

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
DISCIPLINA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE FARMÁCIA

***Galleria mellonella* como modelo experimental para infecções
causadas por leveduras de interesse médico: uma revisão**

KIMBERLY IWANCZUK

PORTO ALEGRE, JUNHO DE 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
DISCIPLINA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE FARMÁCIA

***Galleria mellonella* como modelo experimental para infecções
causadas por leveduras de interesse médico: uma revisão**

KIMBERLY IWANCZUK

ORIENTADORA: Dra. Danielle Silva Trentin

COORIENTADOR: Prof. Dr. Alexandre José Macedo

PORTO ALEGRE, JUNHO DE 2016

Este trabalho está escrito conforme as normas do Periódico *Clinical & Biomedical Research* (Revista HCPA) para posterior submissão.

(Anexo 1)

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.
(Martin Luther King)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, especialmente aos meus pais, pelo amor e carinho em toda minha vida. Muito obrigada pela educação, pelo incentivo diário e principalmente por sempre acreditarem em mim. Obrigada pela preocupação, atenção e cuidado. Agradeço por proporcionarem a realização de um sonho e participarem comigo dele. Á minha mana Nikole, por ser essa querida irmã e amiga sempre presente nas minhas dificuldades, me apoiando e incentivando com palavras carinhosas. Ao Lucas, meu namorado que me acompanhou em toda esta jornada acadêmica. Agradeço pela compreensão da dura rotina da faculdade, pelo amor e apoio! Muito obrigada pela ajuda em diversos momentos.

Á Dra. Danielle Trentin, que atenciosamente me ajudou a construir este trabalho, se tornando um grande exemplo para mim. Muito obrigada pelos ensinamentos, pela paciência, pela orientação e pelo carinho direcionado na orientação deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Alexandre José Macedo, pela co-orientação, pelos ensinamentos, pelas dicas e por ter sido um ótimo professor durante a graduação.

Aos meus amigos (as) e colegas de faculdade, pela amizade construída durante esses anos, nos estudos em grupo e pelo incentivo durante estes semestres.

Agradeço a todos que durante minha graduação contribuíram direta ou indiretamente para minha formação.

A todos o meu muito obrigada.

***Galleria mellonella* como modelo experimental para infecções causadas por leveduras de interesse médico: uma revisão**

Kimberly Iwanczuk¹, Alexandre José Macedo^{1,2}, Danielle Silva Trentin^{1,2}

¹ Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS, Brasil

² Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS, Brasil

Resumo:

As infecções fúngicas são um problema crescente de saúde pública, pois apresentam diagnóstico difícil e tratamento longo. Em indivíduos imunocomprometidos, a alta prevalência de infecções causadas por leveduras oportunistas é preocupante, sendo de extrema importância a identificação de alvos moleculares essenciais para a patogenicidade fúngicas, bem como a busca por novas opções terapêuticas. Para tanto, se faz necessário o uso de modelos *in vivo* de infecção, sendo os modelos mamíferos de ratos e camundongos comumente utilizados. No entanto, o interesse por modelos animais alternativos tem aumentado nos últimos anos, evidenciando o uso do inseto *Galleria mellonella* como hospedeiro experimental para a avaliação da interação hospedeiro-patógeno, da virulência de isolados clínicos e da eficácia antifúngica. Os principais benefícios do uso deste inseto como hospedeiro incluem: a resposta imunológica inata semelhante à dos seres humanos, a relativa facilidade de manutenção laboratorial das larvas e ausência de restrição ética até o momento. O presente trabalho se propõe a fazer uma discussão sobre a crescente utilização do modelo invertebrado de larvas de *G. mellonella* em infecções fúngicas causadas por leveduras de importância médica, destacando as principais vantagens e desvantagens frente a outros invertebrados e os desafios do modelo.

Palavras-chave: *Galleria mellonella*, modelo de infecção, leveduras, *Candida* spp., *Cryptococcus* spp.

Abstract

Fungal infections are a growing public health problem, since they present difficult diagnosis and long treatment. In immunocompromised individuals the high prevalence of infections caused by opportunistic yeast is worrying, being of extremely importance the identification of molecular targets essential for fungal pathogenicity and the search for new therapeutic options. Therefore, the use of *in vivo* models of infection is necessary, and the mammalian models, such as rats and mice are commonly used. However, interest in alternative animal models has been increasing in recent years, evidencing the use of the insect *Galleria mellonella* as experimental host for the evaluation of the host-pathogen interaction, of the virulence of clinical isolates and of antifungal efficacy. The main benefits of using this insect as a host include: the innate immune response similar to that of humans, the relative easiness of laboratory maintenance of larvae and because there is no ethical constraint to date. This paper aims to discuss about the growing use of invertebrate model of *G. mellonella* larvae in fungal infections caused by medically important yeasts, highlighting the main advantages and disadvantages compared to other invertebrates and the challenges of the model.

Key-words: *Galleria mellonella*, infection models, yeasts, *Candida* spp., *Cryptococcus* spp.

1. Introdução

A partir de 1980 os fungos emergiram como uma das principais causas de infecções em humanos¹. Essa incidência crescente de doenças fúngicas se atribui ao aumento da população imunocomprometida, incluindo pacientes transplantados, HIV positivos, recém-nascidos prematuros, pacientes com câncer, pacientes em recuperação de cirurgia de grande porte e idosos^{2,3}.

Infecções fúngicas por patógenos oportunistas *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp. estão sendo cada vez mais descritas^{4,5}. Somente nos Estados Unidos, foi identificado um aumento de 207% no número de sepses causadas por fungos em aproximadamente vinte anos¹. Considerando *Cryptococcus* spp., a meningite criptocócica em pacientes HIV positivos é a infecção oportunista mais preocupante e pode ser fatal se não for tratada⁶. A incidência em regiões subdesenvolvidas é elevada e estima-se 650.000 mortes por ano⁷. Cerca de 1 milhão de casos foram registrados em todo o mundo em 2006, sendo a África subsaariana a região com maior prevalência⁶.

Outra levedura que se destaca pela patogenicidade é *Candida* spp. Esta levedura faz parte da microbiota normal humana, podendo ser isolada a partir da mucosa oral, trato gastrointestinal e trato genital de indivíduos saudáveis⁸. Segundo Ho et al (2015)², *Candida* spp. é a quarta principal causa de infecções na corrente sanguínea. Dentre as espécies de *Candida*, a mais conhecida e estudada é a *Candida albicans*, a qual coloniza as membranas mucosas de aproximadamente 30 a 60% dos humanos e também é a principal responsável pelas infecções invasivas^{9,10}. De fato, *C. albicans* é considerada a quarta principal causa de infecções relacionadas a cateter vascular, apresentando uma alta taxa de mortalidade¹⁰, e a terceira causa de infecções urinárias relacionadas a sondas. No entanto, um aumento significativo das infecções produzidas por *Candida não-albicans* tem sido reportado nos últimos anos¹¹, como por exemplo *Candida parapsilosis*, a qual tem causado milhares de infecções hospitalares, segundo Németh et al (2013)¹². Interessantemente, algumas *Candida não-albicans* podem ser intrinsecamente resistentes aos antifúngicos da classe dos azóis e apresentam uma reduzida sensibilidade aos demais antifúngicos.

Outra importante problemática com relação às infecções fúngicas causadas por leveduras é a formação de biofilmes. Estimativas sugerem que a maioria das infecções hospitalares estão associadas à formação de biofilmes, estando intimamente relacionadas com o uso de cateteres e sondas. Estes dispositivos médicos muitas vezes são essenciais no tratamento e suporte dos pacientes, mas acabam sendo a porta de entrada para patógenos oportunistas, especialmente em pacientes em condições debilitadas¹³. Ainda, o diagnóstico laboratorial dos fungos é muitas vezes complicado e demorado, dificilmente atingindo-se a identificação em nível de espécie, e o tratamento geralmente é longo. Associado a isto, a limitada disponibilidade de medicamentos e uso massivo de antifúngicos na profilaxia, como por exemplo o fluconazol, levam à seleção de cepas fúngicas patogênicas resistentes.

Desta forma, a identificação de alvos moleculares importantes para a patogênese fúngica, o desenvolvimento de novos antimicrobianos e a avaliação de terapias combinadas já disponíveis comercialmente se tornam essenciais na busca por alternativas terapêuticas. Para estes estudos, modelos animais de infecção são ferramentas úteis, especialmente para avaliação da eficácia e da toxicidade de compostos e fármacos¹⁴. As larvas de *G. mellonella* têm se destacado nos últimos anos como alternativa aos modelos de estudo convencionais com animais mamíferos, principalmente ratos e camundongos, e estudos publicados recentemente na literatura têm destacado os benefícios do uso das larvas de *G. mellonella* como hospedeiro experimental para infecções fúngicas. Assim, o presente trabalho se propõe a revisar sistematicamente os artigos científicos que utilizam larvas de *G. mellonella* como modelo experimental para o estudo de infecções leveduriformes. Para tanto, foram realizadas buscas em três bases de dados: PubMed, Science Direct e Web of Science, utilizando como palavras-chave: "*Galleria mellonella*", "yeast" e "virulence".

2. O inseto *Galleria mellonella*

Galleria mellonella é um inseto pertencente à ordem Lepidoptera e à família Pyralidae¹⁵. Comumente conhecida como traça da cera de abelha, é considerada uma praga de apiários comerciais, principalmente em países de clima subtropical ou temperado e são consideradas o segundo fator de prejuízo para os apicultores norte-americanos¹⁶. Possui vasta distribuição geográfica graças a sua capacidade de sobreviver em ambientes com baixas temperaturas¹⁷. Segundo Nomura et al (2006)¹⁶, as larvas ou lagartas de *G. mellonella* são frequentemente utilizadas como iscas de pescaria em várias regiões da Europa e dos Estados Unidos, além de servir como alimento-vivo para várias espécies de animais insetívoros. O ciclo de vida do invertebrado *G. mellonella* inclui sete estágios larvais, o estágio de pupa, o estágio de mariposa e o estágio de ovos (Figura 1).

