

***Galleria mellonella*: um hospedeiro experimental alternativo para estudos de infecções por bactérias gram-positivas¹**

Natália Morelo²
Danielle Silva Trentin³

Resumo

Bactérias gram-positivas podem causar diversas infecções graves e o problema da resistência aos agentes antibacterianos representa uma grande ameaça à saúde pública. Para verificar a eficácia de tratamentos antibacterianos e para entender os mecanismos de patogenicidade bacteriana, é necessária a utilização de modelos experimentais *in vivo*. O interesse no modelo de larvas de *Galleria mellonella* tem aumentado nos últimos dez anos, especialmente, devido às características fisiológicas desse invertebrado. A presente revisão compila a totalidade de 70 artigos científicos disponíveis na literatura que utilizam o modelo de *G. mellonella* para investigar infecções causadas por bactérias gram-positivas de importância médica. Embora existam limitações, considerando a padronização de protocolos e a manutenção das larvas, o incipiente modelo de *G. mellonella* é promissor para a avaliação da virulência de micro-organismos e da eficácia de antibacterianos em diversas infecções causadas por bactérias gram-positivas patogênicas.

Palavras-chave: *Galleria mellonella*. Bactérias gram-positivas. Modelos experimentais alternativos.

Abstract

Gram-positive bacteria may cause serious infections and the problem of the resistance to antibacterial agents poses a major threat to public health. In order to verify the efficacy of antibacterial treatments, as well as, to understand bacterial pathogenicity mechanisms, it is required the use of in vivo experimental models. The interest in Galleria mellonella larvae model has increased in the last ten years, particularly for the study of microbial infections, due to the physiological characteristics of this invertebrate. The present revision compiles a total of 70 scientific papers available in literature using G. mellonella as model for investigating infections caused by clinically important gram-positive bacteria. Although there are limitations regarding protocol standardization and maintenance of the larvae, the G. mellonella model is promising for evaluation of microbial virulence and efficacy of antibacterials in several infections caused by pathogenic gram-positive bacteria.

Keywords: *Galleria mellonella*. Gram-positive bacteria. Experimental alternative models.

1 Este artigo é trabalho de conclusão de curso apresentado na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil, em 23/06/2016, sob a orientação da Prof^ª. Dr^ª. Danielle Silva Trentin. Este estudo contou com o apoio financeiro do CNPq (Edital Universal - processo nº 443150/2014-1).

2 Acadêmica de graduação da Faculdade de Farmácia da UFRGS. E- mail: natymorelo@gmail.com

3 Doutora em Ciências Farmacêuticas pela UFRGS e pós-doutora pela UFRGS, Grupo de Biofilmes e Diversidade Microbiana. Docente na Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS, Brasil. E- mail: danistrentin@gmail.com

1 Introdução

Bactérias gram-positivas são responsáveis por diversas infecções graves, como meningite, sepse, endocardite, pneumonia, osteomielite, fasciíte necrozante, dentre outras (MENICHETTI, 2005). Morfologicamente, as principais formas encontradas são os cocos e bacilos. O gênero *Staphylococcus* corresponde a cocos agrupados aleatoriamente, especialmente na forma de cachos, sendo *Staphylococcus aureus* o principal patógeno oportunista de importância clínica. Cocos gram-positivos organizados aos pares ou em cadeia são característicos de bactérias dos gêneros *Streptococcus* e *Enterococcus*, dentre as quais se destacam como patógenos humanos oportunistas, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*. Os bacilos, que possuem formato de bastão, encontram-se isolados ou agrupados em duplas, cadeias ou lado a lado. São exemplos de bacilos gram-positivos de importância médica *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* e *Bacillus weihenstephanensis* (MURRAY; PFALLER; ROSENTHAL, 2014).

A incidência de infecções, causadas por bactérias gram-positivas, cresceu significativamente, a partir dos anos 1990 (CHEN *et al.*, 1999). Atualmente, sabe-se que esses micro-organismos possuem um vasto repertório genético que os tornam capazes de apresentar resistência à maioria dos agentes antibacterianos disponíveis comercialmente. De fato, infecções causadas por cocos gram-positivos apresentando resistência a múltiplos fármacos podem estar associadas ao ambiente hospitalar, mas também podem ser encontradas na comunidade (MUNITA; BAYER; ARIAS, 2015).

A resistência aos agentes antibacterianos é um problema mundial e representa uma grande ameaça à saúde pública. Consequentemente, a redução na eficácia do tratamento de infecções resulta em um aumento da morbidade e mortalidade (SMITH; COAST,

2002). Nos Estados Unidos da América, pelo menos 2 milhões de pessoas adoecem e 23 mil morrem todo o ano, devido a infecções causadas por micro-organismos resistentes aos antimicrobianos (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2013). Em 2005, um número estimado de 94 mil infecções invasivas por *S. aureus* metilina resistente (MRSA) necessitaram de hospitalização e causaram 19 mil mortes (KLEVENS, 2007). Estima-se que 25 mil pessoas morrem anualmente por infecções causadas por patógenos resistentes aos antimicrobianos na Europa (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, 2009).

Os custos para tratar infecções por organismos resistentes são, na maioria das vezes, consideravelmente maiores do que para tratar infecções por organismos suscetíveis (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014), estando a resistência dos micro-organismos entre os principais fatores responsáveis pelas: (i) hospitalizações estendidas, (ii) tratamentos mais caros e prolongados, (iii) necessidade de consultas médicas adicionais e (iv) maior utilização dos serviços de saúde. Estima-se que, nos Estados Unidos, os gastos ocasionados para tratar infecções causadas por bactérias resistentes a antimicrobianos sejam de aproximadamente 20 bilhões de dólares por ano. Se considerarmos o custo adicional para a sociedade, devido à perda de produtividade de recursos humanos, esse valor sobe para 35 bilhões de dólares (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2013). Adicionalmente, estima-se que o aumento contínuo da resistência bacteriana aos antimicrobianos resultará, até 2050, em 10 milhões de mortes por ano e em uma redução de 2 a 3,5 % do produto interno bruto no mundo, custando aproximadamente até 100 trilhões de dólares (O'NEILL, 2014).

Dentre as principais espécies de bactérias gram-positivas que apresentam resistência a múltiplos antibacterianos, destacam-se: *S. aureus* resistente à metilina, *E. faecium* resistente

à vancomicina e *S. pneumoniae*. Com a globalização, cepas bacterianas, apresentando novos perfis de resistência, passaram a se disseminar com facilidade. Por exemplo, na década de 90, uma cepa de *S. pneumoniae* resistente à penicilina foi identificada pela primeira vez na Espanha, e rapidamente foi encontrada em países da América do Sul, nos Estados Unidos, México, Malásia, Filipinas, África do Sul e República da Coréia (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2000).

Streptococcus pneumoniae é naturalmente suscetível à maioria dos antimicrobianos disponíveis, incluindo as penicilinas. O primeiro surto de *S. pneumoniae* resistente à penicilina foi na década de 1970, desde então, a resistência a essa classe de antibacterianos aumentou mundialmente (JACOBS *et al.*, 1978). A prevalência de pneumococos resistentes aos β -lactâmicos varia muito entre regiões (MUNITA; BAYER; ARIAS, 2015) e a resistência à vancomicina ainda não é conhecida, porém cepas com tolerância a esse antibacteriano já foram reportadas (CHENOWETH *et al.*, 2000). Felizmente, poucos casos de cepas de *Streptococcus* resistentes à daptomicina e à linezolida têm sido descritos (MENDES *et al.*, 2014; AKINS *et al.*, 2015).

A resistência de *Enterococcus* à vancomicina foi reportada na década de 1980 (UTTLEY *et al.*, 1989). *Enterococcus* resistentes aos glicopeptídeos, como a vancomicina e a teicoplanina, estão distribuídos em diversas partes do mundo e demonstram heterogeneidade genotípica e fenotípica (ARTHUR; COURVALIN, 1993). A concentração inibitória de ampicilina e penicilina para *Enterococcus* é consideravelmente maior do que para outros micro-organismos gram-positivos e isolados de *Enterococcus* frequentemente apresentam tolerância aos antibióticos β -lactâmicos. Entretanto, dificilmente *E. faecalis* apresenta resistência a altos níveis de ampicilina (HOLLENBECK; RICE, 2012), diferentemente de *E. faecium* multirresistente. *Enterococcus* são menos suscetíveis à daptomicina que os *Staphylococcus* e os primeiros isolados

clínicos resistentes à linezolida descritos foram de *E. faecium* (MUNITA; BAYER; ARIAS, 2015).

Com relação à *S. aureus*, a maioria das cepas é penicilina-resistente por produzir a enzima β -lactamase (MUNITA; BAYER; ARIAS, 2015). Na década de 1960, os primeiros isolados clínicos MRSA foram reportados, logo após o início da utilização da meticilina na clínica. Isolados MRSA foram identificados no ambiente hospitalar e tornaram-se uma preocupação, devido ao fato de que essas cepas apresentam resistência a todos antibacterianos β -lactâmicos, incluindo penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos, exceção feita às novas cefalosporinas anti-MRSA (NAIMI, 2003). Assim, a vancomicina passou a ser muito utilizada para tratar infecções por MRSA, tornando-se o tratamento de escolha para essas condições. No entanto, a utilização em excesso desse antibacteriano resultou no surgimento de cepas MRSA com suscetibilidade reduzida à vancomicina (SUJATHA; PRAHARAJ, 2012; HIRAMATSU *et al.*, 1997) e com resistência à vancomicina (WEIGEL, 2003; HOWDEN *et al.*, 2004). Embora a resistência à daptomicina e à linezolida já tenham sido reportadas (TSIODRAS *et al.*, 2001; MANGILI *et al.*, 2005), isolados de *S. aureus* são comumente suscetíveis a esses antimicrobianos e ambos podem ser associados no tratamento com vancomicina (FOWLER *et al.*, 2006; MENDES; DESHPANDE; JONES, 2014).

Assim, observa-se que a resistência dos micro-organismos gram-positivos aos antibacterianos vem aumentando ao longo dos últimos anos e o desenvolvimento de fármacos com novos mecanismos de ação capazes de tratar as infecções por esses patógenos não tem acompanhado o crescente aparecimento de resistência. Devido ao fato de as bactérias gram-positivas resistentes estarem envolvidas em infecções graves, existe a necessidade do estabelecimento de regimes multifármacos capazes de controlar infecções, bem como do desenvolvimento de novos agentes antibacterianos como alternativas para o tratamento (BRADE; RYBAK;

RYBAK, 2016). O órgão norte americano *Food and Drug Administration* (FDA) recentemente aprovou novos antibacterianos para o tratamento de infecções por gram-positivos. A linezolida, daptomicina, tigeciclina, oritavancina e obiltoxaximabe foram aprovadas pelo FDA respectivamente em 2000, 2003, 2005, 2014 e 2016 (CENTER WATCH, 2016) e, atualmente, encontram-se na lista de antimicrobianos registrados no órgão regulador brasileiro Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), exceto a oritavancina e o obiltoxaximabe (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2016).

O processo de desenvolvimento de um novo medicamento para utilização na clínica é composto por diversas fases que avaliam sua segurança e eficácia. Primeiramente, o composto deve apresentar potencial terapêutico e não ser tóxico nos experimentos *in vitro*. Posteriormente, é necessário um modelo de experimentação animal para avaliar a toxicidade e atividade do composto *in vivo*. Estudos pré-clínicos em modelos animais são importantes para determinar a farmacocinética do composto, vias de administração, identificar possíveis limitações da eficácia *in vivo* ou possível toxicidade. De fato, a atividade do fármaco *in vivo* pode ser diminuída por consequência da ação de enzimas ou outros compostos degradadores, ligação a componentes do hospedeiro e outras condições fisiológicas, como o pH.

