-e>. Acessado em: 10 mar 2016

BRITO, G.N.B.*et al.* **In vitro antifungal susceptibility of Candida spp. oral isolates from HIV-positive patients and control individuals.** *Brazilian Oral Research* v. 25 p. 28-33. 2011.

BRODY, T. B. **Biological Overview.** 3 jul 1997. Disponível em: <http://www.sdbonline.org/sites/fly/torstoll/toll1.htm>. Acesso em: 30 maio 2016.

CASTRO, T. L. *et al.* **Mecanismo de Resistência da Candida SP WWA Antifúngicos.** *Infarma.* v 18, n 9/10. 2006.

CHAMILOS G, *et al.* **Drosophila melanogaster as a facile model for large-scale studies of virulence mechanisms and antifungal drug efficacy in Candida species.** *J Infec Dis (JID).* v. 193 p. 1014 – 1022. 1 abril. 2006.

DAVIS, *et al.* **Wild-type *Drosophila melanogaster* as a model host to analyze nitrogen source dependent virulence of *Candida albicans*.** Plosone. Vol 6. Nov. 2011.

DICKINSON, Becton. Germany 2014. Disponível em:
<https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=9113>. Acessado em: 10 mar 2016

FAGUNDES, D. J & TAHA, M. O. **Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécie de animais de uso corrente.** Acta Cirúrgica Brasileira. v. 19 n 1. Pag. 59-65. Jan- Fev 2004

FERRAZ, E. G. *et al* **Receptores Toll-Like: ativação e regulação da resposta imune.** Rev. Gaúcha Odontol.. v. 59. n. 3 p. 483-490. jun-set. Porto Alegre. 2011.

FLYBASE. Disponível em: www.flybase.org. Acesso em 10 de abril de 2016

GLITTENBERG, *et. al.* **Wild-type *Drosophila melanogaster* as an alternative model system for investigating the pathogenicity of *Candida albicans*.** Dis. Model. Mech. v. 4. n 4.p. 504 – 514. Jul 2011

MILES AA & MISRA SS. **The estimation of the bacteriocidal power of blood.** J Hyg Edição. 38°. p. 732-749. 1938.

MORALES, M. M.. **Métodos alternativos à utilização de animais em pesquisa científica: mito ou realidade?** Experimentação Animal/Artigos, v.60, n.2, p.33-36, 2008.

MORI, Lyria. **Gene White e o mutante de olhos brancos de *Drosophila melanogaster*.** Genética na Escola. Rev. Sociedade Brasileira de Genética. v 7. p. 97 - 101. n 2. 2012

MOUSSIAN, B. & ROUTH, S. **Dorsoventral axis formation in the *Drosophila* embryo – shaping and transducing a morphogen gradient.** Curr. Biol. Vol 15 n 21. Nov. 8. 2005

GLÓRIA, E. C. **Caracterização Físico –Química de Frutos de Mirindiba (*Buchenavia tomentosa Eichler*), do Cerrado Tocantinense.** Universidade Federal do Tocantins – UFT. Gurupi, TO. 2014.

OLIVEIRA, L. M. G. B. & KANASHIRO, M. M. **Imunologia**. Vol. 1 Fundação CECIERJ. Rio de Janeiro. 2013

ORESTES. **Orestes decifra Drosophila**. 61 edição. San. 2001. Disponível em: revista.pesquisa.fapesp.br/2001/01/01orestes-decifre-drosophila/. Acessado em: 31 maio 2016.

SHUTTERSTOCK. Disponível em www.yourgenome.org.. Acessado em: 3 de maio de 2016.

BUGGUIDE. Disponível em: www.uniprnt.org... Acessado em: 3 de maio de 2016.

ROCHA, L. D. L. S., *et al.* ***Drosophila* : um importante modelo biológico para a pesquisa e o ensino de genética**. Scire Salutis, Aquidabã. V.3, n. 1, p. 37-48, 2013.

SILVA, Ivana. **Moscas**. Disponível em : <http://www.fiocruz.br/biosseguranca/Bis/infantil/moscas.htm>. Acessado em : 06 jul 2016.

SOUZA, A. W. S. *et al.* **O. Sistema Imunitário- Parte III. O delicado equilíbrio do sistema imunológico entre os pólos de tolerância e autoimunidade**. Rev. Bras. Reumatol. 2010; 50 (6); p. 665-694.

STOKES, B. A. *et al.* **Bacterial and Fungal Pattern Recognition Receptors in Homologous Innate Signaling Pathways of Insects and Mammals**. Front. Microbiol. 28 jan 2015. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2015.00019/full>. Acessado em: 31 maio 2016

TAMURA, N. K. *et al.* **Fatores de Virulência de *Candida* spp. Isoladas de Cateteres Venosos e Mãos de Servidores Hospitalares**. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. v.40 n 1 p. 91-93. jan-fev. 2007.

TEODORO, *et al.* **Antifungal activity of extracts and isolated compounds from *Buchenavia tomentosa* on *Candida albicans* and non – *albicans*.** Future Microbiol. 10º edição. n 6. p. 917-927. 2015.

UNIVERSITY OF MIAMI –College of Arts & Sciences. **Cellular Differentiation and More Binary Decisions: somatic or germline?** Disponível em: <http://www.bio.miami.edu/dana/pix/spaetzle.jpg>. Acessado em 30 maio 2016.

WILLIAMS, D.W.*et al.* **Interactions of with host epithelial surfaces.** J Oral Microbiol. 5: 22434. 2013.