A duração da fase larval pode variar de 34 a 48 dias. Dependendo da temperatura ou em caso de escassez de alimento, poderá ocorrer um período de repouso na fase larval, tendo sido constatadas variações de até seis meses¹⁷. As mariposas adultas fêmeas possuem ovopositor prolongado que permite encaixar os ovos nas frestas e aberturas das colméias, impedindo a retirada dos ovos pelas abelhas. Após a eclosão, as larvas se alimentam do mel e da cera dos favos. Podem ser colocados de 50 a 100 ovos por ciclo¹⁸, os quais são brancos e elípticos medindo 1- a 2 mm por 0,83 mm, com período embrionário de 2 a 4 dias. As mariposas adultas têm uma longevidade aproximada de uma semana. O tamanho e cor dos adultos podem variar consideravelmente, dependendo da composição e abundância de alimento. Em média, as mariposas machos medem 21 mm enquanto as fêmeas são maiores, com aproximadamente 32 mm, tendo um período de pré-oviposição de 4 a 10 dias. Os adultos da traça caminham rapidamente de um lado para outro, fazendo apenas vôos curtos e não se alimentam, pois, suas peças bucais são atrofiadas¹⁷.



Figura 1. Fases do ciclo de vida do inseto *G. mellonella*. (A) Larva com aproximadamente 2,5 cm de comprimento, correspondendo ao último estágio larval, o qual é comumente utilizado nos experimentos de infecção; (B) casulo de seda prévio à transformação em pupa, (C) estágio de pupa e (D) estágio adulto de mariposa. Foto obtida no Laboratório de Biofilmes e Diversidade Microbiana da UFRGS.

O interesse no uso de larvas de *G. mellonella* como alternativa aos modelos de estudo mamíferos tem aumentado nos últimos anos. O grande diferencial para utilização das larvas de *G. mellonella* como hospedeiro experimental é seu sistema imunológico. O inseto possui sistema imune inato constituído pela resposta imunológica celular e humoral. A resposta imune inata celular envolve funções como fagocitose, encapsulamento e coagulação¹⁹. A hemolinfa, contida na cavidade do corpo de insetos, possui função análoga à do sangue nos mamíferos, como transporte de nutrientes, produtos residuais e sinalização de moléculas²⁰. As células fagocitárias conhecidas como hemócitos estão presentes na hemolinfa, em órgãos internos, como na gordura corporal, e no aparelho digestivo^{15,21}. Seis tipos de hemócitos já foram identificados em *G. mellonella*, incluindo pró-hemócitos, plasmatócitos, células granulares, coagulócitos,

esferulócitos e oenocitoides^{15,19}. Já o elemento humoral da resposta imune é composto por peptídeos antimicrobianos (PAM's) que são liberados por células e órgãos na hemolinfa e se difundem para o local da infecção²². Estes peptídeos reconhecem o ácido fosfolípido da membrana celular de micro-organismos patogênicos, levando a alterações na membrana celular. Alguns PAM's descritos em *G. mellonella* incluem o inibidor da metaloproteínase indutível, a transferrina, a galiomicina e a gallerimicina²³. Adicionalmente, o inseto também possui a cutícula, que serve como barreira ao ambiente externo, com função semelhante à pele em humanos¹⁹.

3. *Galleria mellonella* x outros modelos invertebrados

Diversas espécies de mamíferos são utilizadas para elucidar a resposta imunológica do hospedeiro no combate a infecções e contribuem para o entendimento das interações entre fungos e hospedeiros²⁴. Segundo García-Rodas et al (2011)⁷, a virulência dos patógenos humanos é classicamente estudada em modelos de mamíferos e os ratos são a espécie mais amplamente utilizada. Todavia estes ensaios se tornam caros pois necessitam de uma infra-estrutura especial, demandam muito tempo no acompanhamento dos animais infectados²⁵ e necessitam de aprovação ética. Há, nos últimos anos, um interesse crescente no uso de outros hospedeiros⁷ e modelos experimentais de infecção utilizando invertebrados têm se mostrado uma vantajosa alternativa para análise da resposta imunológica e eficácia da terapêutica. Segundo Fuchs et al (2006)²⁶, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Acanthamoeba castellanii*, *Dictyostelium discoideum*, e *Galleria mellonella* são os animais invertebrados mais utilizados em estudos para examinar elementos da resposta do hospedeiro frente a infecções, como as barreiras físicas, os mecanismos celulares e os moleculares. No entanto, alguns dos modelos alternativos acima mencionados são limitados pela incapacidade do hospedeiro em sobreviver na temperatura 37°C, ideal para a avaliação de micro-organismos de importância médica humana, ou pela dificuldade que o modelo impõe na administração exata do inóculo ou de determinando agente antimicrobiano, como no caso dos modelos de *D. melanogaster* e de *C. elegans*.

Felizmente, estas limitações não se aplicam ao modelo de *G. mellonella*⁷, de modo que as larvas podem ser incubadas em temperaturas que variam de 25°C até 37°C, em placas de Petri por exemplo, e diferentemente de *D. melanogaster*²⁷, não necessitam de acomodações ou de equipamentos especializados para a inoculação de micro-organismos.. Outras vantagens do modelo de *G. mellonella* incluem as múltiplas vias de inoculação, podendo ser oral, cutânea e sistêmica (Figura 2) e a inoculação das larvas com doses definidas do agente microbiano ou químico em questão, devido ao seu tamanho relativamente grande (2 a 3 cm). Em muitos países, exceção feita ao Brasil, as larvas podem ser adquiridas comercialmente ou podem ser criadas em laboratório com baixo custo e relativa facilidade de manutenção^{16,19}. Todas essas vantagens combinadas ao fato de que até o momento não há restrição ética para uso de invertebrados como modelos em pesquisas científicas, fazem do modelo de *G. mellonella* uma opção atrativa e viável para o estudo da patogenicidade de micro-organismos e da eficácia de compostos antimicrobianos.



Figura 2. Inoculação na larva via sistêmica. A entrega do inóculo pode ser realizada diretamente na hemolinfa através da injeção de doses definidas na última falsa-pata da larva. Foto obtida no Laboratório de Biofilmes e Diversidade Microbiana da UFRGS.

4. *Galleria mellonella* como hospedeiro para infecções por fungos leveduriformes

O número de publicações científicas utilizando *G. mellonella* como modelo de infecção tem aumentado exponencialmente a partir de 2010 (Figura 3). Através da busca realizada nas bases de dados foram encontrados 60 artigos publicados até 31 de março de 2016 (Tabela 1) que utilizam larvas de *G. mellonella* como modelo de infecção para leveduras de interesse médico humano.

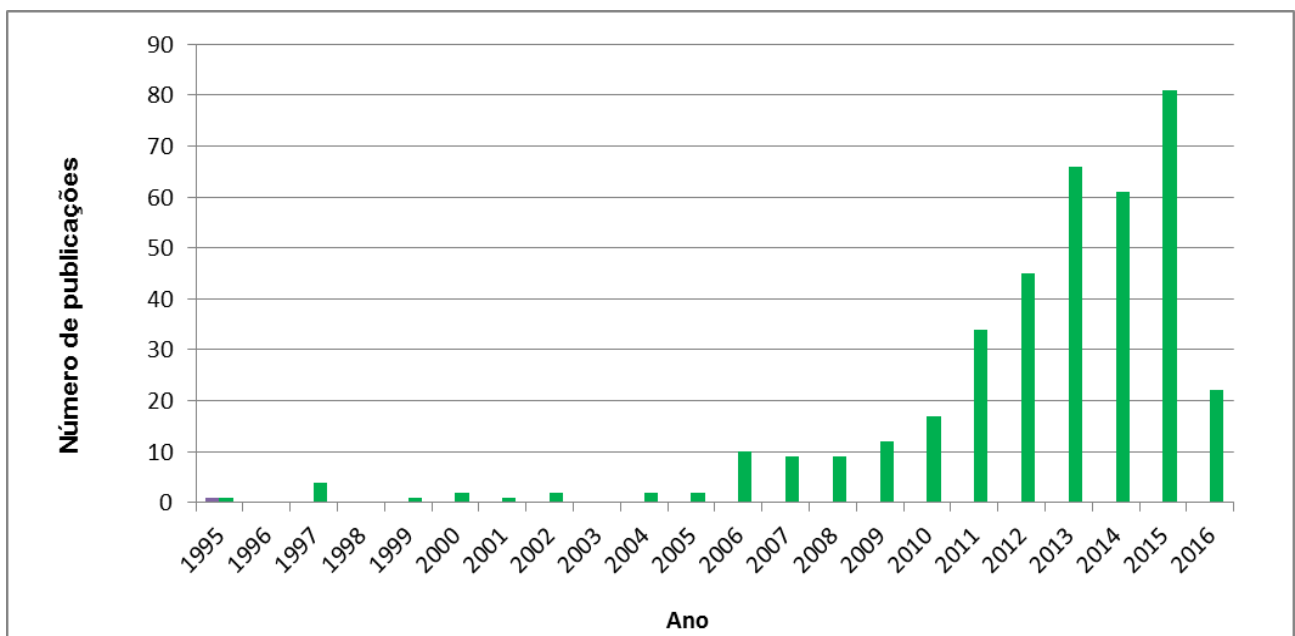


Figura 3. Número de publicações por ano utilizando larvas de *G. mellonella* como hospedeiro para estudos de infecções. Estes dados são referentes à busca na base de dados *Web of Science*, utilizando os seguintes termos: "*Galleria mellonella*" e "infection model".

Os primeiros estudos publicados na literatura investigaram a viabilidade da utilização das larvas do inseto *G. mellonella* como hospedeiro para avaliar *in vivo* a patogenicidade de leveduras^{24,29}. Uma gama de trabalhos analisaram a resposta imunológica das larvas frente à infecção por *Candida* spp., utilizando variadas concentrações de inóculo e espécies para se obter uma concentração letal²⁴. A viabilidade do modelo de *G. mellonella* foi estudada para *Candida albicans*, bem como para outras espécies de levedura²⁴, evidenciando diferentes graus de virulência com relação às diferentes espécies. Neste trabalho, *Candida albicans* mostrou-se a espécie mais virulenta, seguida das espécies *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. pseudotropicalis*, *C. krusei* e *C. glabrata*²⁴. Adicionalmente, Bergin e colaboradores (2003)²⁰, demonstraram que as larvas de *G. mellonella* infectadas com espécies de *Candida* mais patogênicas, ou seja, aquelas capazes de matar mais de 80% das larvas testadas, apresentaram uma redução significativa do número de hemócitos enquanto as espécies menos patogênicas causaram uma leve redução.