Normalmente, na avaliação inicial *in vivo* do composto ativo, utilizam-se modelos animais de roedores. Entretanto, a experimentação com mamíferos possui alguns pontos a serem considerados, tais como a necessidade de aprovação ética, o custo e o tempo para os ensaios (ZAK; O'REILLY, 1991). Dessa forma, a utilização de modelos alternativos eticamente mais aceitos e que apresentam baixo custo de manutenção são ideais para os experimentos de triagem, resultando em uma redução no uso de mamíferos nas fases iniciais do desenvolvimento de fármacos, como os antimicrobianos. Na tentativa de encontrar um modelo

não mamífero adequado, dentro das características citadas acima, desenvolveram-se modelos microbianos, de plantas, de insetos e de nematoides (SALAMITOU *et al.*, 2000; KAITO *et al.*, 2002; LAWS *et al.*, 2005 e SEABRA; BHOGAL, 2008). O uso do inseto *G. mellonella*, como modelo experimental, tornou-se bastante popular nos últimos anos, especialmente para o estudo da patogenicidade e da virulência de micro-organismos, bem como para avaliação de compostos antimicrobianos (FEDHILA *et al.*, 2010; MICHAUX *et al.*, 2013; MUKHERJEE *et al.*, 2013 e MAEKAWA *et al.*, 2015). Dessa forma, a presente revisão teve como objetivo compilar os trabalhos descritos na literatura e discutir a adequabilidade das larvas de *G. mellonella* como modelo experimental para o estudo de infecções causadas por bactérias gram-positivas. A pesquisa foi realizada nas bases de dados "Pubmed" e "Science Direct", utilizando os termos "*Galleria mellonella*", "infection", "model", "bacteria". Foram encontrados 233 artigos científicos utilizando o modelo de *G. mellonella* com a finalidade de analisar infecções por bactérias patogênicas ao ser humano. A partir desses artigos, selecionaram-se todos os estudos que envolviam bactérias gram-positivas.

2 *Galleria mellonella*: ciclo biológico e comparação com outros modelos invertebrados

O inseto *G. mellonella* possui um ciclo de vida de sete semanas. São necessárias cinco semanas para o desenvolvimento do ovo até o último estágio larval e duas semanas a partir do último estágio até a evolução à mariposa adulta. Os machos adultos medem de 10 a 15 mm e possuem cor bege e marcas escuras, enquanto as fêmeas adultas medem em torno de 20 mm e são mais escuras que os machos, possuindo cor marrom ou cinza. Para criá-las em laboratório, é necessário colocar as mariposas adultas em um recipiente com tampa e papéis para deposição dos ovos. As fêmeas depositam os ovos nas bordas dos papéis, após dois dias. Então, retiram-se os ovos e colocam-se em uma caixa plástica com tampa perfurada para permitir

a entrada de ar. Os ovos eclodem após 3 dias e as larvas são alimentadas com pólen e cera de abelha ou uma dieta artificial, que pode ser composta por mel líquido, glicerina e uma mistura de farinhas, como farinha de trigo, milho, levedo de cerveja e leite em pó. As larvas alimentam-se e crescem até atingirem o sexto estágio, no qual param de se alimentar para construir o casulo de seda e passar à fase de pupa. *Galleria mellonella* permanece no estágio de pupa por uma a duas semanas e, então, transforma-se em mariposa adulta (RAMARAO; NIELSEN-LEROUX; LERECLUS, 2012).

Em modelos de infecção, o invertebrado *G. mellonella* é normalmente utilizado no último estágio larval, quando as larvas param de se alimentar e pesam em torno de 200 a 300 mg. A infecção bacteriana pode ser realizada por via oral, intra-hemocele ou subcutânea (SALAMITOU *et al.*, 2000 e MICHAUX, *et al.*, 2012). A taxa de mortalidade das larvas é o parâmetro mais utilizado para a avaliação de processos infecciosos, sendo consideradas mortas as larvas que não se movem após o estímulo de toque (figura 1).

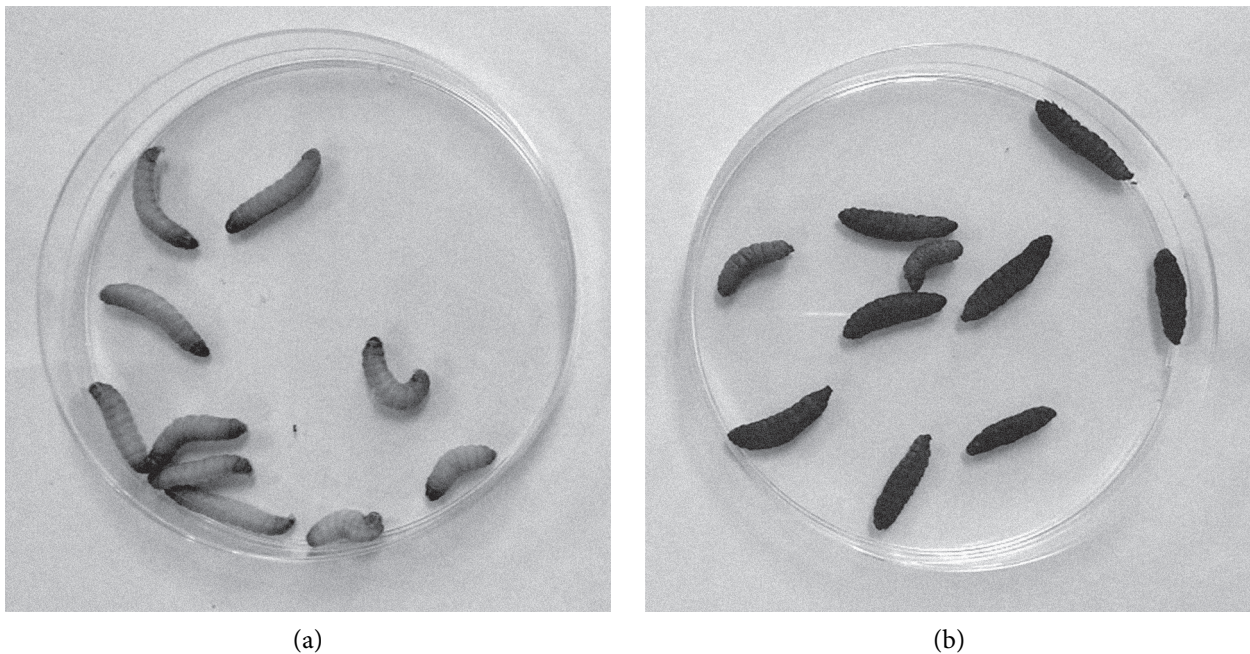


Figura 1 - Aparência das larvas de *G. mellonella* após infecção bacteriana. (A) Larvas vivas apresentam-se móveis e com coloração clara; (B) Larvas mortas adquirem coloração escura e não respondem ao toque (foto obtida no Laboratório de Biofilmes e Diversidade Microbiana da UFRGS)

Fonte: As autoras (2016).

O sistema imune dos insetos é constituído pelo sistema inato, sendo formado pela imunidade celular e humoral. A primeira linha de defesa de *G. mellonella* é a cutícula que forma uma barreira física composta por quitina. A imunidade celular é composta por células similares aos fagócitos, presentes nos mamíferos, chamadas de hemócitos. Essas células são responsáveis por realizar fagocitose, encapsulamento e coagulação e estão presentes na hemolinfa, a qual possui funções análogas à

corrente sanguínea nos mamíferos. A imunidade humoral é composta por moléculas solúveis que imobilizam ou eliminam o patógeno, entre essas moléculas estão proteínas tipo complemento, melanina e peptídeos antimicrobianos (KAVANAGH; REEVES, 2004).

Drosophila melanogaster é o inseto mais utilizado para estudar patogêneses humanas. Esse invertebrado apresenta genoma definido, sistema imune bem caracterizado e uma grande variedade de ferramentas genéticas. Apesar

dessas vantagens, *D. melanogaster* possui pequeno volume de hemolinfa e tamanho reduzido, o que exige maior técnica no manuseio das moscas e dificulta a injeção de antimicrobianos e a análise bioquímica da hemolinfa. Outra característica desfavorável é que *D. melanogaster* deve ser mantida em ambientes a aproximadamente 22°C, o que pode prejudicar a avaliação de infecções que ocorrem a 37°C por existirem fatores de virulência regulados pela temperatura (KEMP; MASSEY, 2007).

Caenorhabditis elegans é um modelo invertebrado bem estabelecido para avaliar infecção e, assim como *D. melanogaster*, possui genoma sequenciado. Além disso, *C. elegans* apresenta rápido ciclo de vida, habilidade de produzir prole idêntica geneticamente e capacidade de ser mantido em nitrogênio líquido, o que proporcionou a criação de um banco com milhares de cepas mutantes que podem ser obtidas a baixo custo (BAZOPOULOU; TAVERNARAKIS, 2009). Porém, algumas desvantagens podem ser observadas, como a simplicidade anatômica, que dificulta predição da atividade de compostos em humanos e a reprodução de certas doenças; o tamanho reduzido, que torna inviável determinar a concentração de composto absorvido; e a temperatura de manutenção desse nematódeo, que não pode atingir os 37°C (GLAVIS-BLOOM; MUHAMMED; MYLONAKIS, 2012).

Os primeiros trabalhos utilizando larvas de *G. mellonella*, como modelo de infecção bacteriana, foram publicados no final da década de 1950 e na década de 1960. Artigos científicos publicados nesse período avaliaram a possibilidade de imunização de *G. mellonella* contra a bactéria gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa* (CHADWICK; VILK, 1969; STEPHENS, 1959; STEPHENS, 1963). *Galleria mellonella* começou a ser difundida e atraiu atenção como modelo para estudos de infecção, principalmente após 2010 (figura 2). Recentemente, esse invertebrado vem sendo introduzido como hospedeiro experimental para estudar o efeito de bactérias probióticas na patogênese microbiana (KÖHLER, 2015). Uma das principais vantagens desse modelo é o fato da larva poder ser incubada a 37°C, o que mimetiza a temperatura do corpo humano. Além disso, o tamanho grande da larva e maior volume da hemolinfa em comparação *D. melanogaster* facilitam a manipulação e a injeção da quantidade conhecida de patógenos ou substâncias químicas. No entanto, diferentemente dos modelos invertebrados apresentados acima, *G. mellonella* ainda não possui o genoma sequenciado, o sistema imune está em fase de caracterização e faltam cepas padronizadas para serem adquiridas pela comunidade científica (KEMP; MASSEY, 2007 e TSAI; LOH; PROFT, 2016).

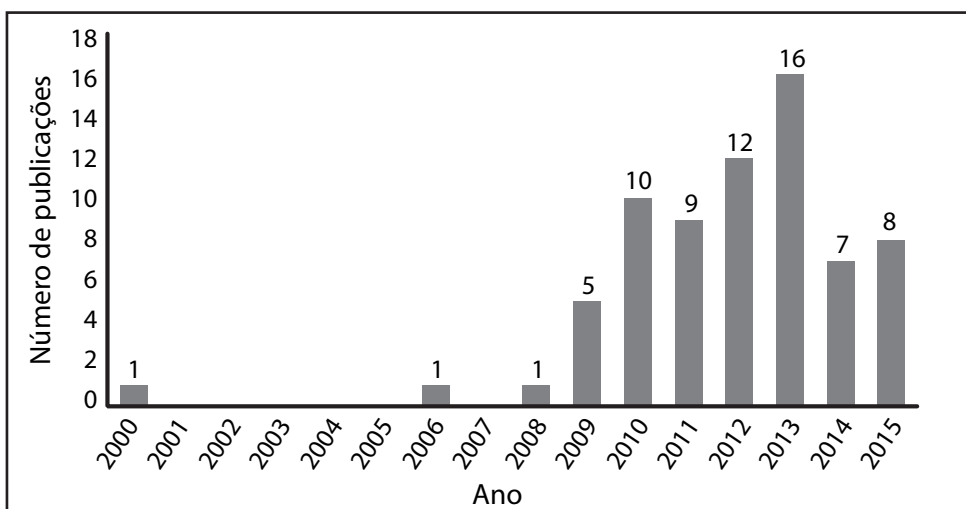


Figura 2 - Número de publicações por ano que utilizaram o modelo de *G. mellonella* para estudar infecções por bactérias gram-positivas patogênicas ao ser humano
 Fonte: As autoras (2016).