Para elucidar os mecanismos pelos quais o hospedeiro responde à exposição ao patógeno é fundamental avaliar o comportamento frente a diferentes condições laboratoriais, como temperatura de pré-incubação²⁸, privação de alimento³⁰ e condições de estresse físico²³. De acordo com Mowlds et al (2008)²³ quando as larvas são estressadas fisicamente pela agitação, elas se tornam menos susceptíveis à infecção por *C. albicans*. A temperatura de pré-incubação é outro fator que influencia na redução da susceptibilidade das larvas durante a infecção por *C. albicans*, como demonstrado por Mowlds et al (2008)²⁸. Estes autores realizaram a pré-incubação das larvas a 4, 30 e 37°C por 24 horas e, posteriormente, infectaram as mesmas com a levedura a fim de avaliar o tempo de sobrevivência das larvas infectadas com *C. albicans*, o número de hemócitos e a expressão de genes de proteínas da resposta imune humoral. Foi verificado que quando as larvas foram pré-incubadas a 4 e 37°C, mas não a 30°C, houve maior resistência à infecção devido ao aumento na densidade de hemócitos e à expressão de proteínas antimicrobianas²⁸. Ainda em relação às condições de pré-incubação, o trabalho de Browne et al (2015)³¹ mostrou que a pré-incubação das larvas a 15°C durante 3 a 10 semanas influencia de forma gradual e negativa as defesas das larvas durante a infecção por *C. albicans*. Com relação à privação nutricional, Banville e co-autores (2012) testaram o efeito da falta de nutrientes durante 2, 4 e 7 dias na susceptibilidade das larvas frente à infecção por *C. albicans*. Os autores verificaram que a privação nutricional por 4 e 7 dias causou diminuição significativa do número de hemócitos, mas sem alterar sua capacidade funcional, bem como a diminuição da expressão dos peptídeos antimicrobianos, tornando as larvas mais susceptíveis³⁰.

A patogenicidade das leveduras implica diretamente na resposta imunológica das larvas^{20,22,25,32,33,34,35,36,37}. A pré-exposição das larvas a concentrações sub-letais de inóculos fúngicos, proporcionou o aumento do número de hemócitos bem como da expressão de genes envolvidos na resposta imune, conseqüentemente aumentando a resistência à infecção por *C. albicans*²². O modelo também foi utilizado na comparação da virulência de *Candida* do complexo – *psilosis* (*Candida parapsilosis*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis*), comprovando a aplicação do hospedeiro na verificação da virulência dos isolados³³. Alterações morfológicas geradas por *Candida* spp. como filamentação e formação de vesículas extracelulares também puderam ser avaliadas nas larvas tanto por ensaios *in vivo* como também histologicamente, através de cortes histológicos de tecidos infectados das larvas^{11,12,32,33,34,37,38}.

Diversos grupos de pesquisa têm investigado fatores de virulência de *Candida* spp. neste modelo invertebrado. Neste sentido, Rossoni e colaboradores (2013)³⁹ avaliaram em várias espécies de *Candida* a relação entre a atividade de proteinases e fosfolipases e a patogenicidade *in vivo*. Todos os isolados de *C. albicans* testados foram apresentaram atividade proteinase e fosfolipase *in vitro*, no entanto somente 25% e 43% das espécies não-*albicans* foram positivas para a atividade proteinase e fosfolipase, respectivamente. Quando a patogenicidade das cepas foi testada em *G. mellonella*, observou-se que as espécies mais virulentas foram *C. albicans*, *C. dubliniensis* e *C. lusitanae*, enquanto *C. glabrata* foi a espécie menos virulenta. Desta forma, os autores concluíram que a virulência de cepas de *Candida* spp. no modelo de larvas de *G. mellonella* está relacionada com a quantidade de enzimas proteinases e fosfolipases³⁹. Németh et al (2013)¹² além de testar a capacidade de *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* em produzir proteases e lipases, também testaram a habilidade das leveduras em produzir pseudohifas *in vivo*. Os resultados indicaram que todos os isolados eram positivos para produção de proteases e aproximadamente 80% positivos para produção de lipases. Contudo a produção de pseudohifas variou entre os isolados,

sendo a *C. metapsilosis* a espécie com menor virulência. Adicionalmente, a formação de biofilme por leveduras em superfícies inanimadas foi observada em diversos estudos, trata-se de um importante fator de virulência *in vivo* verificado nos modelos de infecção com o hospedeiro *G. mellonella*^{38,40,41,42,43}.

O modelo de larvas de *G. mellonella* tem sido utilizado com frequência para a avaliação da virulência de cepas mutantes defectivas em determinados genes^{8,39,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54}. Tan e colaboradores (2014)⁸ utilizaram modelos de infecção de *G. mellonella*, *C. elegans* e camundongos para demonstrar que o gene *spt20* de *C. albicans* possui papel importante na virulência sendo essencial para a formação de hifas e de biofilme. Sánchez-Fresneda et al (2014)⁴⁸ demonstraram o envolvimento da proteína CpAtc1 na hidrólise de trealose em *C. parapsilosis* e que a deleção do gene *atc1* reduz a resistência ao stress e a virulência da levedura em larvas de *G. mellonella*. Um estudo posterior desenvolvido pelo mesmo grupo analisou o efeito da deleção dos genes *atc1* (que codifica a enzima trealase ácida) e *ntc1* (que codifica a enzima trealase neutra) através do desenvolvimento de uma cepa de *C. parapsilosis* duplo mutante⁵³. Os resultados mostraram que a dupla deleção gênica causou redução significativa na virulência de *C. parapsilosis* em *G. mellonella*, bem como na capacidade de formar biofilmes⁵³. Embora os resultados indiquem um papel mais importante para a trealase ácida (ATC1) na patogenicidade de *C. parapsilosis* quando comparado com a trealase neutra (NTC1), os autores sugerem o uso desses genes como alvos antifúngicos interessantes⁵³.

Interessantemente, todos os estudos que correlacionaram modelos mamíferos com o modelo invertebrado de *G. mellonella* demonstraram concordância nos resultados^{8,25,34,35,36,37,45,48,49,52,54,55,56,57,59,60}, comprovando assim a validade de *G. mellonella* como hospedeiro para estudo de infecção fúngica por leveduras. No entanto, quando utilizadas condições diferentes entre os modelos, tais como características dos modelos, foram encontradas discrepâncias nos resultados obtidos para mamíferos e invertebrados³⁷. Tais discrepâncias foram atribuídas a diferenças entre as condições de defesa dos animais, uma vez que as larvas injetadas estavam imunocompetentes e os ratos estavam imunocomprometidos³⁷.

Foram encontrados na literatura 15 trabalhos que utilizam larvas de *G. mellonella* como modelo de infecção por *Candida* spp. para avaliar a eficácia e toxicidade *in vivo* de novos compostos ou terapias combinadas^{11,14,29,30,40,41,51,61,62,63,64,65,66,67,68}. Ainda, a caracterização de isolados clínicos resistentes foi avaliada *in vivo* com sucesso⁵⁰. Com o aumento da resistência antifúngica, a busca por novas terapias^{65,68}, bem como a combinação de antifúngicos^{14,68} tem se tornado evidente e alguns utilizam ensaios *in vivo* em *G. mellonella* para triagem. Os efeitos dos polissacarídeos β -glicano⁶⁸ e do quitosana⁶⁹ presentes na parede celular de leveduras foram analisados nas larvas, provando induzir a resposta imune. Outras terapias alternativas como a terapia fotodinâmica⁶⁵, atividade antifúngica de aminoácidos⁶⁴ e probióticos como *Lactibacillus acidophilus*⁴¹ foram testadas no modelo de larvas de *G. mellonella* e os resultados obtidos foram satisfatórios, indicando a validade do modelo e eficácia dos tratamentos.

Considerando o patógeno oportunista *Cryptococcus* spp., verifica-se na literatura ao menos 18 trabalhos utilizando o hospedeiro invertebrado *G. mellonella* para estudo^{7,29,36,55,56,57,58,59,60,68,70,71,72,73,74,75,76,77}. Utilizando várias concentrações de inóculo de *C. neoformans*, verificou-se a virulência de cepas e analisou-se o efeito de três antifúngicos comumente prescritos na clínica, anfotericina B, fluconazol e flucitosina, em monoterapia e combinados em *G. mellonella*²⁹. A atividade de fármacos como astemizol e seu análogo (A2) também foi investigada *C. neoformans*⁶⁸ utilizando larvas de *G. mellonella*. Outros estudos focaram no entendimento de como *Cryptococcus* spp. induz respostas antimicrobianas em *G. mellonella*, dentre os quais destaca-se o trabalho de Velagapudi e colaboradores (2009)⁵⁶, que avaliaram a virulência de esporos de *C. neoformans*, bem como os estudos sobre o alargamento da cápsula fúngica, gigantismo celular e melanização das larvas infectadas com *C. neoformans*^{7,59,73,76}.

Diversos genes potencialmente responsáveis por mecanismos de virulência de *Cryptococcus* spp. têm sido avaliados no modelo de *G. mellonella*^{55,57,60,70,71,72,76,77}. Adicionalmente, alguns estudos comparam os resultados obtidos em *G. mellonella* com modelos mamíferos a fim de identificar a contribuição dos genes na virulência das leveduras^{55,57,60}. De acordo com Chabrier-Roselló e colaboradores (2013)⁷⁰, o gene *pkh2-02*, ortólogo ao gene quinase *pkd1* de mamíferos, é necessário para *C. neoformans* tolerar estresse de parede celular, oxidativo e antifúngico. Adicionalmente, foi mostrado no modelo de *G. mellonella* que, a

mutação no gene *pkh2-02* tornou a levedura avirulenta⁷⁰. A fim de entender o efeito de mutações no DNA e a interação patógeno-hospedeiro, Magditch et al (2012)⁵⁷ estudaram um mutante do gene *mob2* isolado após exposição à ameba *Acanthamoeba castellanii* e verificaram que a virulência desta levedura é atenuada em *G. mellonella*, a menos que a cepa reverta para tipo selvagem durante o curso da infecção nas larvas. Importaneamente, o efeito da mutação pontual do gene *mob2* também foi investigado em modelo murino e os resultados demonstraram uma redução da patogenicidade das cepas mutantes nos dois modelos⁵⁷. De fato, a maior parte dos estudos com *Cryptococcus* spp. em *G. mellonella* têm focado na elucidação de fatores de virulência de *C. neoformans*^{36,56,58,59,70,73,74,75}, sendo mais limitados os estudos avaliando genes envolvidos com virulência em *C.gattii*^{58,73}.

É importante ressaltar que o modelo representa uma alternativa viável para a avaliação de grandes bibliotecas de mutantes de *C. neoformans*, apresentando a vantagem do inseto *G. mellonella* possuir o sistema imunológico semelhante ao sistema imune inato dos mamíferos, conforme descrito por Desalermos e colaboradores (2014)⁵⁹.

Tabela 1. Ensaios *in vivo* utilizando as larvas de *Galleria mellonella* para avaliar a infecção por leveduras.

| Patógeno | Concentração (UFC por larva) | Composto/ Antifúngico | Concentração testada | Gene/Proteína | Correlação com estudos em vertebrados | Referência |
|--|---|-----------------------|--|---------------|---------------------------------------|--------------------------|
| <i>Candida albicans</i> | 2 x 10 ² 2 x 10 ³ 2 x 10 ⁴ 2 x 10 ⁵ 2 x 10 ⁶ | - | - | - | NA | Cotter et al (2000) |
| <i>Candida tropicalis</i> <i>Candida parapsilosis</i> <i>Candida pseudotropicalis</i> <i>Candida krusei</i> <i>Candida glabrata</i> | 2x10 ⁶ | - | - | - | NA | Brennan et al (2002) |
| <i>Candida albicans</i> | 1 x 10 ⁶ | - | - | - | SIM | Brennan et al (2002) |
| <i>Candida albicans</i> <i>Candida tropicalis</i> <i>Candida dubliniensis</i> <i>Candida parapsilosis</i> <i>Candida krusei</i> <i>Candida glabrata</i> | 1 x 10 ⁶ | - | - | - | NA | Bergin et al (2003) |
| <i>Candida albicans</i> | 1x10 ⁴ , 1x10 ⁵ e 1x10 ⁶ | - | - | - | NA | Bergin et al (2006) |
| <i>Candida albicans</i> | 5 x 10 ⁵ | - | - | - | NA | Mowlds et al (2008) |
| <i>Candida albicans</i> | 5 x 10 ⁵ e 1x10 ⁶ | - | - | PES1 | NA | Shena et al (2008) |
| <i>Candida albicans</i> | 5 x 10 ⁵ | - | - | - | NA | Mowlds e Kavanagh (2008) |
| <i>Candida albicans</i> | 1 x 10 ⁶ | β-glicano | 0,93, 1,87, 3,75, 7,5, 15, 30 µg/larva | - | NA | Mowlds et al (2009) |
| <i>Candida albicans</i> | 5 x 10 ⁵ | [Ag2(mal)(fen)3] | 4 µM | - | NA | Rowan et al (2010) |
| | | [AgNO3] | 3,6 µM | | | |
| | | 1,10-fenantroína | 6 µM | | | |

| | | | | | | |
|-----------------------------|---|--------------|-------------------------------|--------------------------------------|-----|-------------------------------|
| <i>Candida albicans</i> | 1x10 ⁶ | - | - | BCR1 FLO8 KEM1 SUV3 TEC1 | SIM | Burgwyn Fuchs et al (2010) |
| <i>Candida albicans</i> | 5 x 10 ⁵ 1 x 10 ⁶ | Caspofungina | 0,19; 0,095 e 0,0475 µg/mL | - | NA | Kelly e Kavanagh (2011) |
| <i>Candida albicans</i> | 1,9x10 ⁵ 4,5x10 ⁵ 4,7x10 ⁵ 4,8x10 ⁵ 5x10 ⁵ 5,2x10 ⁵ 5,5x10 ⁵ 5,7x10 ⁵ 5,9x10 ⁵ 6,3x10 ⁵ 6,7x10 ⁵ 7,1x10 ⁵ 7,2x10 ⁵ 7,5x10 ⁵ 9,4x10 ⁵ | - | - | - | NA | Junqueira et al (2011) |
| <i>Candida lusitanae</i> | 1,4x10 ⁵ | | | | | |
| <i>Candida. krusei</i> | 8,8x10 ⁵ | | | | | |
| <i>Candida tropicalis</i> | 3,9x10 ⁵ 4,9x10 ⁵ 5x10 ⁵ 9,1x10 ⁵ | | | | | |
| <i>Candida parapsilosis</i> | 6,2x10 ⁵ 7,3x10 ⁵ | | | | | |
| <i>Candida norvegensis</i> | 6,3x10 ⁵ | | | | | |
| <i>Candida dubliniensis</i> | 3,9x10 ⁵ 5,1x10 ⁵ | | | | | |
| <i>Candida glabrata</i> | 4,8x10 ⁵ 5,4x10 ⁵ 6,4x10 ⁵ 9,8x10 ⁵ | | | | | |
| <i>Candida kefyr</i> | 4,2x10 ⁵ | | | | | |

| | | | | | | |
|--|---|---|---|------|----|--------------------------------------|
| <i>Candida albicans</i> | 1x10 ⁶ 1x10 ⁵ | | AMB:1,2, 4 mg/kg FLU:128,64,32,12, 4 mg/kg VCZ:7,5 e 10 mg/kg CAS: 1,2 e 4 mg/kg | - | NA | Scorzoni et al (2013) |
| | 5x10 ⁵ | anfotericina B (AMB) fluconazol (FLU) voriconazol (VCZ) caspofungina (CAS) | | | | |
| <i>Candida krusei</i> | 5x 10 ⁶ | anfotericina B (AMB) fluconazol (FLU) voriconazol (VCZ) caspofungina (CAS) | | | | |
| | 1x10 ⁷ 2,5 x 10 ⁶ | | | | | |
| <i>Candida albicans</i> | 5 x 10 ⁶ | - | - | - | NA | Banville et al (2012) |
| <i>Candida tropicalis</i> | 2x10 ⁶ | Anfotericina B (AMB) Caspofungina (CAS) Fluconazol (FLU) Voriconazol (VCZ) | AMB e CAS: 1, 2 e 4 µg/g de larva FCZ: 1,1 e 5 µg/larva VCZ: 1,1 e 5,5 µg/larva | - | NA | Mesa-Arango et al (2013) |
| | 4 x 10 ⁶ 1x10 ⁶ 5x10 ⁵ | | | | | |
| <i>Candida parapsilosis</i> <i>Candida orthopsilosis</i> <i>Candida metapsilosis</i> | 6 x 10 ⁶ | - | - | - | NA | Németh et al (2013) |
| <i>Candida albicans</i> | 5 x 10 ⁵ | Anidulafungina | 0,6 µg/larva | - | NA | Cirasola et al (2013) |
| <i>Candida albicans</i> | 1x10 ⁶ | - | - | OPY2 | NA | Herrero de Dios et al (2013) |
| <i>Candida albicans</i> | 6 x 10 ⁴ | - | - | Cap1 | NA | Patterson et al (2013) |
| <i>Candida albicans</i> | 1 x 10 ⁵ | Miriocina | 0,05 µg/mL | - | NA | Rodrigues de Melo et al (2013) |
| | | Anfotericina B | 250 µg/mL | | | |
| | | Fluconazol | 250 µg/mL | | | |
| <i>Candida albicans</i> | 1 x 10 ⁶ | - | - | - | NA | Chibebe Junior et al (2013) |

| | | | | | | |
|--|--|---|--|-------------------------------------|-----|-------------------------------------|
| <i>Candida albicans</i> | 5 x 10 ⁵ | Fluconazol (FLU) Anfotericina B(AMB) Flucitosina (5-FC) | FLU: 1,4,16 mg/kg AMB: 0,4;1,6; 6,4 mg/kg 5-FC: 1,25; 5 e 20 mg/kg | - | NA | Li et al (2013) |
| | 1.25 x 10 ⁵ 2.5 x 10 ⁵ , e 1 x 10 ⁶ | | | | | |
| <i>Candida albicans</i> <i>Candida glabrata</i> <i>Candida dubliniensis</i> <i>Candida parapsilosis</i> <i>Candida tropicalis</i> <i>Candida krusei</i> <i>Candida norvegensis</i> <i>Candida lusitaniae</i> <i>Candida guilliermondii</i> | 1 x 10 ⁵ | - | - | Proteina- ses e fos- folipase | NA | Rossoni et al (2013) |
| <i>Candida albicans</i> | 1x10 ⁵ | - | - | - | NA | Borghi et al (2014) |
| <i>Candida albicans</i> | 1x10 ⁵ | - | - | - | NA | Sherry et al (2014) |
| <i>Candida parapsilosis</i> | 2,5 x 10 ⁴ | - | - | ATC1 | SIM | Sanchez-Fresneda et al (2014) |
| <i>Candida albicans</i> | 1,5x10 ⁶ 1x10 ⁶ 7,5x10 ⁵ 5x10 ⁵ | - | - | - | NA | Rueda et al (2014) |
| <i>Candida parapsilosis</i> , <i>Candida orthopsilosis</i> , <i>Candida metapsilosis</i> | 2 x 10 ⁶ | - | - | - | NA | Gago et al (2014) |
| <i>Candida albicans</i> | 5 x 10 ⁵ | Fluconazol | 1 mg/kg | - | NA | Favre-Godal et al (2014) |
| | | 2-hidroxi-3-metil- antraquinona | 100 mg/kg | | | |
| | | Soranjidiol | 100 mg/kg | | | |
| <i>Candida albicans</i> | 1 x 10 ⁶ | - | - | SPT20 | SIM | Tan et al (2014) |
| <i>Candida albicans</i> | 1 x 10 ⁶ | - | - | CEK1 HOG1 | SIM | Herrero-de-Dios et al (2014) |
| <i>Candida albicans</i> | 1 x 10 ⁶ | - | - | - | SIM | Vargas et al (2014) |