3 *Galleria mellonella* como modelo de infecção para bactérias gram-positivas

Foram encontrados na literatura 70 artigos científicos que avaliam infecções causadas por bactérias gram-positivas de importância médica em modelo de *G. mellonella* (APÊNDICE). As espécies *S. aureus* e *E. faecalis* foram as mais frequentemente utilizadas nos artigos presentes nessa revisão (figura 3). Estudos publicados até

maio de 2016 mostram que o modelo é muito utilizado para avaliar fatores de virulência e a atividade antimicrobiana de compostos (figura 4) (BIONDA *et al.*, 2013 e FRENZEL *et al.*, 2012). Além disso, alguns estudos utilizam o modelo de *G. mellonella* e modelo de ratos para avaliar a virulência de determinadas bactérias e, então, comparam os resultados obtidos nos dois modelos (LEBRETON *et al.*, 2009; SHARMA-KUINKEL *et al.*, 2015).

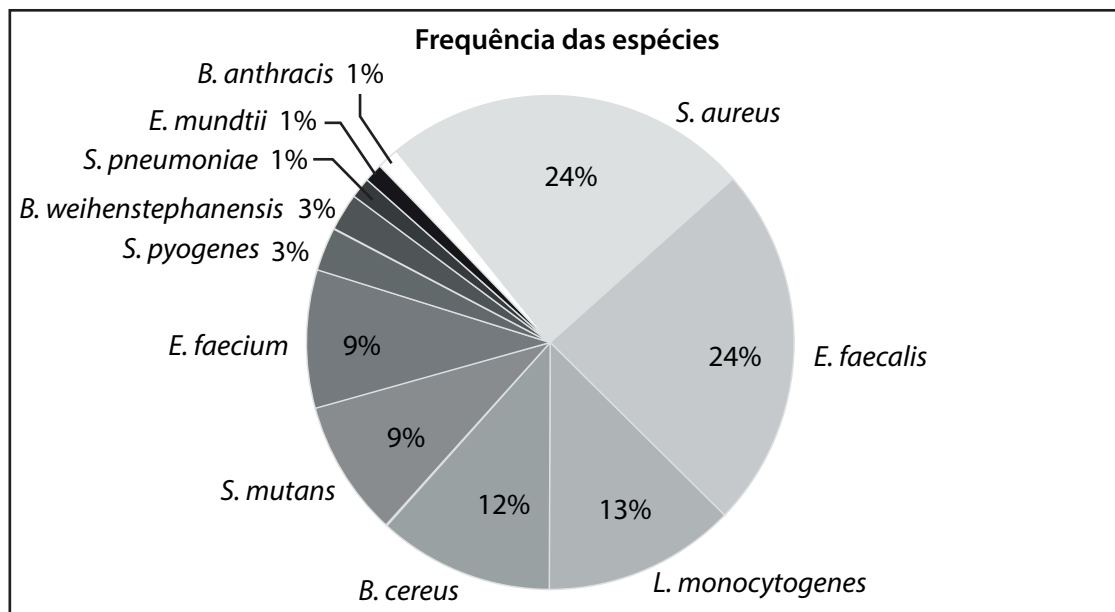


Figura 3 – Porcentagem da frequência de utilização das espécies nos artigos pesquisados
Fonte: As autoras (2016).

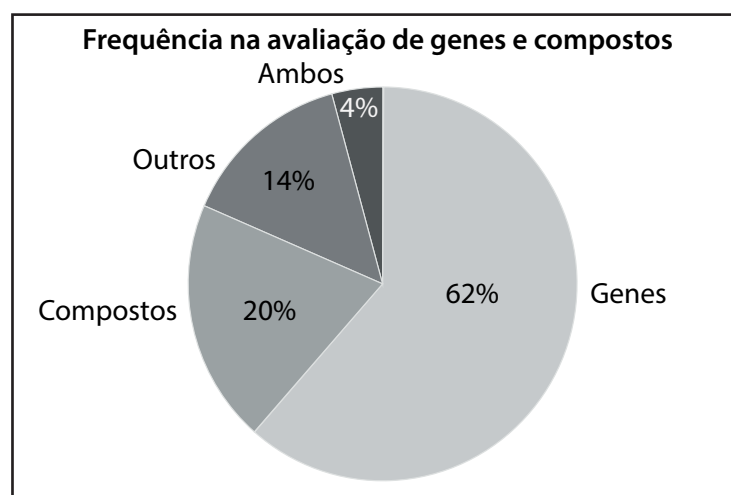


Figura 4 – Porcentagem da frequência de avaliação de genes e compostos nos artigos pesquisados. Os artigos que não avaliavam genes relacionados à virulência ou à ação de compostos antibacterianos, no gráfico, categorizados como "outros", destinam-se a padronizar ou avaliar as larvas de *G. mellonella* como modelo para determinada infecção
Fonte: As autoras (2016).

3.1 *Galleria mellonella* como modelo de infecção bacteriana por *S. aureus*

Staphylococcus aureus é uma bactéria da microbiota normal humana, presente em aproximadamente 60% da população, encontrada especialmente na pele e nas mucosas. Apesar de ser uma bactéria comensal e seus portadores serem comumente assintomáticos, *S. aureus* tem o potencial de causar infecções oportunistas hospitalares e comunitárias (MUENKS *et al.*, 2016). Sabe-se que pacientes com imunidade comprometida, hospitalização prolongada, uso de cateter e procedimentos cirúrgicos são fatores de risco para infecção por MRSA, no entanto, além do número alarmante de infecções hospitalares, causadas por esse patógeno, cresce o número de casos de MRSA adquiridos na comunidade (NAIMI, 2003). Por essas razões, existe grande necessidade e interesse na identificação de novos compostos antibacterianos e no estudo dos fatores de virulência dessa bactéria. Seguindo os critérios propostos nesta revisão, foram identificados 18 artigos científicos, nos quais se utilizou o modelo da *G. mellonella* para avaliar a patogenicidade da infecção por *S. aureus*.

Desbois e Coote (2011) analisaram a eficácia de antimicrobianos em infecções sistêmicas por *S. aureus* no modelo de *G. mellonella*. Vancomicina e daptomicina mostraram-se eficazes no tratamento de infecções por MRSA em doses próximas às utilizadas em humanos. A penicilina mostrou-se eficaz para tratar larvas infectadas com *S. aureus* sensível à meticilina (MSSA) e ineficaz para tratar larvas infectadas com MRSA. Esses resultados demonstraram que *G. mellonella* é um modelo útil para avaliar a atividade de antimicrobianos contra *S. aureus*. Farha *et al.* (2013) constataram que o tratamento combinado de cefuroxima e ticlopidina nas larvas infectadas com MRSA possui ação antimicrobiana significativamente maior do que a cefuroxima utilizada isoladamente, evidenciando a utilidade do modelo para avaliação de regimes de fármacos antimicrobianos. Consistente com

os modestos resultados anti-*S. aureus*, obtidos *in vitro*, o tratamento de larvas com o fármaco terfenadina não apresentou diferença na taxa de sobrevivência em relação ao controle negativo, no estudo conduzido por Jacobs *et al.* (2013).

Considerando a avaliação de novos compostos, Gibreel e Upton (2013) avaliaram a eficácia da epidermicina NI01, um novo peptídeo antimicrobiano sintético, em tratar infecções por MRSA e MSSA no modelo de larvas de *G. mellonella*. O peptídeo demonstrou ter atividade perante cepas resistentes e sensíveis a meticilina (GIBREEL; UPTON, 2013). Depsipeptídeos cíclicos e lineares foram testados *in vivo* contra MRSA no estudo de Bionda *et al.* (2013). Os depsipeptídeos cíclicos aumentaram significativamente a taxa de sobrevivência das larvas de *G. mellonella*, sendo que o composto sem o grupamento amida apresentou atividade mais acentuada (BIONDA *et al.*, 2013). O candidato a novo antimicrobiano, acetato de prata (I)-3-dibenzil-4,5-difenil-imidazol-2-ilideno, foi testado contra *S. aureus* por Browne e colaboradores (2014). Após 72 horas, a maior taxa de sobrevivência da larva ($46,7 \pm 12\%$) foi obtida no tratamento com $0,2 \mu\text{g}$ do composto, enquanto que as larvas do grupo não tratado apresentaram uma taxa de sobrevivência de $15 \pm 5\%$ (BROWNE *et al.*, 2014). Coughlan *et al.* (2010) avaliaram o efeito dos íons zinco e prata no crescimento do *S. aureus*. Esse estudo demonstrou correlação positiva entre a concentração dos íons e a inibição do crescimento bacteriano em *G. mellonella*.

A fim de estudar o efeito de determinados agentes químicos sobre a patogenicidade bacteriana, alguns pesquisadores trataram as bactérias *in vitro* com o agente e então inocularam as bactérias já tratadas nas larvas de *G. mellonella*. Nesse sentido, Latimer, Forbes e McBain (2012) e Apolônio *et al.* (2014) submetteram *S. aureus* a doses subletais de triclosan e de eugenol e citral, respectivamente. Constatou-se que a pré-exposição a esses compostos diminuiu a virulência da bactéria, aumentando a sobrevivência da larva. O triclosan induziu a bactéria a um fenótipo

“small-colony variant” (SCV), ou seja, a uma variante de colônias pequenas, que se caracteriza pelo crescimento lento, menor suscetibilidade a antimicrobianos e pigmentação reduzida (LATIMER; FORBES; MCBAIN, 2012).

O modelo de *G. mellonella* também tem sido utilizado para avaliar a relevância de genes na virulência de bactérias. Um dos métodos utilizados é o desenvolvimento de cepas com mutação no gene de interesse, ou seja, de cepas mutantes. Mutações inativando o gene regulador acessório *agr*, o qual é conhecido por regular a virulência de *S. aureus*, levaram à atenuação da virulência da bactéria *in vivo* (PELEG *et al.*, 2009 e LENHARD *et al.*, 2015). Os autores demonstraram que uma cepa de MRSA com concentração inibitória mínima elevada para vancomicina e disfunção no gene *agr*, causaram menor mortalidade das larvas. Gao *et al.* (2010), Purves *et al.* (2010), Quiblier *et al.* (2013) e Cameron *et al.* (2015) desenvolveram cepas mutantes em *relA*, *gapA* e *gapB*, *secDF* e *mprF*, respectivamente. O gene *relA* codifica uma enzima responsável por modular os níveis de guanosina pentafofato, os genes *gapA* e *gapB* codificam duas enzimas gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase homólogas, *secDF* contribui para a exportação de proteínas e *mprF* está envolvido na biossíntese de fosfolípidios. Os autores comprovaram que esses genes desempenham função na virulência de *S. aureus*, pois todas as cepas mutadas apresentaram virulência atenuada em comparação às cepas de origem. Similarmente, Richards *et al.* (2015) isolaram duas cepas, provenientes de pacientes diagnosticados com bacteremia persistente por MRSA e avaliaram a mortalidade e a carga bacteriana nas larvas de *G. mellonella*. Os resultados sugerem que mutações no gene *mprF* são fatores importantes para persistência de *S. aureus* em bacteremias. Por outro lado, Furi *et al.* (2013) verificaram, através de uma mutação na região promotora do gene *norA*, que esse gene não desempenha um papel importante durante a infecção de *S. aureus* em *G. mellonella*, pois o mutante não alterou a taxa de mortalidade das

larvas. O gene *norA* é responsável por codificar uma bomba de efluxo, responsável pelo desenvolvimento de resistência a antimicrobianos, sendo norfloxacino e ciprofloxacino os substratos com maior relevância clinicamente.

Browne *et al.* (2015) avaliaram a influência do tempo de pré-incubação a 15°C na suscetibilidade das larvas de *G. mellonella* à infecção por *S. aureus*. Os autores verificaram que, quanto maior o tempo de pré-incubação, menor a taxa de sobrevivência das larvas.