| | | | | | | |
|--------------------------------|--|--|--|--------------------------------|-----|-------------------------------|
| <i>Candida albicans</i> | 5 x 10 ⁵ | - | - | - | NA | Jensen et al (2015) |
| <i>Candida albicans</i> | 2,5 x 10 ⁴ | - | - | MBF1 ZCF6 | SIM | Amorim-Vaz et al (2015) |
| <i>Candida albicans</i> | 2,5 x 10 ³ | - | - | GBR1 FDH3 | SIM | Tillmann et al (2015) |
| <i>Candida albicans</i> | 1 x 10 ⁶ | - | - | - | NA | Browne et al (2015) |
| <i>Candida albicans</i> | 3,1 x 10 ⁴ | Quitosana | 20-150 µg/mL | - | NA | Lopez-Moya et al (2015) |
| <i>Candida albicans</i> | 1x10 ² 1x10 ³ 1x10 ⁴ 1x10 ⁵ 1x10 ⁶ | - | - | - | NA | Vilela FG et al (2015) |
| <i>Candida albicans</i> | 1x10 ⁶ | - | - | MKK2 | SIM | Román et al (2015) |
| <i>Candida parapsilosis</i> | 2,5 x 10 ⁴ | - | - | ATC1 NTC1 | NA | Sánchez-Fresneda et al (2015) |
| <i>Candida albicans</i> | 1,5 x 10 ⁵ | - | - | - | SIM | Amorim-Vaz et al (2015) |
| <i>Candida albicans</i> | 5 x 10 ⁵ | - | - | - | SIM | Frenkel et al (2016) |
| <i>Cryptococcus neoformans</i> | 2x10 ³ 5x10 ³ 1,2 x 10 ⁴ 1,75x10 ⁴ 2 x 10 ⁴ 2,2 x 10 ⁴ 2,5 x 10 ⁴ | - | | | NA | Mylonakis et al (2005) |
| | 1,2x10 ³ | Anfotericina B (AMB) Fluconazol (FLU) Flucitosina (5-FC) | AMB: 1,5 mg/kg FLU: 14 mg/kg 5-FC:20 mg/kg | - | | |
| | 1,5x10 ⁴ | - | - | CAP 59 GPA1 RAS1 PKA1 | | |
| <i>Cryptococcus neoformans</i> | 1 x 10 ⁵ | - | - | MLS1 PEX1 | SIM | Idnurm et al (2006) |
| <i>Cryptococcus neoformans</i> | 500 | - | - | - | SIM | Velagapudi et al (2009) |

| | | | | | | |
|--|---|-------------------------|-----------|--------------------|-----|---------------------------------|
| <i>Cryptococcus neoformans</i> | 1 x 10 ⁶ | - | - | Septinas | NA | Kozubowski L e Heitman J (2010) |
| <i>Cryptococcus neoformans</i> | 1x10 ⁴ | - | - | - | NA | García-Rodas et al (2011) |
| <i>Cryptococcus neoformans</i> | 2 x 10 ⁵ | - | - | PKH2-01 PKH2-02 | NA | Chabrier-Roselló et al (2012) |
| <i>Cryptococcus neoformans</i> | 1 x 10 ⁶ | - | - | ARG1 | NA | LeV et al (2012) |
| <i>Cryptococcus neoformans</i> | 1 x 10 ⁵ 1 x 10 ⁶ | - | - | MOB2 | SIM | Magditch et al (2012) |
| <i>Cryptococcus neoformans</i> <i>Cryptococcus amyloletus</i> <i>Cryptococcus podzolicus</i> | 5 x 10 ⁴ 5 x 10 ⁵ 5 x 10 ⁶ | - | - | - | NA | Garcia-Solache et al (2013) |
| <i>Cryptococcus gattii</i> | 5 x 10 ⁴ 1x10 ⁵ | - | - | Calcineurina | SIM | Chen et al (2013) |
| <i>Cryptococcus gattii</i> | 1x10 ⁶ | - | - | - | NA | Firacative et al (2014) |
| <i>Cryptococcus neoformans</i> | 1 x 10 ⁶ | - | - | - | SIM | Desalermos et al (2014) |
| <i>Cryptococcus neoformans</i> | 1x10 ⁵ | - | - | - | NA | Eisenman C et al (2014) |
| <i>Cryptococcus neoformans</i> | 1 x 10 ⁶ | - | - | - | NA | García-Rodas et al (2014) |
| <i>Cryptococcus neoformans</i> | 1 x 10 ⁶ | - | - | XRN1p | NA | Wollschlaeger et al (2014) |
| <i>Cryptococcus neoformans</i> | 1 x 10 ⁶ | - | - | Aph1 | SIM | Lev et al (2014) |
| <i>Cryptococcus neoformans</i> | 1x10 ⁴ 1x10 ⁵ 1x10 ⁶ | - | - | - | NA | Trevijano-Contador et al (2015) |
| <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i> | 1,2 x 10 ³ | Fluconazol | 4 mg/ mL | - | NA | Vu e Gelli (2010) |
| | | Astemizol | 4 mg/ mL | | | |
| | | Análogo do astemizol A2 | 10 mg/ mL | | | |

NA: não avaliado.

5. Considerações finais

Galleria mellonella tem se mostrado como uma vantajosa alternativa nos ensaios *in vivo* de infecções causadas por leveduras de interesse médico, como evidenciado pelo crescente número de artigos publicados com o uso deste modelo. No entanto, este modelo é considerado incipiente e ainda existem desafios na sua utilização, como a falta de padronização das condições de manutenção das larvas (alimentação, armazenamento, temperatura). Adicionalmente ainda não existe uma cepa padrão das larvas, o que dificulta a comparação entre resultados obtidos em diferentes laboratórios. Certamente, o desenvolvimento futuro de uma cepa referência de larva do inseto acrescentará aos estudos maior confiabilidade. Por fim, tendo em vista a crescente quantidade de trabalhos publicados por grupos de estudos que analisam genes e mutações, o sequenciamento do genoma das larvas de *G. mellonella* permitirá uma análise completa da relação hospedeiro-patógeno.

6. Referências:

1. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. Clin Microb Rev. 2007, 20:133-63.
2. Ho H-L, Haynes K. *Candida glabrata*: new tools and technologies—expanding the toolkit. FEMS Yeast Res. 2015, 15:1-14.
3. Nucci M, Queiroz-Telles F, Tobó AM, Restrepo A, Colombo AL. Epidemiology of opportunistic fungal infection in Latin America. Clin Infect Diseases. 2010, 51:561–70.
4. Mora DL, Colombo ERC, Ferreira-Paim K, Andrade-Silva LE, Nascentes GAN, Silva-Vergara M. Clinical, epidemiological and outcome features of patients with cryptococcosis in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. Mycopathologia. 2012,173:321–27.
5. Doi AM, Pignatari ACC, Edmond MB, Marra AR, Camargo LFA, Siqueira RA, Da Mota VP, et al. Epidemiology and microbiologic characterization of nosocomial candidemia from a brazilian national surveillance program. Plos One 2016,11:1-9
6. Park BJ, Wannemuehlerb KA, Marstonc BJ, Govenderd N, Pappase PG, Chiller TM. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. AIDS 2009, 23:525–530
7. García-Rodas R, Casadevall A, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M, Zaragoza O. *Cryptococcus neoformans* capsular enlargement and cellular gigantism during *Galleria mellonella* infection. Plos One 2011,9: 1-12.
8. Tan X, Fuchs BB, Wang Y, Chen W, Yuen JG, Chen RB, et al. The role of *Candida albicans* SPT20 in filamentation, biofilm formation and pathogenesis. Plos One. 2014, 9: 1-10.
9. Gonçalves CL, Mota FV, Mendes JF, Ferreira GF, Vieira JN, Pereira E, et al. Leveduras isoladas em unidade de terapia intensiva do sul do Rio Grande do Sul, Brasil. Rev Epidemiol Cont Infect. 2015,5:111-112.

10. Andes D, Nett J, Oschel P, Albrecht R, Marchillo K, Pitula A. Development and characterization of an in vivo central venous catheter *Candida albicans* biofilm model. *Infect. and Immunity*. 2004;72:6023–6031.
11. Scorzoni L, de Lucas MP, Mesa-Arango AC, Fusco-Almeida AM, Lozano E, Cuenca-Estrella M, et al. Antifungal efficacy during *Candida krusei* infection in non-conventional models correlates with the yeast in vitro susceptibility profile. *PLoS One* 2013, 8: 1-13.
12. Németh T, Tóth A, Szenzenstein J, Horváth P, Nosanchuk JD, Grózer Z, et al. Characterization of virulence properties in the *C. parapsilosis* sensu lato species. *Plos One*. 2013;8:1-10.
13. Maldonado I, Arechavala A, Guelfand L, Relloso S, Garbasz C. Infecciones urinarias nosocomiales por levaduras. Estudio multicéntrico de 14 hospitales de la red de micología de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires. *Rev Iberoam Micol*. 2016, 1-6.
14. Li DD, Deng Li, Hu GH, Zhao LX, Hu DD, Jiang YY, et al. Using *Galleria mellonella*–*Candida albicans* infection model to evaluate antifungal agents. *Biol Pharm Bull*. 2013, 36:1482-87.
15. Tsai CJ-Y, Loh JMS, Proft T. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. *Virulence*. 2016, 1-16.
16. Nomura E, Chaud-Netto J, Gobbi N. Efeito da dieta no ciclo biológico das lagartas das traças -da-cera *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera, Pyralidae) e *Achroia grisella* (Fabricius, 1754) (Lepidoptera, Pyralidae). *Rev Bras Zoo*. 2006;8:1-6.
17. Brighenti DM, Brighenti CRG, Carvalho CF. A traça da cera *Galleria mellonella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Pyralidae) em favos de *Apis mellifera* Linnaeus (1758) (Hymenoptera: Apidae)- Noções gerais. *Mens Doce*. 2006, 89.
18. Ramarao, N., Nielsen-Leroux, C., Lereclus, D. The insect *Galleria mellonella* as a powerful infection model to investigate bacterial pathogenesis. *J Vis Exp* 2012;70:1-12.
19. Kavanagh K, Reeves EP. Exploiting the potential of insects for *in vivo* pathogenicity testing of microbial pathogens. *FEMS Microb Rev*. 2014, 28:101–112.
20. Bergin D, Brennan M, Kavanagh K. Fluctuations in haemocyte density and microbial load may be used as indicators of fungal pathogenicity in larvae of *Galleria mellonella*. *Microbes and Infect*. 2003;5 1389–1395
21. Browne N, Heelan M, Kavanagh K. An analysis of the structural and functional similarities of insect hemocytes and mammalian phagocytes. *Virulence*. 2013;4: 597-603.
22. Bergin D, Murphy L, Keenan J, Clynes M, Kavanagh K. Pre-exposure to yeast protects larvae of *Galleria mellonella* from a subsequent lethal infection by *Candida albicans* and is mediated by the increased expression of antimicrobial peptides. *Microbes and Infect*. 2006;8: 2105-12.
23. Mowlds P, Barron A, Kavanagh K. Physical stress primes the immune response of *Galleria mellonella* larvae to infection by *Candida albicans*. *Microbes and Infect*. 2008;10:628-34.
24. Cotter C, Doyle S, Kavanagh K. Development of an insect model for the in vivo pathogenicity testing of yeasts. *FEMS Immunol. and Med. Microb*. 2000, 27:163-9.