A correlação entre o modelo de infecção de *S. aureus* em *G. mellonella* e em vertebrados tem sido estabelecida recentemente. Ao avaliar a patogenicidade de *S. aureus* pertencentes ao complexo clonal 30, Sharma-Kuinkel *et al.* (2015) encontraram resultados semelhantes para sepse em modelos de ratos e de larvas de *G. mellonella*. Adicionalmente, observou-se, nos dois modelos, o aumento da taxa de sobrevivência dos hospedeiros infectados por cepas do complexo clonal 30, quando comparados a outras cepas de *S. aureus*.

3.2 *Galleria mellonella* como modelo de infecção bacteriana por *Streptococcus* spp.

Streptococcus mutans é o principal agente etiológico da cárie dental em seres humanos. Essa bactéria também está associada a doenças não orais como endocardite infecciosa e possivelmente com doença aterosclerótica coronariana (NAKANO; NOMURA; OOSHIMA, 2008). A capacidade de sobreviver a mudanças de pH e à tensão de oxigênio, bem como à disponibilidade de nutrientes encontrados em biofilmes dentais são fatores essenciais para virulência desse organismo (KAJFASZ *et al.*, 2010). Por seu potencial patogênico não estar restrito apenas à cavidade oral, é importante a identificação e a caracterização dos seus fatores de virulência.

Streptococcus pneumoniae é uma bactéria comensal presente na nasofaringe e normalmente seus portadores não apresentam sintomas. É um patógeno oportunista que pode causar doenças

como meningite, otite, pneumonia e septicemia (MITCHELL, 2003). Os grupos de risco para tais infecções são as crianças, os idosos e pessoas com imunodeficiência, sendo que o desenvolvimento de resistência à penicilina e a outros antibacterianos torna muitas vezes complicado o tratamento de infecções por esse patógeno (BOGAERT; DE GROOT; HERMANS, 2004).

Streptococcus pyogenes é um patógeno responsável por uma ampla variedade de infecções, tais como faringite não complicada, tonsilite, impetigo e febre reumática aguda. *Streptococcus pyogenes* é uma importante causa de morbimortalidade principalmente em países em desenvolvimento (CARAPETIS *et al.*, 2005). Por ser um patógeno estritamente humano, torna-se difícil desenvolver um modelo animal confiável. Entretanto, existem diversos modelos bem estabelecidos em ratos e macacos que provaram ser válidos para avaliar a infecção por *S. pyogenes*. Com as dificuldades encontradas para utilização de mamíferos, como aprovação ética e alto custo, cresceu a busca por modelos alternativos (LOH *et al.*, 2013).

Abranches *et al.* (2011) observaram que a ausência do gene *cnm*, codificador de uma proteína de ligação à laminina e ao colágeno, resultou na atenuação da virulência de *S. mutans*. A cepa mutante conferiu uma taxa de mortalidade das larvas de *G. mellonella* equivalente às cepas não invasivas. O estudo ainda constatou que a inativação de *cnm* impede a bactéria de invadir células endoteliais da artéria coronária humana primária e que o gene está presente somente nas cepas invasivas. Avilés-Reyes *et al.* (2014b) demonstraram que a virulência de uma cepa de *S. mutans* com deleção no gene *pgfS* foi menor do que a da cepa de origem (OMZ175). Os autores observaram que esse gene está envolvido com modificações pós-traducionais da proteína Cnm e contribui para a expressão dos fenótipos associados à virulência relacionados a essa proteína. Em outro estudo, no mesmo período, o autor comprovou que o gene *cnm* é importante para virulência de *S. mutans*. Através da aplicação de anticorpos anti-*cnm* nas larvas, observou-se um

aumento significativo na taxa de sobrevivência das mesmas. Os genes *cna* e *cbp*, que codificam proteínas de superfície putativas de ligação ao colágeno e estão relacionados ao gene *cnm*, também foram avaliados, porém não demonstraram ter papel na virulência da bactéria nesse modelo (AVILÉS-REYES *et al.*, 2014a).

Kajfasz *et al.* (2010) reportaram o papel dos genes *spx* em *S. mutans* e constataram que as cepas com ausência de *spxA* ou *spxB* causam menor mortalidade em larvas de *G. mellonella*. Os mutantes *spxA* e *spxA/spxB* também mostraram capacidade reduzida de colonizar os dentes de ratos, exceto o mutante *spxB* (KAJFASZ *et al.*, 2010). Do mesmo modo, a deficiência no gene *brpA*, conhecido por seu papel na tolerância ao estresse oxidativo e na formação de biofilme de *S. mutans*, aumentou a taxa de sobrevivência de *G. mellonella* quando comparada com a cepa OMZ715, considerada altamente invasiva no modelo (BITOUN *et al.*, 2012). A ausência do gene *pgmB* também resultou em uma diminuição da virulência bacteriana de *S. mutans* em *G. mellonella*. A expressão desse gene é importante para a tolerância do *S. mutans* ao meio ácido (BUCKLEY; FAUSTOFERRI; QUIVEY, 2014). O papel na virulência de *S. mutans* das glicosilases (Fpg and MutY) e endonucleases (Smx and Smn) da via de reparo do DNA por excisão de bases foram avaliadas por Gonzalez; Faustoferri e Quivey Junior (2012). A taxa de mortalidade foi significativamente maior em larvas infectadas com mutantes de *fgp*, *muty* e *smn*. Porém, o mutante *smx* não apresentou diferença significativa na virulência em comparação à cepa de origem.

Considerando *S. pneumoniae*, Evans e Rozen (2012) avaliaram a importância dos genes *ply*, *spxB* e *dltA*, responsáveis pela produção de pneumolisina, peróxido de hidrogênio e D-alanilação do ácido teicoico, respectivamente, na patogenicidade bacteriana. A presença de cápsula também foi avaliada durante a infecção na *G. mellonella*. Observou-se que a deleção dos genes *ply*, *dltA* e a ausência de cápsula, diminuiu significativamente a virulência da bactéria. A

deleção do gene *spxB* não causou mudança na virulência da bactéria (EVANS; ROZEN, 2012).

Para padronizar e validar infecções por *S. pyogenes* no modelo de *G. mellonella*, Olsen *et al.* (2011) inocularam diferentes cepas em concentrações distintas e compararam o resultado com o encontrado previamente em mamíferos. Observou-se que, quanto maior a quantidade de unidades formadoras de colônia (UFC) por inóculo, menor a taxa de sobrevivência das larvas. As larvas infectadas com a cepa mais virulenta apresentaram efeitos patológicos, como acúmulo de melanina e coagulação da hemolinfa mais rapidamente que as cepas consideradas menos virulentas. Ao comparar os resultados com os obtidos em ratos, constatou-se que os dois modelos possuem correlação positiva. O estudo ainda avalia o efeito dos genes *mtsR*, *mga*, *prsA*, *slaA* e *speB* na virulência bacteriana, através da construção de mutantes com deficiência na expressão. Todas as bactérias com mutação apresentaram menor virulência do que as originais, demonstrando que os genes avaliados têm funções importantes na infecção por *S. pyogenes* (OLSEN *et al.*, 2011). Loh *et al.* (2013) observaram o efeito da temperatura na mortalidade das larvas, após infecção com *S. pyogenes*. As larvas mantidas a 28°C apresentaram DL₅₀ (dose letal capaz de matar 50% do grupo de larvas testado) significativamente maior do que às mantidas a 37°C, mostrando a influência da temperatura na taxa de mortalidade das larvas infectadas. A importância de proteínas com função na adesão bacteriana foi avaliada e mutantes, com deleções nos genes *emm* (a qual codifica a proteína M) e *pilM1* (a qual codifica a adesina pili), causaram, respectivamente, diminuição e aumento da virulência, comparados à cepa original (LOH *et al.*, 2013).

3.3 *Galleria mellonella* como modelo de infecção bacteriana por *Enterococcus* spp.

Enterococcus faecalis e *E. faecium* fazem parte da microbiota do trato gastrointestinal de seres humanos. Podem ser isolados de alimentos,

do solo, da água e de plantas, provavelmente devido à prévia disseminação por fontes fecais. As espécies têm tolerância elevada a condições adversas como a presença de NaCl até 6,5%, sais biliares até 40% e altos valores de pH, mantendo-se viáveis em diversos ambientes (OGIER; SERROR, 2008). *Enterococcus mundtii* é normalmente isolado de plantas, do solo e do úbere de vacas e dificilmente é associado a infecções humanas (COLLINS; FARROW; JONES, 1986). Atualmente, *E. faecalis* e *E. faecium* são considerados uma das maiores causas de infecções hospitalares no mundo (OGIER; SERROR, 2008). Por serem patógenos oportunistas, afetam pacientes imunocomprometidos e podem causar infecção urinária, endocardite, peritonite e septicemia, dentre outras doenças infecciosas (MURRAY, 1990).

Gaspar *et al.* (2009) demonstraram que *E. faecium* não é letal às larvas de *G. mellonella* nas condições estabelecidas pelo estudo (cepa QSE32). Por outro lado, isolados clínicos de *E. faecalis* (cepa OG1RF) e isolados de laticínios, quando testados nas mesmas condições que *E. faecium* (2 x 10⁶ UFC/larva via hemocele) demonstraram virulência *in vivo*, levando as larvas de *G. mellonella* à morte. O papel dos genes *gelE* e *fsrB* que codificam, respectivamente, os fatores de virulência gelatinase e Fsr, foram avaliados na virulência. Nas cepas de *E. faecalis*, provenientes de laticínios, ambos genes se mostraram importantes para a virulência, enquanto que no isolado clínico, observou-se que somente *gelE* contribui para virulência da bactéria em *G. mellonella*.

O papel do gene *ace*, responsável por codificar uma adesina de *E. faecalis*, na virulência bacteriana, foi avaliado através da construção de um mutante (LEBRETON *et al.*, 2009). A taxa de mortalidade foi significativamente menor nas larvas de *G. mellonella* infectadas com o mutante do que naquelas infectadas com a cepa original (JH2-2). Interessantemente, esse resultado correlaciona-se positivamente com o obtido em modelo de infecção do trato urinário

em ratos (LEBRETON *et al.*, 2009). A infecção oral por *E. faecalis* foi analisada por Fedhila *et al.* (2010) e observou-se que, por essa via, a bactéria é incapaz de causar a morte das larvas. De acordo com os autores, isso pode ser explicado pela dificuldade da bactéria em cruzar a barreira intestinal das larvas de *G. mellonella*.

Oliveira *et al.* (2011) demonstraram que a termotolerância e a virulência de *E. faecalis* é significativamente reduzida na ausência da proteína ClpB, uma proteína de choque-térmico. Michaux *et al.* (2012) avaliaram a relevância do gene *cspR* na infecção por *E. faecalis*. Esse gene é responsável por codificar uma proteína de choque térmico que se liga ao RNA. Observou-se que *cspR* é necessário para a total virulência da bactéria em *G. mellonella* e em ratos. Outro estudo de Michaux, publicado em 2013, verificou que a aplicação de anticorpos anti-CspR, simultaneamente à inoculação da bactéria, protege a larva da infecção por *E. faecalis*. Esse resultado evidencia o importante papel da proteína Csp para a patogenicidade de *E. faecalis*, evidenciando um importante alvo para o possível desenvolvimento de estratégias terapêuticas, incluindo imunológicas, para prevenir a infecção (MICHAUX *et al.*, 2013).

Para verificar a importância do gene *pmvE* na virulência do *E. faecalis*, Martini *et al.* (2015) desenvolveram um plasmídeo para aumentar a expressão desse gene. Ele possui um papel importante no metabolismo de poliaminas. As cepas com expressão aumentada causaram maior taxa de mortalidade em *G. mellonella* do que as cepas originais. De modo semelhante, o gene *pmvE* também se mostrou importante durante a infecção em modelo de rato (MARTINI *et al.*, 2015). O gene *slyA*, o qual codifica uma enzima envolvida na homeostase de poliaminas e evita a toxicidade dessas moléculas, é considerado um provável regulador da expressão do gene *pmvE* (MARTINI *et al.*, 2015). Cabe destacar que Michaux *et al.* (2011) avaliaram a influência do gene *sly* na infecção de *E. faecalis* em ratos e em *G. mellonella*. No primeiro modelo, foi

realizada infecção intravenosa e a carga bacteriana no fígado e rins foi estimada. A cepa de *E. faecalis* com deleção em *sly* conferiu maior carga bacteriana nas larvas do que a cepa de origem. No modelo de *G. mellonella*, foi observado o aumento da taxa de mortalidade das larvas, em comparação à original, ao inocular a bactéria com deleção em *sly*. Assim, os resultados obtidos nos dois modelos corroboram a hipótese de que o gene *sly* codifica um regulador de transcrição que é responsável pela repressão de fatores de virulência (MICHAUX *et al.*, 2011).

A resistência de *E. faecalis* à lisozima, componente do sistema imune inato de humanos, foi analisada por Benachour *et al.* (2012) e mostrou-se complexa, possuindo diversos mecanismos aplicados a bactérias gram-positivas. No modelo de *G. mellonella*, observou-se atenuação da virulência, após deleção do gene *pgdA*, que codifica uma enzima que contribui na resistência à lisozima (BENACHOUR *et al.*, 2012). A relevância das enzimas antioxidantes metionina sulfóxido redutase A e B foi avaliada, através da construção de mutante no estudo conduzido por Zhao *et al.* (2010). O mutante *msrB* não apresentou mudança na virulência do *E. faecalis* em relação à cepa de origem (JH2-2); já o mutante *msrA* demonstrou virulência atenuada. A maior diminuição da virulência de *E. faecalis* foi observada no mutante com deleção em ambos genes, *mrsA* e *msrB*. No modelo com ratos os mutantes também diminuíram a virulência da bactéria, porém de forma mais acentuada (ZHAO *et al.*, 2010).

Yan *et al.* (2009) desenvolveram dois mutantes, um com deleção completa e outro com deleção parcial de *relA*, gene que codifica uma enzima responsável pela síntese e degradação do nucleotídeo guanosina pentafofato. O primeiro não demonstrou diferença na virulência, quando comparado à cepa original, enquanto o segundo tornou a infecção por *E. faecalis* mais severa, por expressar uma proteína modificada com possível potencial tóxico à larva.

La Rosa *et al.* (2012) criaram uma ferramenta baseada em bioluminescência, através do sistema luxABCDE, para monitorar a infecção por *E. faecalis* e verificar a indução de genes. Observou-se que a expressão da bioluminescência foi coerente com a progressão da infecção e do crescimento da bactéria na hemolinfa de *G. mellonella*. Posteriormente, La Rosa *et al.* (2013) utilizaram a bioluminescência para monitorar em *E. faecalis* a ativação dos promotores dos genes da citolisina e gelatinase em ratos e em *G. mellonella*. Ambos promotores apresentaram sinais durante a infecção, demonstrando que os genes *cyl* e *gelE* são induzidos e expressos durante a infecção sistêmica na larva, no entanto, a cepa, contendo o promotor da gelatinase foi mais virulenta nos dois modelos avaliados.

Hanin *et al.* (2010) realizaram um rastreamento dos genes ativados, durante a infecção por *E. faecalis* em ratos e em larvas de *G. mellonella*. Seis genes mostram-se induzidos no modelo de *G. mellonella* (ef_0377, ef_0041, ef_3282, ef_3196, ef_3197 e ef_0378). Construíram-se dois mutantes, um mutante com deleção no operon fortemente induzido (ef_3196/7) em *G. mellonella* e, outro, no gene induzido em ratos e larvas (ef_0377). Constatou-se que o mutante ef_3196/7 atenua a virulência da bactéria, ao contrário do ef_0377, que aumenta. Apesar dos mesmos genes estarem induzidos em ambos modelos, observou-se diversos outros genes ativados no modelo de ratos, os quais não estão induzidos no modelo *G. mellonella* (HANIN *et al.*, 2010). Também investigando o papel de genes de virulência, Abranches *et al.* (2013) mostraram a importância de quatro genes, EF0026, EF0797, EF1533 e EF3245 que codificam proteínas hipotéticas para a infecção de *E. faecalis* em *G. mellonella* e para a resistência aos antibacterianos *in vitro*. Os genes EF1533 e EF3245 demonstraram ser possíveis alvos para antimicrobianos, pois a ausência deles resultou em diminuição da virulência nas larvas e no aumento da suscetibilidade *in vitro*, especialmente frente à bacitracina e vancomicina.

Considerando *E. faecium*, Lebreton *et al.* (2011) desenvolveram uma cepa de *E. faecium* com mutação no gene *sodA* que codifica uma enzima peróxido dismutase dependente de manganês e avaliaram sua virulência. Utilizando um inóculo de *E. faecium* semelhante à Gaspar *et al.* (2009), as larvas infectadas com o mutante apresentaram menor carga bacteriana do que as infectadas com a cepa original, após 48 horas de infecção via hemocele. Esse resultado indica que o gene *sodA* é capaz de impedir a morte da bactéria nos hemócitos. Posteriormente, Lebreton *et al.* (2012) induziram a infecção em larvas de *G. mellonella* para investigar o papel do gene *asrR*, responsável por codificar um regulador do estresse oxidativo, na virulência de *E. faecium*, através da construção de uma cepa mutante. A ausência do gene *asrR* provocou um aumento na virulência do *E. faecium* no modelo de *G. mellonella*, bem como um aumento da carga bacteriana nos rins e fígado de ratos (LEBRETON *et al.*, 2012).

No estudo de Repizo e colaboradores (2014), a virulência de *E. mundtii* e de *E. faecalis* foi comparada em *G. mellonella*. Os resultados demonstraram baixa virulência de *E. mundtii* (cepa CRL1656) em comparação com *E. faecalis* (cepa JH2-2). Os autores destacaram que a espécie *E. mundtii* não codifica a maioria dos fatores de virulência presentes em isolados clínicos de enterococos (REPIZO *et al.*, 2014).

Há, na literatura, estudos avaliando a patogenicidade de cepas bacterianas infectadas com bacteriófagos. Bacteriófagos são vírus que infectam especificamente bactérias, sendo capazes de inserir fragmentos de DNA no genoma bacteriano. Através de três agentes indutores, mitomicina C, norfloxacino e radiação UV, Yasmim *et al.* (2010) realizaram a indução de bacteriófagos em *E. faecalis*. Oito diferentes bactérias lisogênicas foram inoculadas nas larvas para avaliar mudanças na virulência. Dos oito bacteriófagos avaliados, três demonstraram não serem letais às larvas de *G. mellonella*, dois aumentaram a taxa de mortalidade da larva e três não alteraram a

virulência, em relação à cepa de origem (JH2-2) (YASMIM *et al.*, 2010).

Outros estudos publicados utilizaram as larvas de *G. mellonella* para a comparação da virulência de cepas de *Enterococcus* spp. e para a avaliação da eficácia *in vivo* de compostos antimicrobianos. Mclaughlin *et al.* (2013) demonstraram que cepas de *E. faecalis* resistentes à vancomicina e à linezolida, as quais possuem uma mutação em G2576T, não apresentam diferença na virulência *in vivo*, quando comparadas às cepas resistentes somente à vancomicina. Lam *et al.* (2013), utilizando concentrações superiores de inóculo de *E. faecium* do que Gaspar *et al.* (2009), avaliaram a patogenicidade de cepas isoladas de pacientes com septicemia e observaram uma grande variedade na taxa de sobrevivência das larvas infectadas. Luther *et al.* (2014), também conseguiram induzir a infecção em larvas de *G. mellonella* e testaram diferentes regimes de antibacterianos contra a infecção de *E. faecalis* e *E. faecium* nas larvas, sendo que todos aumentaram a taxa de sobrevivência das mesmas. Contra *E. faecalis*, a daptomicina 10mg/kg apresentou um aumento significativo da taxa de sobrevivência em relação à linezolida e a associação de gentamicina aumentou a eficácia da daptomicina, mas não da linezolida. Por outro lado, contra *E. faecium*, a gentamicina potencializou a eficácia da daptomicina e da linezolida. A adição de rifampicina não foi significativa para a atividade de daptomicina e linezolida contra as duas espécies (LUTHER *et al.*, 2014). As atividades antimicrobianas dos extratos seco, fresco e glicólico de gengibre (*Zingiber officinale*) frente a *E. faecalis* também foram avaliadas, e os extratos mostraram-se eficazes em aumentar a taxa de sobrevivência das larvas em 66%, 61% e 50%, respectivamente (MAEKAWA *et al.*, 2015).

O efeito da terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFA), induzida com fenotiazida-azul de metileno foi avaliada nas larvas de *G. mellonella* infectada com *E. faecium* por Chibebe Junior *et al.* (2013). A TFA mostrou resultados positivos, tais como a redução da carga bacteriana e o

prolongamento da sobrevivência das larvas. Além disso, quando associada à vancomicina, a irradiação fotodinâmica aumentou a taxa de sobrevivência das larvas infectadas com *E. faecium* resistente à vancomicina (CHIBEBE JUNIOR *et al.*, 2013).

3.4 *Galleria mellonella* como modelo de infecção bacteriana por *Bacillus* spp.

Bacillus cereus é uma bactéria formadora de esporos, muito associada a casos de intoxicação alimentar. Sua habilidade de causar complicações gastrointestinais está intimamente ligada à produção de duas enterotoxinas, a enterotoxina termolábil responsável pela forma diarreica da doença e a enterotoxina estável, também chamada de cerulide, responsável pela forma emética da doença. É um patógeno oportunista que está associado a casos de infecções locais e sistêmicas como: endoftalmite, pneumonia, meningite e bacteremia fulminante. Os indivíduos mais comumente infectados são os neonatos, usuários de drogas intravenosas, imunocomprometidos, pacientes com feridas traumáticas ou cirúrgicas e com cateteres permanentes (BOTTONNE, 2010; FRENZEL *et al.*, 2015). *Bacillus weihenstephanensis* foi proposto como espécie em 1998, sendo composto por cepas psicrotolerantes, anteriormente classificadas como *B. cereus*. A caracterização desse bacilo é necessária para conhecermos seu potencial patogênico, visto que o mesmo pode contaminar materiais refrigerados e seus esporos podem resistir a altas temperaturas (LECHNER, S. *et al.*, 1998). Por outro lado, *Bacillus anthracis* possui características patológicas diferenciadas em relação aos bacilos gram-positivos já mencionados. Devido à sua alta toxicidade, pode ser utilizado como arma biológica e é reconhecido como o agente causador do anthrax, uma doença que pode apresentar-se na forma inalatória, gastrointestinal ou cutânea (INGLESBY *et al.*, 1999).

Ramarao, Nielsen-Leroux e Lereclus (2012) realizaram um estudo no qual descreveram detalhadamente a criação da *G. mellonella*, bem

como os procedimentos de infecção por *B. cereus*, através da via oral e da hemocele das larvas. O foco desse artigo científico é demonstrar a viabilidade e vantagens das larvas de *G. mellonella* como modelo de infecção.

Frenzel *et al.* (2015) avaliaram o efeito da inoculação de SCV de *B. cereus*, via hemocele, nas larvas de *G. mellonella* e observaram a menor virulência e taxa de crescimento da bactéria em comparação com a cepa selvagem. A indução *in vivo* de *B. cereus* ao fenótipo SCV, após administração do aminoglicosídeo amicacina também foi avaliada. Injeções de 50 e 70 µg/mL, realizadas junto à inoculação do patógeno, levaram ao aumento da taxa sobrevivência da larva. Colônias menores do que as produzidas pela cepa selvagem foram observadas em 9,6 % das larvas. O fenótipo apresentado pelas bactérias presentes em tais colônias foi igual ao observado pela indução de SCV *in vitro*.

Khattar *et al.* (2009) analisaram o papel do operon *dlt* na virulência de *B. cereus* no modelo de *G. mellonella* e de *Spodoptera littoralis*, um outro inseto. Esse operon codifica proteínas responsáveis por manter a carga positiva na parede celular bacteriana, repelindo moléculas positivas, tais como antimicrobianos catiônicos. A infecção foi realizada por via oral em larvas de *G. mellonella* e via hemocele em larvas *S. littoralis*. Não houve diferença significativa entre as taxas de mortalidade de *G. mellonella* inoculadas com a cepa original e com a cepa mutante *dlt*. Por outro lado, no modelo da *S. littoralis*, o mutante *dlt* diminuiu a taxa de mortalidade da larva, quando comparada à cepa original. O estudo concluiu que o papel do operon *dlt* na virulência bacteriana é dependente da via de inoculação.