25. Brennan M, Thomas DY, Whiteway M, Kavanagh K. Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae. *FEMS Immunol. and Med. Microb.* 2002,34:153-7.
26. Fuchs BB, Mylonakis E. Using non-mammalian hosts to study fungal virulence and host defense. *Current Opin in Microb.* 2006, 9:346–35.
27. Fuchs BB, O'Brien E, El Khoury JBE, Mylonakis E. Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis. *Virulence.* 2010, 1: 475-82.
28. Mowlds P, Kavanagh K. Effect of pre-incubation temperature on susceptibility of *Galleria mellonella* larvae to infection by *Candida albicans*. *Micopathologia* 2008,165:5-12
29. Mylonakis E, Moreno R, El Khoury JB, Idnurm A, Heitman J, Calderwood SB, et al. *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. *Infec. and Immun.* 2005,73:3842-52.
30. Banville N, Browne N, Kavanagh K. Effect of nutrient deprivation on the susceptibility of *Galleria mellonella* larvae to infection. *Virulence* 2012, 3:497-503.
31. Browne N, Surlis C, Maher A, Gallagher C, Carolan JC, Clynes M, et al. Prolonged pre-incubation increases the susceptibility of *Galleria mellonella* larvae to bacterial and fungal infection. *Virulence.* 2015, 6:458-65.
32. Mesa-Arango AC, Forastiero A, Bernal-Martínez L, Cuenca-Estrella M, Mellado E, Zaragoza O. The non-mammalian host *Galleria mellonella* can be used to study the virulence of the fungal pathogen *Candida tropicalis* and the efficacy of antifungal drugs during infection by this pathogenic yeast. *Med. Mic.* 2013, 51:461-72.
33. Gago S, García-Rodas R, Cuesta I, Mellado E, Alastruey-Izquierdo A. *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* virulence in the non-conventional host *Galleria mellonella*. *Virulence.* 2014, 5:278–285.
34. Vargas G, Rocha JDB, Oliveira DL, Albuquerque PC, Frases S, Santos SS, et al. Compositional and immunobiological analyses of extracellular vesicles released by *Candida albicans*. *Cel Microb.* 2015, 17:389-407.
35. Amorim-Vaz S, Delarze E, Ischer F, Sanglard D, Coste AT. Examining the virulence of *Candida albicans* transcription factor mutants using *Galleria mellonella* and mouse infection models. *Frontiers in Microb.* 2015, 6: 1-14.
36. Amorim-Vaz S, Tran VDT, Pradervand S, Pagni M, Coste AT, Sanglard D. RNA enrichment method for quantitative transcriptional analysis of pathogens in vivo applied to the fungus *Candida albicans*. *MBio.* 2015,6: 1-16.
37. Frenkel M, Mandelblat M, Alastruey-Izquierdo, Mendlovic S, Semis R, Segal E. Pathogenicity of *Candida albicans* isolates from bloodstream and mucosal candidiasis assessed in mice and *Galleria mellonella*. *J Myco Med.* 2016, 26: 1-8.
38. Junqueira JC, Fuchs BB, Muhammed M, Coleman JJ, Suleiman JMAH, Vilela SFG, et al. Oral *Candida albicans* isolates from HIV-positive individuals have similar in vitro biofilm-forming ability and pathogenicity as invasive *Candida* isolates. *BMC Microb.* 2011,11:1-12.

39. Rossoni RD, Barbosa JO, Vilela SFG, Dos Santos JD, Jorge AOC, Junqueira JC. Correlation of phospholipase and proteinase production of *Candida* with *in vivo* pathogenicity in *Galleria mellonella*. *Braz J Oral Sci.* 2013, 12:199-204.
40. Cirasola D, Sciota R, Vizzini L, Ricucci V, Morace G, Borghi E. Experimental biofilm-related *Candida* infections. *Fut Microb.* 2013, 8:799-805.
41. Vilela SFG, Barbosa JO, Rossoni RD, Santos JD, Prata MCA, Anbinder AL, et al. *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 inhibits biofilm formation by *C. albicans* and attenuates the experimental candidiasis in *Galleria mellonella*. *Virulence.* 2015, 6: 29-39.
42. Borghi E, Romagnoli S, Fuchs BB, Cirasola D, Perdoni F, Tosi D, et al. Correlation between *Candida albicans* biofilm formation and invasion of the invertebrate host *Galleria mellonella*. *Fut Microb.* 2014, 9: 163-73.
43. Sherry L, Rajendran R, Lappin DF, Borghi E, Perdoni F, Falleni M, et al. Biofilms formed by *Candida albicans* bloodstream isolates display phenotypic and transcriptional heterogeneity that are associated with resistance and pathogenicity. *BMC Microb.* 14:182-195.
44. Shen J, Cowen LE, Griffin AM, Chan L, Köhler JR. The *Candida albicans* pescadillo homolog is required for normal hypha-to-yeast morphogenesis and yeast proliferation. *PNAS* 2008,105:20918-23.
45. Fuchs BB, Eby J, Nobile CJ, El Khoury JB, Mitchell AP, Mylonakis E. Role of filamentation in *Galleria mellonella* killing by *Candida albicans*. *Microbes Infect.* 2010, 12: 488-96.
46. De Dios CH, Román E, Diez C, Alonso-Monge R, Pla J. The transmembrane protein Opy2 mediates activation of the Cek1 MAP kinase in *Candida albicans*. *Fungal Gen and Bio.* 2013, 50:21-32.
47. Patterson MJ, McKenzie CG, Smith DA, Dantas AS, Sherston S, Veal EA, et al. Ybp1 and Gpx3 signaling in *Candida albicans* govern hydrogen peroxide-induced oxidation of the Cap1 transcription factor and macrophage escape. *Antiox e Redox Sig.* 2013, 19:2244-2260.
48. Sánchez-Fresneda R, Martínez-Esparza M, Maicas S, Argüelles JC, Valentín E. In *Candida parapsilosis* the ATC1 gene encodes for an acid trehalase involved in trehalose hydrolysis, stress resistance and virulence. *Plos One.* 2014, 9: 1-14.
49. Herrero-de-Dios C, Alonso-Monge R, Pla J. The lack of upstream elements of the Cek1 and Hog1 mediated pathways leads to a synthetic lethal phenotype upon osmotic stress in *Candida albicans*. *Fungal Gen and Bio.* 2014, 69: 31–42.
50. Jensen RH, Astvad KMT, Silva LV, Sanglard D, Jorgensen R, Nielsen KF, et al. Stepwise emergence of azole, echinocandin and amphotericin B multidrug resistance *in vivo* in *Candida albicans* orchestrated by multiple genetic alterations. *J Antimicrob Chemother* 2015, 70: 2551–2555
51. Lopes-Moya F, Colom-Valiente MF, Martínez-Peinado P, Martínez-Lopez JE, Puelles E, Sempere-Ortells JM, et al. Carbon and nitrogen limitation increase chitosan antifungal activity in *Neurospora crassa* and fungal human pathogens. *Fungal Biol.* 2015, 119: 154-69.
52. Román E, Alonso-Monge R, Miranda A, Pla J. The Mkk2 MAPKK Regulates cell wall biogenesis in cooperation with the Cek1-pathway in *Candida albicans*. *Plus One.* 2015, 10: 1-23.

53. Sánchez-Fresneda R, Guirao-Abad JP, Martínez-Esparza M, Maicas S, Valentín E, Argüelles JC. Homozygous deletion of ATC1 and NTC1 genes in *Candida parapsilosis* abolishes trehalase activity and affects cell growth, sugar metabolism, stress resistance, infectivity and biofilm formation. *Fungal Gen and Biol.* 2015, 85: 45-57.
54. Tillmann AT, Strijbis K, Cameron G, Radmaneshfar E, Thiel M, Munro CA, et al. Contribution of Fdh3 and Glr1 to glutathione redox state, stress adaptation and virulence in *Candida albicans*. *Plos One.* 2015, 10: 1-24.
55. Idnurm A, Giles SS, Perfect JR, Heitman J. Peroxisome function regulates growth on glucose in the basidiomycete fungus *Cryptococcus neoformans*. *Euk. Cell* 2007,6:60-72.
56. Velagapudi R, Hsueh YP, Geunes-Boyer S, Wright JR, Heitman J. Spores as infectious propagules of *Cryptococcus neoformans*. *Infec. and Immun.* 2009, 77:4345-55.
57. Magditch DA, Liu TB, Xue C, Idnurm A. DNA mutations mediate microevolution between host- adapted forms of the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Plos Pathog.* 2012, 8:1-14.
58. Chen YL, Lehman VN, Lewit Y, Averette AF, Heitman J. Calcineurin governs thermotolerance and virulence of *Cryptococcus gattii*. *Gene Genomes Genet.* 2013, 3:527-539
59. Desalermos A, Tan X, Rajamuthiah R, Arvanitis M, Wang Y, Li D, et al. A multi-host approach for the systematic analysis of virulence factors in *Cryptococcus neoformans*. *The J of Infec. Dis.* 2015, 211:298–305.
60. Lev S, Crossett B, Cha SY, Desmarini D, Li C, Chayakulkeeree M, Wilson CF, et al. Identification of Aph1, a phosphate-regulated, secreted, and vacuolar acid phosphatase in *Cryptococcus neoformans*. *MBio.* 2014, 5: 1-13.
61. Mowlds P, Coates C, Renwick J, Kavanagh K. Dose-dependent cellular and humoral responses in *Galleria mellonella* larvae following β -glucan inoculation. *Microbes and Infec.* 2010, 12:146-53.
62. Rowan R, Moran C, McCann M, Kavanagh K. Use of *Galleria mellonella* larvae to evaluate the in vivo anti-fungal activity of [Ag2(mal)(phen)3]. *Biometals* 2009, 22: 461-67
63. Kelly J, Kavanagh K. Caspofungin primes the immune response of the larvae of *Galleria mellonella* and induces a non-specific antimicrobial response. *J of Med. Microb.* 2011, 60: 189–96.
64. Melo NR, Abdrahman A, Greig C, Mukherjee K, Thornton C, Rafcliffe NA, et al. Myriocin significantly increases the mortality of a non-mammalian model host during candida pathogenesis. *Plos One.* 2013, 8:1-13.
65. Junior JC, Sabino CP, Tan X, Junqueira JC, Wang Y, Fuchs BB, et al. Selective photoinactivation of *Candida albicans* in the non-vertebrate host infection model *Galleria mellonella*. *BMC Microb.* 2013,13:1-9.
66. Rueda C, Cuenca-Estrella M, Zaragoza O. Paradoxical growth of *Candida albicans* in the presence of Caspofungin is associated with multiple cell wall rearrangements and decreased Virulence. *Antim Ag Chem.* 2014, 58: 1071-83.
67. Favre-Godal Q, Dorsaz S, Queiroz EF, Conan C, Marcourt L, Wardojo BPE, et al. Comprehensive approach for the detection of antifungal compounds using a susceptible strain of *Candida albicans* and confirmation of in vivo activity with the *Galleria mellonella* model. *Phytochemistry.* 2014,105: 68–78.