Salamitou *et al.* (2000) demonstraram a importância de fatores de virulência de *B. cereus*, regulados por *PlcR*, um ativador da expressão de enzimas e toxinas extracelulares, através da inoculação de esporos de *B. cereus* em larvas de *G. mellonella* e em ratos. O papel do fator de transcrição *codY* e do regulon *PlcR*, na patogenicidade de *B. cereus*, também foi avaliado por

Frenzel *et al.* (2012), através do desenvolvimento de mutantes. A inativação de *codY* atenuou a virulência do *B. cereus* de forma mais pronunciada do que a inativação do *plcR*. Esse resultado indica que *codY* promove a expressão de fatores de virulência que não são regulados por *PlcR*. Brillard *et al.* (2008) analisaram a infecção de larvas de *G. mellonella* com um mutante *yvfTU* e observaram a modesta diminuição da virulência de *B. cereus*. Também foi demonstrado que a proteína *YvfTU* está envolvida na expressão de *plcR*, porém a mesma não é necessária para expressão da maioria dos fatores de virulência pertencentes ao *PlcR* regulon (BRILLARD *et al.* 2008).

A fim de identificar genes de *B. cereus* induzidos *in vivo*, Fedhila *et al.* (2010) realizaram um rastreamento e encontraram 20 genes ativos durante a infecção. Posteriormente, esses pesquisadores desenvolveram um mutante do gene mais induzido (o mutante RZC04714) e, então, a virulência foi analisada *in vivo* em *G. mellonella*, após inoculação via oral. No entanto, a infecção causada pelo mutante foi menos severa do que a causada pela cepa original (FEDHILA *et al.* 2006). Em outro estudo posterior, Fedhila *et al.* (2010) avaliaram a patogenicidade de 6 diferentes cepas de *B. cereus* nas larvas no segundo e quinto estágios, através da via oral. Devido às diferenças entre os resultados encontrados em cada estágio, os autores presumiram a ocorrência de modificações imunológicas e no trato gastrointestinal das larvas, entre o segundo e o quinto estágio. Além disso, as taxas de mortalidade obtidas com o modelo de *G. mellonella* não se correlacionaram com o potencial patogênico em humanos. O estudo avaliou também a infecção por outros patógenos, entre eles *B. anthracis*. Essa bactéria não foi capaz de causar a morte das larvas, após infecção por via oral. Agrupando os resultados, os autores concluíram que *G. mellonella* não demonstrou ser um bom modelo de infecção oral, considerando-se as cepas de *Bacillus* e as concentrações de inóculos utilizadas no estudo (FEDHILA *et al.* 2010).

Arnesen *et al.* (2011) analisaram a virulência *in vivo* de *B. cereus* e *B. weihenstephanensis* no modelo de *G. mellonella*, utilizando diferentes temperaturas (8, 15 e 37 °C) e inoculação via oral e via hemocele. O estudo mostrou que ambas espécies foram virulentas no modelo, no entanto, *B. cereus* apresentou maior virulência na temperatura de 37 °C, enquanto *B. weihenstephanensis* apresentou maior virulência a 15 °C. Em estudo semelhante, Rejasse *et al.* (2012) verificaram que *B. weihenstephanensis* é patogênico para *G. mellonella* a 15 °C, porém não é patogênico a 30 °C, provavelmente, essa bactéria não causa infecções em humanos. Corroborando com esses resultados, foi demonstrado, através da quantificação *in vitro* de genes envolvidos na virulência, que a expressão de diversos genes da cepa de *B. weihenstephanensis* utilizada (KBAB4) é dependente da temperatura (REJASSE *et al.*, 2012).

3.5 *Galleria mellonella* como modelo de infecção bacteriana por *L. monocytogenes*

Listeria monocytogenes é uma bactéria encontrada em diversos ambientes como solo, água, alimentos, nos humanos e em animais. A capacidade desse micro-organismo de tolerar processos de preservação de alimentos, como extremos de temperatura, pH e salinidade torna difícil sua eliminação. *Listeria monocytogenes* é o agente etiológico da listeriose, doença oportunista transmitida pela ingestão de alimentos que afeta principalmente grávidas, recém-nascidos e imunocomprometidos. Devido ao desenvolvimento de cepas resistentes a antimicrobianos, cresce o interesse clínico e industrial em novos fármacos antilisteriais (HAMON; BIERNE, COSSART, 2006; MUKHERJEE *et al.*, 2013).

A patogenicidade de cepas de *L. monocytogenes* no modelo de *G. mellonella* foi avaliada por Mukherjee *et al.* (2010), os quais verificaram que o modelo distingue entre espécies patogênicas e não patogênicas, assim como observaram que a virulência da bactéria está

relacionada com a concentração do inóculo. Deleções do gene *uhpT* e dos genes *prfA*, *hly*, *plcA*, *plcB*, *mpl*, e *actA*, os quais fazem parte do *cluster vgc*, demonstraram que todos, exceto *plcA*, atenuam a virulência de *L. monocytogenes*. O gene *uhpT* é um dos reguladores do gene *prfA* e ele regula a expressão de diversos fatores de virulência; *hly* codifica uma proteína chamada listeriolisina O, que impede a fagocitose da bactéria; *plcA* e *plcB* codificam fosfolipases que facilitam a lise das membranas celulares do hospedeiro; *mpl* codifica uma metaloproteínase que age em conjunto com *plcB* para facilitar a propagação célula-célula e *actA* codifica uma proteína necessária para a polimerização de actina e movimento intracitoplasmático (MUKHERJEE *et al.*, 2010).

Joyce e Gahan (2010) também avaliaram a infecção de *G. mellonella* com diferentes mutantes de *L. monocytogenes*. Mutações nos genes *actA*, *inlAB* e *sigB* não alteraram a virulência da bactéria *in vivo*, enquanto os genes *prfA* e *hly* atenuaram significativamente. O gene *sigB* regula positivamente *prfA*, e outros fatores durante adaptação ao stress e *inlAB* codifica fatores necessários para invasão celular. Todas as larvas infectadas com a cepa que não expressa o gene *hly* sobreviveram. Cepas com mutações nos genes *cheA* e *fliA* que possuem expressão ótima *in vitro* em baixas temperaturas e, nos genes *hly*, *prfA*, *sigB* e *inlAB*, que apresentam maior expressão *in vitro* em altas temperaturas, foram analisadas a 30°C e 37°C. Os autores concluíram que a temperatura adequada para avaliar infecção por *L. monocytogenes* em *G. mellonella* é 37°C (JOYCE; GAHAN, 2010). Schrama *et al.* (2013) inocularam, em larvas de *G. mellonella*, cepas de *L. monocytogenes* isoladas de laticínios e cultivadas em meio com baixo pH e alta concentração de NaCl. O efeito na taxa de mortalidade da larva foi cepa-dependente. A expressão do gene *hly* foi quantificada e não se encontrou diminuída na cepa menos virulenta, sugerindo o comprometimento de outros fatores de virulência (SCHRAMA *et al.*, 2013).

O gene *virR*, responsável por regular a expressão de *mprF* e do operon *dlt*, e os genes *mprF* e *dltB*, responsáveis por manter o balanço de carga positivo na parede celular da bactéria e facilitar a resistência a antimicrobianos catiônicos, foram avaliados por Mukherjee *et al.* (2011) em cepas mutantes de *L. monocytogenes*. A ausência de *mprF* e *virR* diminuiu acentuadamente a patogenicidade de *L. monocytogenes* em larvas de *G. mellonella*, enquanto a ausência de *dltB* diminuiu apenas parcialmente (MUKHERJEE *et al.*, 2011). Adicionalmente, Mclaughlin *et al.* (2012) verificaram, em ratos e em larvas de *G. mellonella*, que o gene *fvrA* é importante na virulência de *L. monocytogenes*. Esse gene é responsável por regular o gene *fur* que controla a entrada de ferro na célula (MCLAUGHLIN *et al.*, 2012). O papel do gene *uspA*, que codifica uma proteína importante para resistência a condições de estresse, foi avaliado, através da infecção de *G. mellonella* e de ratos com *L. monocytogenes* por Gomes *et al.* (2011). Em ambos modelos, o gene apresentou um papel relevante na virulência da bactéria (GOMES *et al.*, 2011). Ainda, Kuenne *et al.* (2013) determinaram a taxa de mortalidade em *G. mellonella* provocada por onze diferentes cepas de *L. monocytogenes* e verificaram que as cepas do sorotipo 4 foram as mais patogênicas. Considerando a avaliação da eficácia *in vivo* de compostos, Apolónio *et al.* (2014) expuseram *L. monocytogenes* ao eugenol e ao citral e observaram aumento da taxa de sobrevivência nos primeiros dias de infecção.

O potencial de larvas de *G. mellonella*, como modelo alternativo para a infecção oral por *L. monocytogenes*, foi investigado por Fedhila *et al.* (2010), os quais constataram que o modelo não é adequado para avaliar a infecção por essa via. Não foi observada mortalidade das larvas, provavelmente pela ausência de um receptor, presente nos humanos, que é essencial para a bactéria cruzar a barreira intestinal. Da mesma forma, um estudo científico visando investigar se o modelo de larvas de *G. mellonella* é adequado para avaliar a infecção cerebral por *L.*

monocytogenes foi publicado por Mukherjee *et al.* (2013). Interessante, observou-se que os mesmos fatores de virulência necessários para a propagação da infecção em humanos são necessários para a infecção em larvas de *G. mellonella*. O diclofenaco foi capaz de inibir os nódulos formados na larva infectada com *L. monocytogenes* e de prevenir a infecção no sistema nervoso da larva, ao passo que o tratamento das larvas com ácido araquidônico e rifampicina também aumentaram a taxa de sobrevivência das mesmas em relação ao controle não tratado (DMSO) (MUKHERJEE *et al.*, 2013).

4 Considerações finais: desafios do modelo e perspectivas

Galleria mellonella é um modelo incipiente, porém, promissor para diversas infecções por bactérias gram-positivas. Entretanto, para esse inseto ser amplamente aceito como modelo de infecção é necessário o sequenciamento de seu genoma, a caracterização detalhada de seu sistema imune, a padronização de cepas de larvas, bem como, o desenvolvimento de ferramentas genéticas (DESBOIS; MCMILLAN, 2015; KEMP; MASSEY, 2007). A padronização das condições de manutenção da larva também é fundamental para podermos realizar comparações de resultados entre laboratórios e reproduzir experimentos de forma precisa (COOK; MCARTHUR, 2013). De fato, Banville, Browne e Kavanagh (2012) demonstraram que manter a larva sem alimento durante os dias que precedem a inoculação de patógeno causa um aumento da suscetibilidade à infecção. Ainda, Browne *et al.* (2015) avaliaram a influência do tempo de pré-incubação na sobrevivência da larva à infecção e verificaram que a pré-incubação prolongada aumenta a suscetibilidade de *G. mellonella* aos patógenos *S. aureus* e *Candida albicans*.

Como descrito nesta revisão, a utilização de larva de *G. mellonella* para estudo de infecções permite a inoculação por diferentes vias. A

hemocele é a via mais utilizada e que apresenta resultados mais consistentes, enquanto um número reduzido de publicações científicas utiliza a via oral de administração e apresenta resultados. Em um estudo realizado por Fedhila *et al.* (2010), foi analisada a infecção pela via oral por *B. cereus* (10^6 UFC/larva), *B. anthracis* (10^6 UFC/larva), *E. faecalis* (10^8 UFC/larva) e *L. monocytogenes* (10^6 UFC/larva). Constatou-se que *G. mellonella* não é um bom modelo de infecção por essa via, pois nenhuma das bactérias testadas, exceto *B. cereus*, foi letal às larvas nas condições do estudo. Porém, no mesmo período, Joyce e Graham demonstraram que a infecção oral por *L. monocytogenes* com inoculação de 3×10^5 UFC foi capaz de matar 50% das larvas infectadas e com inóculo de 10^7 UFC causou uma mortalidade de 100% das larvas em até 48 horas. Esses resultados apontam que são necessários mais estudos para verificar a adequabilidade do modelo de *G. mellonella* para infecções por via oral.

Galleria mellonella demonstrou ser um modelo de grande utilidade para avaliar antimicrobianos e fatores de virulência, bem como apresentou resultados semelhantes aos obtidos em ratos. Considerando os estudos apresentados nessa revisão podemos concluir que o modelo de *G. mellonella* é válido para o estudo de diversas bactérias gram-positivas patogênicas ao ser humano.

Referências

- ABRANCHES, J. *et al.* The cell wall-targeting antibiotic stimulon of *Enterococcus faecalis*. **PLOS ONE**, v. 8, n. 6, p. 1-11, 2013.
- _____. The collagen-binding protein *cnm* is required for *Streptococcus mutans* adherence to and intracellular invasion of human coronary artery endothelial cells. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 6, p. 2277-2284, 2011.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Lista A de medicamentos de referência**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/e647e2804ce51403ae69be36c8b8acb7/Lista+A+25-05-2016.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 26 maio 2016.
- AKINS, R. L. *et al.* Characterization of high-level daptomycin resistance in viridans group streptococci developed upon *in vitro* exposure to daptomycin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 4, p. 2102-2112, 2015.
- APOLÓNIO, J. *et al.* No induction of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* during continuous exposure to eugenol and citral. **FEMS Microbiology Letters**, v. 354, n. 2, p. 92-101, 2014.
- ARNESEN, L. S. *et al.* Using an insect model to assess correlation between temperature and virulence in *Bacillus weihenstephanensis* and *Bacillus cereus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 317, n. 2, p. 196-202, 2011.
- ARTHUR, M.; COURVALIN, P. Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 37, n. 8, p. 1563-1571, 1993.
- AVILÉS-REYES, A. *et al.* *Cnm* is a major virulence factor of invasive *Streptococcus mutans* and part of a conserved three-gene locus. **Molecular Oral Microbiology**, v. 29, n. 1, p. 11-23, 2014a.
- _____. Modification of *Streptococcus mutans* *Cnm* by *PgfS* contributes to adhesion, endothelial cell invasion, and virulence. **Journal of Bacteriology**, v. 196, n. 15, p. 2789-2797, 2014b.
- BANVILLE, N.; BROWNE, N.; KAVANAGH, K. Effect of nutrient deprivation on the susceptibility of *Galleria mellonella* larvae to infection. **Virulence**, v. 3, n. 6, p. 497-503, 2012.
- BAZOPOULOU, D.; TAVERNARAKIS, N. The NemaGENETAG initiative: large scale transposon insertion gene-tagging in *Caenorhabditis elegans*. **Genetica**, v. 137, n. 1, p. 39-46, 2009.
- BENACHOUR, A. *et al.* The Lysozyme-Induced Peptidoglycan N-Acetylglucosamine Deacetylase *PgdA* (EF1843) is required for *Enterococcus faecalis* virulence. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 22, p. 6066-6073, 2012.
- BIONDA, N. *et al.* Effect of ester to amide or N-Methylamide substitution on bacterial membrane depolarization and antibacterial

- activity of novel cyclic lipopeptides. **ChemMedChem**, v. 8, n. 8, p. 1394-1402, 2013.
- BITOUN, J. P. *et al.* BrpA is involved in regulation of cell envelope stress responses in *Streptococcus mutans*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 8, p. 2914-2922, 2012.
- BOGAERT, D.; DE GROOT, R.; HERMANS, P. W. M. *Streptococcus pneumoniae* colonization: the key to pneumococcal disease. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 4, n. 3, p. 144-154, 2004.
- BOTTONE, J. *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 2, p. 382-398, 2010.
- BRADY, K. D.; RYBAK, J. M.; RYBAK, M. J. Oritavancin: a new lipoglycopeptide antibiotic in the treatment of gram-positive infections. **Infectious Diseases and Therapy**, v. 5, n. 1, p. 1-15, 2016.
- BRILLARD, J. *et al.* The *YvfTU* two-component system is involved in *plcR* expression in *Bacillus cereus*. **BMC Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 183-195, 2008.
- BROWNE, N. *et al.* Assessment of *in vivo* antimicrobial activity of the carbene silver (I) acetate derivative SBC3 using *Galleria mellonella* larvae. **Biometals**, v. 27, n. 4, p. 745-752, 2014.
- _____. Prolonged pre-incubation increases the susceptibility of *Galleria mellonella* larvae to bacterial and fungal infection. **Virulence**, v. 6, n. 5, p. 458-465, 2015.
- BUCKLEY, A. A.; FAUSTOFERRI, R. C.; QUIVEY, R. G. β -Phosphoglucomutase contributes to aciduricity in *Streptococcus mutans*. **Microbiology**, v. 160, n. 4, p. 818-827, 2014.
- CAMERON, D. R. *et al.* Impact of daptomycin resistance on *Staphylococcus aureus* virulence. **Virulence**, v. 6, n. 2, p. 127-131, 2015.
- CARAPETIS, J. R. *et al.* The global burden of group A streptococcal diseases. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 5, n. 11, p. 685-694, 2005.
- CENTER WATCH. **FDA Approved Drugs for Infections and Infectious Diseases**. 2016. Disponível em: <<http://www.centerwatch.com/drug-information/fda-approved-drugs/therapeutic-area/25/infections-and-infectious-diseases>>. Acesso em: 26 maio 2016.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Antibiotic resistance threats in the United States**, 2013. Atlanta, 2013. 113 p.
- CHADWICK, J. S.; VILK, E. Endotoxins from several bacterial species as immunizing agents against *Pseudomonas aeruginosa* in *Galleria mellonella*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 13, n. 3: p. 410-415, 1969.
- CHEN, D. K. *et al.* Decreased susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* to fluoroquinolones in Canada. **New England Journal of Medicine**, v. 341, n. 4, p. 233-239, 1999.
- CHENOWETH, C. E. *et al.* Antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*: implications for patients with community-acquired pneumonia. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 75, n. 11, p. 1161-1168, 2000.
- CHIBEBE JUNIOR, J. *et al.* Photodynamic and antibiotic therapy impair the pathogenesis of *Enterococcus faecium* in a whole animal insect model. **Plos One**, v. 8, n. 2, p. 1-10, 2013.
- COLLINS, M. D.; FARROW, J. A. E.; JONES, D. *Enterococcus mundtii* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 8-12, 1986.
- COOK, S. M.; MCARTHUR, J. D. Developing *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens. **Virulence**, v. 4, n. 5, p. 350-353, 2013.
- COUGHLAN, A. *et al.* Zinc and silver glass polyalkenoate cements: an evaluation of their antibacterial nature. **Bio-medical Materials and Engineering**, v. 20, n. 2, p. 99-106, 2010.
- DESBOIS; COOTE, P. J. Wax moth larva (*Galleria mellonella*): an *in vivo* model for assessing the efficacy of antistaphylococcal agents. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 8, p. 1785-1790, 2011.
- DESBOIS; MCMILLAN, S. Paving the way to acceptance of *Galleria mellonella* as a new model insect. **Virulence**, v. 6, n. 5, p. 410-411, 2015.
- EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. **The bacterial challenge: time to react**. 2009. Disponível em: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0909_TER_The_Bacterial_Challenge_Time_to_React.pdf>. Acesso em: 26 maio 2016.

- EVANS, B. A.; ROZEN, D. E. A *Streptococcus pneumoniae* infection model in larvae of the wax moth *Galleria mellonella*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 31, n. 10, p. 2653-2660, 2012.
- FARHA, M. A. *et al.* Inhibition of WTA synthesis blocks the cooperative action of PBPs and sensitizes MRSA to β -Lactams. **ACS Chemical Biology**, v. 8, n. 1, p. 226-233, 2013.
- FEDHILA, S. *et al.* Comparative analysis of the virulence of invertebrate and mammalian pathogenic bacteria in the oral insect infection model *Galleria mellonella*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 103, n. 1, p. 24-29, 2010.
- _____. Identification of *Bacillus cereus* internalin and other candidate virulence genes specifically induced during oral infection in insects. **Molecular Microbiology**, v. 62, n. 2, p. 339-355, 2006.
- FOWLER, V. G. *et al.* Daptomycin versus standard therapy for bacteremia and endocarditis caused by *Staphylococcus aureus*. **New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 7, p. 653-665, 2006.
- FRENZEL, E. *et al.* *CodY* orchestrates the expression of virulence determinants in emetic *Bacillus cereus* by impacting key regulatory circuits. **Molecular Microbiology**, v. 85, n. 1, p. 67-88, 2012.
- _____. The Endospore-Forming Pathogen *Bacillus cereus* Exploits a Small Colony Variant-Based Diversification Strategy in Response to Aminoglycoside Exposure. **mBio**, v. 6, n. 6, p. 1-10, 2015.
- FURI, L. *et al.* Evaluation of reduced susceptibility to quaternary ammonium compounds and bisbiguanides in clinical isolates and laboratory-generated mutants of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 8, p. 3488-3497, 2013.
- GAO, W. *et al.* Two novel point mutations in clinical *Staphylococcus aureus* reduce linezolid susceptibility and switch on the stringent response to promote persistent infection. **Plos Pathogens**, v. 6, n. 6, p. 1-15, 2010.
- GASPAR, F. *et al.* Virulence of *Enterococcus faecalis* dairy strains in an insect model: the role of *fsrB* and *gelE*. **Microbiology**, v. 155, n. 11, p. 3564-3571, 2009.
- GIBREEL, T. M.; UPTON, M. Synthetic epidermicin NI01 can protect *Galleria mellonella* larvae from infection with *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 10, p. 2269-2273, 2013.
- GLAVIS-BLOOM, J.; MUHAMMED, M.; MYLONAKIS, E. Of model hosts and man: using *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* and *Galleria mellonella* as model hosts for infectious disease research. **Springer**, v. 710, p. 11-17, 2012.
- GOMES, C. S. *et al.* Universal stress proteins are important for oxidative and acid stress resistance and growth of *Listeria monocytogenes* EGD-e *in vitro* and *in vivo*. **Plos One**, v. 6, n. 9, p. 1-10, 2011.
- GONZALEZ, K.; FAUSTOFERRI, R. C.; QUIVEY JUNIOR, R. G. Role of DNA base excision repair in the mutability and virulence of *Streptococcus mutans*. **Molecular Microbiology**, v. 85, n. 2, p. 361-377, 2012.
- HANIN, A. *et al.* Screening of *in vivo* activated genes in *Enterococcus faecalis* during insect and mouse infections and growth in urine. **Plos One**, v. 5, n. 7, p. 1-12, 2010.
- HAMON, M.; BIERNE, H.; COSSART, P. *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 6, p. 423-434, 2006.
- HIRAMATSU, K. *et al.* Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. **The Lancet**, v. 350, n. 9092, p. 1670-1673, 1997.
- HOLLENBECK, B. L.; RICE, L. B. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in *enterococcus*. **Virulence**, v. 3, n. 5, p. 421-569, 2012.
- HOWDEN, B. P. *et al.* Failure of vancomycin for treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, n. 10, p. 1544-1544, 2004.
- INGLESBY, T. V. *et al.* Anthrax as a biological weapon. **Jama**, v. 281, n. 18, p. 1735-1745, 1999.
- JACOBS, A. C. *et al.* Adenylate kinase release as a high-throughput-screening-compatible