68. Vu K, Gelli A. Astemizole and an analogue promote fungicidal activity of fluconazole against *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *Cryptococcus gattii*. *Med Myco.* 2010, 48:255–62.
69. Browne N, Surlis C, Maher A, Gallagher C, Carolan JC, Clynes M, et al. Prolonged pre-incubation increases the susceptibility of *Galleria mellonella* larvae to bacterial and fungal infection. *Virulence.* 2015, 6:458-65
70. Chabrier-Roselló Y, Gerik KJ, Koselny K, DiDone L, Lodge JK, Krysana DJ. *Cryptococcus neoformans* phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK1) ortholog is required for stress tolerance and survival in murine phagocytes. *Euk. Cell* 2013,12:12-22.
71. Lev S, Desmarini D, Li C, Chayakulkeeree M, Traven A, Sorrell TC, et al. Phospholipase C of *Cryptococcus neoformans* regulates homeostasis and virulence by providing inositol trisphosphate as a substrate for Arg1 kinase. *Infec. and Immun.* 2013, 81:1245-55
72. Garcia-Solache MA, Izquierdo-Garcia D, Smith C, Bergman A, Casadevall A. Fungal virulence in a lepidopteran model is an emergent property with deterministic features. *MBio* 2013, 4:1-9.
73. Firacative C, Duan S, Meyer W. *Galleria mellonella* model identifies highly virulent strains among all major molecular types of *Cryptococcus gattii*. *Plos One.* 2014,9:1-12.
- 74.. García-Rodas R, Cordero RJB, Trevijano-Contador N, Janbon G, Moyrand F, Casadevall A, et al. Capsule growth in *Cryptococcus neoformans* is coordinated with cell cycle progression. *MBio.* 2014, 5: 1-13.
75. Wollschlaeger C, Trevijano-Contador N, Wang X, Legrand M, Zaragoza O. Distinct and redundant roles of exonucleases in *Cryptococcus neoformans*: implications for virulence and mating. *Fungal Gen and Bio.* 2014, 73: 20–28.
76. Trevijano-Contador N, Herrero-Fernandez I, García-Barbazan I, Sorzoni L, Rueda C, Rossi AS, et al. *Cryptococcus neoformans* induces antimicrobial responses and behaves as a facultative intracellular pathogen in the non mammalian model *Galleria mellonella*. *Virulence.* 2015,6: 66-74.
77. Eisenman HC, Duong R, Chan H, Tsue R, McClelland EE. Reduced virulence of melanized *Cryptococcus neoformans* in *Galleria mellonella*. *Virulence* 2014,5: 611-18.

Instruções aos Autores

Escopo e política

A Clinical and Biomedical Research (CBR), antiga Revista HCPA, é uma publicação científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (FAMED/UFRGS). É um periódico científico de acesso livre que tem a finalidade de publicar trabalhos de todas as áreas relevantes das Ciências da Saúde, incluindo pesquisa clínica e básica. Os critérios de seleção para publicação incluem: originalidade, relevância do tema, qualidade metodológica e adequação às normas editoriais da revista.

A CBR apoia as políticas para registro de ensaios clínicos da Organização Mundial da Saúde (OMS) [<http://www.who.int/ictrp/en/>] e do International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) [http://www.icmje.org/clin_trial.pdf]. Sendo assim, somente serão aceitos para publicação os artigos de pesquisas clínicas que tenham recebido número de identificação do Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos (ReBEC) <http://www.ensaiosclinicos.gov.br> ou de outro banco de dados oficial dedicados ao registro de ensaios clínicos.

Todos os artigos publicados são revisados por pares anônimos. Uma vez que o artigo seja aceito para publicação, os seus direitos autorais são automaticamente transferidos para a revista. O conteúdo do material enviado para publicação na CBR implica que o mesmo não tenha sido publicado e não esteja submetido a outra revista. Artigos publicados na CBR, para serem publicados em outras revistas, ainda que parcialmente, necessitarão de aprovação por escrito dos editores. Os conceitos e declarações contidos nos trabalhos são de total responsabilidade dos autores. Os artigos podem ser redigidos em português, inglês ou espanhol. As submissões em inglês são fortemente encorajadas pelos editores.

O manuscrito deve enquadrar-se em uma das diferentes categorias de artigos publicados pela revista, conforme a seguir:

Forma e preparação de artigos

SERÃO CONSIDERADOS PARA PUBLICAÇÃO

Editorial

Comentário crítico e aprofundado, preparado a convite dos editores e submetido por pessoa com notório saber sobre o assunto abordado. Os editoriais podem conter até 1000 palavras. Esta seção pode incluir o editorial de apresentação da Revista, assinado pelo Editor, além de editoriais especiais, que compreendem colaborações solicitadas sobre temas atuais ou artigos publicados na Revista.

Artigos de Revisão

Artigos que objetivam sintetizar e avaliar criticamente os conhecimentos disponíveis sobre determinado tema. Devem conter até 6.000 palavras. Esses artigos devem apresentar resumo, não estruturado com número não superior a 200 palavras (exceto revisões sistemáticas – ver estrutura de resumo em 'Artigos Originais') e uma lista abrangente, mas preferencialmente não superior a 80 referências.

Tabelas devem ser incluídas no mesmo arquivo do manuscrito (após as referências) e as figuras devem ser enviadas como documento suplementar em arquivos individuais.

Artigos Especiais

Manuscritos exclusivamente solicitados pelos editores, sobre tema de relevância científica, a autores com reconhecida expertise na área e que não se enquadrem nos critérios de Editorial.

Artigos Originais

Artigos com resultados inéditos de pesquisa, constituindo trabalhos completos que contêm todas as informações relevantes que o leitor possa avaliar seus resultados e conclusões, bem como replicar a pesquisa. A sua estrutura formal deve apresentar os tópicos: Introdução, Métodos, Resultados e Discussão.

A(s) conclusão(ões) deve(m) estar no último parágrafo da Discussão, não sendo necessária uma seção específica. Implicações clínicas e limitações do estudo devem ser apontadas. Para os artigos originais, deve-se apresentar um resumo estruturado (Introdução, Métodos, Resultados e Conclusões) em português e em inglês (Abstract), nos casos em que o artigo não for escrito na sua totalidade na língua inglesa. O Resumo e o Abstract não devem exceder 250 palavras.

Os artigos submetidos nesta categoria não devem exceder 3.000 palavras. Tabelas devem ser incluídas no mesmo arquivo do manuscrito (após as referências) e as figuras devem ser enviadas como documento suplementar em arquivos individuais.

Relatos de Casos

São artigos baseados em casos peculiares e comentários sucintos sobre a importância do caso em relação ao conhecimento atual na área. Devem conter até 1.000 palavras, com um total de, no máximo, duas tabelas ou figuras e 15 referências, já que o objetivo dos relatos não é apresentar uma revisão bibliográfica.

A sua estrutura deve apresentar os seguintes tópicos: Introdução, explicando a relevância do caso; Apresentação do caso (Relato do Caso) e Discussão. Os relatos de casos devem descrever achados novos ou pouco usuais, ou oferecer novas percepções sobre um problema estabelecido. O conteúdo deve limitar-se a fatos pertinentes aos casos. O sigilo em relação à identificação dos pacientes é fundamental, não devendo ser relatadas datas precisas, iniciais ou qualquer outra informação não relevante ao caso, mas que eventualmente possa identificar o paciente. Os Relatos de Caso devem ter Resumo não estruturado com no máximo 150 palavras. Tabelas devem ser incluídas no mesmo arquivo do manuscrito (após as referências) e as figuras devem ser enviadas como documento suplementar em arquivos individuais.

Relatos de Casos: Imagens em Medicina

Seção destinada à publicação de Imagens elucidativas, não usuais e/ou de amplo interesse de situações médicas. Deve conter até 500 palavras e um total de 5 referências. Duas a três imagens (resolução mínima de 300 dpi).

Cartas

Opiniões e comentários sobre artigo publicado na Revista, sobre temas de relevância científica e/ou observações clínicas preliminares. O texto deve ser breve com, no máximo, 500 palavras. Apenas uma tabela e uma figura são permitidas e, no máximo, cinco referências. Não devem ter resumo.

Comunicações Breves

Comunicações breves são resultados preliminares de pesquisas originais ou estudos mais pontuais que contêm todas as informações relevantes para que o leitor possa avaliar os seus resultados e conclusões, bem como replicar a pesquisa. A estrutura é semelhante a artigos originais; no entanto, o resumo (Português, Espanhol, ou Inglês) não deve exceder 150 palavras e o texto não deve exceder 1.200 palavras. Ter no máximo duas Tabelas ou Figuras.

Suplementos

Além dos números regulares, a CBR publica o suplemento da Semana Científica do HCPA.

CONFLITOS DE INTERESSE

Conflitos de interesse surgem quando o autor tem relações pessoais ou financeiras que influenciam seu julgamento. Estas relações podem criar tendências favoráveis ou desfavoráveis a um trabalho e prejudicar a objetividade da análise. Os autores devem informar sobre possíveis conflitos de interesse. Isso se estende para editoriais e artigos de revisão, e deve ser feito na ocasião do envio do manuscrito. Cabe ao editor decidir se esta informação deve ou não ser publicada e usá-la para tomar decisões editoriais. Uma forma

comum de conflito de interesse é o financiamento de trabalhos de pesquisa por terceiros, que podem ser empresas, órgãos públicos ou outros. Esta obrigação para com a entidade financiadora pode levar o pesquisador a obter resultados que a satisfaçam, tornando o estudo tendencioso. Autores devem descrever a interferência do financiador em qualquer etapa do estudo, bem como a forma de financiamento e o tipo de relacionamento estabelecido entre patrocinador e autor. Os autores podem optar por informar nomes de pareceristas para os quais seu artigo não deva ser enviado, justificando-se.

PRIVACIDADE E CONFIDENCIALIDADE

Informações e imagens de pacientes que permitam sua identificação só devem ser publicadas com autorização formal e por escrito do paciente, e apenas quando necessárias ao objetivo do estudo. Para a autorização formal, o paciente deve conhecer o conteúdo do artigo e ter ciência de que este artigo poderá ser disponibilizado na internet. Em caso de dúvida sobre a possibilidade de identificação de um paciente, como fotos com tarjas sobre os olhos, deve ser obtida a autorização formal. No caso de distorção de dados para evitar identificação, autores e editores devem assegurar-se de que tais distorções não comprometam os resultados do estudo.

EXPERIÊNCIAS COM SERES HUMANOS E ANIMAIS

Toda matéria relacionada com pesquisa em seres humanos e pesquisa em animais deve ter aprovação prévia de Comitê de Ética em Pesquisa ou Comissão de Ética no uso de animais, respectivamente. Os trabalhos deverão estar de acordo com as recomendações da Declaração de Helsinque (vigente ou atualizada), das Resoluções CNS 196/96 e complementares e da Lei 11.794/2008 para estudos em animais. É importante indicar o número do registro do projeto no respectivo Comitê ou Comissão de Ética, bem como da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, se aplicável.

PREPARO DO ARTIGO

O cadastro no sistema e posterior acesso ou login são obrigatórios para submissão e verificação do estágio das submissões.

Identificação: devem constar: a) Título do artigo, que deve ser claro e conciso. Não usar abreviaturas. Deve-se apresentar a versão do título reduzido para constar no cabeçalho e título no idioma inglês; b) nome completo dos autores; c) instituição e o setor ou unidade da instituição a que cada autor está filiado (títulos pessoais e cargos ocupados não deverão ser indicados); d) nome da instituição onde o trabalho foi realizado; e) indicação do autor responsável pela correspondência, acompanhada do endereço completo; e f) se tiver sido apresentado em reunião científica, deve-se indicar o nome do evento, o local e a data da realização.

TODOS OS NOMES DOS AUTORES INCLUÍDOS NO MANUSCRITO DEVEM SER CADASTRADOS NO SISTEMA

Resumo e Palavras-chave: os artigos devem conter o resumo em português e em inglês. Verificar a estrutura e o número máximo de palavras conforme descrito para cada tipo de artigo específico (ver anteriormente). Os resumos estruturados, exigidos apenas para os artigos originais, devem apresentar, no início de cada parágrafo, o nome das subdivisões que compõem a estrutura formal do artigo (Introdução, Métodos, Resultados e Conclusões). As palavras-chave, expressões que representam o assunto tratado no trabalho, devem ser em número de 3 a 10, fornecidas pelo autor, baseando-se no DeCS (Descritores em Ciências da Saúde) publicado pela Bireme, que é uma tradução do MeSH (Medical SubjectHeadings) da National Library of Medicine, disponível no endereço eletrônico: <http://decs.bvs.br>. As palavras-chave devem ser apresentados em português e em inglês.

Manuscrito: deverá obedecer à estrutura exigida para cada categoria de artigo. Citações no texto e as referências citadas nas legendas das tabelas e das figuras devem ser numeradas consecutivamente na ordem em que aparecem no texto, com algarismos arábicos. As referências devem ser citadas no texto sobrescritas, conforme o exemplo: Texto¹.texto¹⁻³, texto^{4,6,9}.

Tabelas: devem ser numeradas consecutivamente, com algarismos arábicos, na ordem em que foram citadas no texto e encabeçadas por um título apropriado. Devem ser citadas no texto, mas deve-se evitar a duplicação de informação. As tabelas, com seus títulos e rodapés, devem ser autoexplicativas. As abreviações devem ser especificadas como nota de rodapé sem indicação numérica. As demais notas de rodapé deverão ser feitas em algarismos arábicos e sobrescritas.

Figuras e gráficos: as ilustrações (fotografias, gráficos, desenhos, etc.) devem ser enviadas em arquivos separados, em formato JPG (em alta resolução – no mínimo, 300 dpi). Devem ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos, na ordem em que foram citadas no texto e serem suficientemente claras para permitir sua reprodução e estarem no mesmo idioma do texto. Não serão aceitas fotocópias. Se houver figuras extraídas de outros trabalhos previamente publicados, os autores devem providenciar a permissão, por escrito, para a sua reprodução. Esta autorização deve acompanhar os manuscritos submetidos à publicação. As figuras devem possuir um título e legenda (se necessário). Ambos devem preceder a figura propriamente dita.

Abreviações: as abreviações devem ser indicadas no texto no momento de sua primeira utilização. No restante do artigo, não é necessário repetir o nome por extenso.

Nome de medicamentos: deve-se usar o nome genérico.

Havendo citação de aparelhos/equipamentos: todos os aparelhos/equipamentos citados devem incluir modelo, nome do fabricante, estado e país de fabricação.

Agradecimentos: devem incluir a colaboração de pessoas, grupos ou instituições que tenham colaborado para a realização do estudo, mas cuja contribuição não justifique suas inclusões como autores; neste item devem ser incluídos também os agradecimentos por apoio financeiro, auxílio técnico, etc. Devem vir antes das referências bibliográficas.

Conflitos de interesse: Caso haja algum conflito de interesse (ver anteriormente) o mesmo deve ser declarado. Caso não haja, colocar nesta seção: “Os autores declaram não haver conflito de interesse”

Referências: devem ser numeradas consecutivamente, na mesma ordem em que foram citadas no texto e identificadas com algarismos arábicos. A apresentação deverá estar baseada no formato denominado “*Vancouver Style*”, conforme exemplos abaixo, e os títulos de periódicos deverão ser abreviados de acordo com o estilo apresentado pela ListofJournalIndexed in Index Medicus, da National Library of Medicine e disponibilizados no endereço: <ftp://nlimpubs.nlm.nih.gov/online/journals/ljiweb.pdf>. Os autores devem certificar-se de que as referências citadas no texto constam da lista de referências com datas exatas e nomes de autores corretamente grafados. A exatidão das referências bibliográficas é de responsabilidade dos autores. Comunicações pessoais, trabalhos inéditos ou em andamento poderão ser citados quando absolutamente necessários, mas não devem ser incluídos na lista de referências e apenas citados no texto. Caso entendam necessário, os editores podem solicitar a apresentação de trabalhos não publicados citados no manuscrito.

Exemplos de citação de referências:

Artigos de periódicos (de um até seis autores)

Almeida OP. A autoria de artigos científicos: o que fazem os tais autores? *Rev Bras Psiquiatr.* 1998;20:113-6.

Artigos de periódicos (mais de seis autores)

Slatopolsky E, Weerts C, Lopez-Hilker S, Norwood K, Zink M, Windus D, et al. Calciumcarbonate as a phosphatebinder in patientswithchronic renal failureundergoingdialysis. *N Engl J Med.* 1986;315:157-61.

Artigos sem nome do autor

Cancer in South Africa [editorial]. *S Afr Med J.* 1994;84:15.

Livros no todo

Ringsven MK, Bond D. Gerontology and leadership skills for nurses. 2nd ed. Albany (NY): Delmar Publishers; 1996.

Capítulos de livro

Phillips SJ, Whisnant JP. Hypertension and stroke. In: Laragh JH, Brenner BM, editors. Hypertension: pathophysiology, diagnosis, and management. 2nd ed. New York: Raven Press; 1995. p. 465-78.

Livros em que editores (organizadores) são autores

Norman IJ, Redfern SJ, editors. Mental healthcare for elderly people. New York: Churchill Livingstone; 1996.

Teses

Kaplan SJ. Post-hospital home healthcare: the elderly's access and utilization [dissertation]. St. Louis (MO): Washington Univ.; 1995.

Trabalhos apresentados em congressos

Bengtsson S, Solheim BG. Enforcement of data protection, privacy and security in medical informatics. In: Lun KC, Degoulet P, Piemme TE, Rienhoff O, editors. MEDINFO 92. Proceedings of the 7th World Congress on Medical Informatics; 1992 Sep 6-10; Geneva, Switzerland. Amsterdam: North-Holland; 1992. p. 1561-5.

Artigo de periódico em formato eletrônico

Morse SS. Factors in the emergence of infectious diseases. Emerg Infect Dis [serial online] 1995 Jan-Mar [cited 1996 Jun 5]; 1(1):[24 screens]. Available from: URL: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/eid.htm>.

Outros tipos de referência deverão seguir o documento

International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals:
Sample References http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Requisitos técnicos

Arquivo word (doc ou .rtf), digitado em espaço simples, fonte tamanho 10, margem de 2 cm de cada lado, página de título, resumo e descritores, texto, agradecimentos, referências, tabelas e legendas e as imagens enviadas em formato jpg ou tiff com resolução mínima de 300dpi.

8 jan 2016

Clin Biomed Res 2016