- reporter of bacterial lysis for identification of antibacterial agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 26-36, 2013.
- JACOBS, M. R. *et al.* Emergence of multiply resistant pneumococci. **New England Journal of Medicine**, v. 299, n. 14, p. 735-740, 1978.
- JOYCE, S. A.; GAHAN, C. G. M. Molecular pathogenesis of *Listeria monocytogenes* in the alternative model host *Galleria mellonella*. **Microbiology**, v. 156, n. 11, p. 3456-3468, 2010.
- KAITO, C. *et al.* Silkworm larvae as an animal model of bacterial infection pathogenic to humans. **Microbial Pathogenesis**, v. 32, n. 4, p. 183-190, 2002.
- KAJFASZ, J. K. *et al.* Two spx proteins modulate stress tolerance, survival, and virulence in *Streptococcus mutans*. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 10, p. 2546-2556, 2010.
- KAVANAGH, K.; REEVES, E. P. Exploiting the potential of insects for *in vivo* pathogenicity testing of microbial pathogens. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 28, n. 1, p. 101-112, 2004.
- KEMP, M. W.; MASSEY, R. C. The use of insect models to study human pathogens. **Drug Discovery Today**, v. 4, n. 3, p. 105-110, 2007.
- KHATTAR, Z. A. *et al.* The *dlt* operon of *Bacillus cereus* is required for resistance to cationic antimicrobial peptides and for virulence in insects. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 22, p. 7063-7073, 2009.
- KLEVENS, R. Monina. Invasive Methicillin-Resistant. **Jama**, v. 298, n. 15, p. 1763-1771, 2007.
- KÖHLER, G. Probiotics research in *Galleria mellonella*. **Virulence**, v. 6, n. 1, p. 3-5, 2015.
- KUENNE, C. *et al.* Reassessment of the *Listeria monocytogenes* pan-genome reveals dynamic integration hotspots and mobile genetic elements as major components of the accessory genome. **BMC Genomics**, v. 14, n. 1, p. 47-65, 2013.
- LAM, M. M. *et al.* Comparative analysis of the complete genome of an epidemic hospital sequence type 203 clone of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. **BMC Genomics**, v. 14, n. 1, p. 595-609, 2013.
- LA ROSA, S. L. *et al.* Construction and application of a luxABCDE reporter system for real-time monitoring of *Enterococcus faecalis* gene expression and growth. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 19, p. 7003-7011, 2012.
- _____. *In vivo* assessment of growth and virulence gene expression during commensal and pathogenic lifestyles of luxABCDE-tagged *Enterococcus faecalis* strains in murine gastrointestinal and intravenous infection models. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 13, p. 3986-3997, 2013.
- LATIMER, J.; FORBES, S.; MCBAIN, A. J. Attenuated virulence and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* following sublethal exposure to triclosan. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 6, p. 3092-3100, 2012.
- LAWS, T. R. *et al.* The nematode *Panagrellus redivivus* is susceptible to killing by human pathogens at 37 °C. **FEMS Microbiology Letters**, v. 250, n. 1, p. 77-83, 2005.
- LEBRETON, F. A. *et al.* Which encodes an adhesin in *Enterococcus faecalis*, is regulated by *ers* and is involved in virulence. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 7, p. 2832-2839, 2009.
- _____. *AsrR* is an oxidative stress sensing regulator modulating *Enterococcus faecium* opportunistic traits, antimicrobial resistance, and pathogenicity. **Plos Pathogens**, v. 8, n. 8, p. 1-17, 2012.
- _____. *Galleria mellonella* as a model for studying *Enterococcus faecium* host persistence. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 3-4, p. 191-196, 2011.
- LECHNER, S. *et al.* *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 1373-1382, 1998.
- LENHARD, J. R. *et al.* Sequential Evolution of Vancomycin-Intermediate Resistance Alters Virulence in *Staphylococcus aureus*: Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Targets for Vancomycin Exposure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 3, p. 1584-1591, 2015.

- LOH, J. M. S. *et al.* *Galleria mellonella* larvae as an infection model for group a streptococcus. **Virulence**, v. 4, n. 5, p. 419-428, 2013.
- LUTHER, M. K. *et al.* Activity of daptomycin or linezolid in combination with rifampin or gentamicin against biofilm-forming *Enterococcus faecalis* or *E. faecium* in an *in vitro* pharmacodynamic model using simulated endocardial vegetations and an *in vivo* survival assay using *Galleria mellonella* larvae. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 8, p. 4612-4620, 2014.
- MAEKAWA, L. E. *et al.* Different extracts of *Zingiber officinale* decrease *Enterococcus faecalis* infection in *Galleria mellonella*. **Brazilian Dental Journal**, v. 26, n. 2, p. 105-109, 2015.
- MANGILI, A. *et al.* Daptomycin-Resistant, Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. **Clinical Infectious Diseases**, v. 40, n. 7, p. 1058-1060, 2005.
- MARTINI, C. *et al.* The polyamine N-Acetyltransferase-Like enzyme *PmvE* plays a role in the virulence of *Enterococcus faecalis*. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 1, p. 364-371, 2015.
- MCLAUGHLIN, H. P. *et al.* A putative P-Type ATPase required for virulence and resistance to haem toxicity in *Listeria monocytogenes*. **PLoS One**, v. 7, n. 2, p. 1-12, 2012.
- MCLAUGHLIN, M. *et al.* Virulence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* according to linezolid resistance and clinical outbreak status. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 8, p. 3923-3927, 2013.
- MENDES, R. E. *et al.* Zyvox(R) annual appraisal of potency and spectrum (ZAAPS) program: report of linezolid activity over 9 years (2004-12). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 6, p. 1582-1588, 2014.
- MENDES, R.E.; DESHPANDE, L.M.; JONES, R. N. Linezolid update: stable *in vitro* activity following more than a decade of clinical use and summary of associated resistance mechanisms. **Drug Resistance Updates**, v. 17, n. 1-2, p. 1-12, 2014.
- MENICHETTI, F. Current and emerging serious Gram-positive infections. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 11, p. 22-28, 2005.
- MICHAUX, C. *et al.* Cold-shock RNA-binding protein *CspR* is also exposed to the surface of *Enterococcus faecalis*. **Microbiology**, v. 159, n. 10, p. 2153-2161, 2013.
- _____. *CspR*, a Cold Shock RNA-Binding protein involved in the long-term survival and the virulence of *Enterococcus faecalis*. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 24, p. 6900-6908, 2012.
- _____. *SlyA* Is a Transcriptional regulator involved in the virulence of *Enterococcus faecalis*. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 7, p. 2638-2645, 2011.
- MITCHELL, T. J. The pathogenesis of streptococcal infections: from tooth decay to meningitis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 1, n. 3, p. 219-230, 2003.
- MUENKS, C. E. *et al.* Diversity of *Staphylococcus aureus* strains colonizing various niches of the human body. **Journal of Infection**, v. 72, n. 6, p. 698-705, 2016.
- MUKHERJEE, K. *et al.* Anti-Listeria activities of *Galleria mellonella* hemolymph proteins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 12, p. 4237-4240, 2011.
- _____. Brain infection and activation of neuronal repair mechanisms by the human pathogen *Listeria monocytogenes* in the lepidopteran model host *Galleria mellonella*. **Virulence**, v. 4, n. 4, p. 324-332, 2013.
- _____. *Galleria mellonella* as a model system for studying listeria pathogenesis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 1, p. 310-317, 2010.
- MUNITA, J. M.; BAYER, A. S.; ARIAS, C. A. Evolving resistance among gram-positive pathogens. **Clinical Infectious Diseases**, v. 61, n. 2, p. 48-57, 2015.
- MURRAY, B. E. The life and times of the *Enterococcus*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 3, n. 1, p. 46-65, 1990.
- MURRAY, P. R.; PFALLER, A. M.; ROSENTHAL, K. S. **Microbiologia Médica**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.
- NAIMI, T. S. Comparison of community- and health care-associated methicillin-resistant. **Jama**, v. 290, n. 22, p. 2976-2984, 2003.

- NAKANO, K.; NOMURA, R.; OOSHIMA, T. *Streptococcus mutans* and cardiovascular diseases. **Japanese Dental Science Review**, v. 44, n. 1, p. 29-37, 2008.
- OGIER, J; SERROR, P. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Enterococcus* genus. **International Journal of Food Microbiology**, v. 126, n. 3, p. 291-301, 2008.
- OLIVEIRA, N. E. M. *et al.* ClpB, a class III heat-shock gene regulated by CtsR, is involved in thermotolerance and virulence of *Enterococcus faecalis*. **Microbiology**, v. 157, n. 3, p. 656-665, 2011.
- OLSEN, R. J. *et al.* Virulence of serotype M3 group A *Streptococcus* strains in wax worms (*Galleria mellonella* larvae). **Virulence**, v. 2, n. 2, p. 111-119, 2011.
- O'NEILL, J. **Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations.** London, 2014.
- PELEG, A. Y. *et al.* Reduced susceptibility to vancomycin influences pathogenicity in *Staphylococcus aureus* infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 199, n. 4, p. 532-536, 2009.
- PURVES, J. *et al.* Comparison of the regulation, metabolic functions, and roles in virulence of the Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase homologues gapA and gapB in *Staphylococcus aureus*. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 12, p. 5223-5232, 2010.
- QUIBLIER, C. *et al.* Secretome analysis defines the major role of SecDF in *Staphylococcus aureus* virulence. **Plos One**, v. 8, n. 5, p. 1-12, 2013.
- RAMARAO, N.; NIELSEN-LEROUX, C.; LERECLUS, D. The insect *Galleria mellonella* as a powerful infection model to investigate bacterial pathogenesis. **Journal of Visualized Experiments**, n. 70, p. 1-17, 2012.
- REJASSE, A. *et al.* Temperature-dependent production of various PlcR-controlled virulence factors in *Bacillus weihenstephanensis* strain KBAB4. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 8, p. 2553-2561, 2012.
- REPIZO, G. D. *et al.* Genomic comparative analysis of the environmental *Enterococcus mundtii* against enterococcal representative species. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 489-501, 2014.
- RICHARDS, R. L. *et al.* Persistent *Staphylococcus aureus* isolates from two independent cases of bacteremia display increased bacterial fitness and novel immune evasion phenotypes. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 8, p. 3311-3324, 2015.
- SALAMITOU, S. *et al.* The *plcR* regulon is involved in the opportunistic properties of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* in mice and insects. **Microbiology**, v. 146, n. 11, p. 2825-2832, 2000.
- SCHRAMA, D. *et al.* Adaptation of *Listeria monocytogenes* in a simulated cheese medium: effects on virulence using the *Galleria mellonella* infection model. **Letters in Applied Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 421-427, 2013.
- SEABRA, R.; BHOGAL, N. Hospital infections, animal models and alternatives. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**, v. 28, n. 6, p. 561-568, 2008.
- SHARMA-KUINKEL, B. K. *et al.* Potential influence of *Staphylococcus aureus* clonal complex 30 genotype and transcriptome on hematogenous infections. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 2, n. 3, p. 1-13, 2015.
- SMITH, R. D.; COAST, J. Antimicrobial resistance: a global response. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 80, n. 2, p. 126-133, 2002.
- STEPHENS, J. M. Immune responses of some insects to some bacterial antigens. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 5, n. 2, p. 203-228, 1959.
- _____. Protective effects of several immunizing preparations that produce active immunity in *Galleria mellonella* (Linnaeus). **Journal of Insect Pathology**, v. 5, n. 1, p. 129, 1963.
- SUJATHA, S.; PRAHARAJ, I. Glycopeptide resistance in gram-positive Cocci: a review. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, v. 2012, p. 1-10, 2012.
- TSAI, C. J.; LOH, J. M. S.; PROFT, T. *Galleria mellonella* infection models for the study of

bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. **Virulence**, v. 7, n. 3, p. 214-229, 2016.

TSIODRAS, S. *et al.* Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. **The Lancet**, v. 358, n. 9277, p. 207-208, 2001.

UTTLEY, A. H. C. *et al.* High-level vancomycin-resistant enterococci causing hospital infections. **Epidemiology and Infection**, v. 103, n. 1, p. 173-181, 1989.

WEIGEL, L. M. Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. **Science**, v. 302, n. 5650, p. 1569-1571, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Antimicrobial resistance: global report on surveillance**. Geneva: World Health Organization, 2014. 232 p.

_____. **Overcoming antimicrobial resistance**. Geneva, 2000. 67 p.

YAN, X. *et al.* The (p)ppGpp synthetase RelA contributes to stress adaptation and virulence in *Enterococcus faecalis* V583. **Microbiology**, v. 155, n. 10, p. 3226-3237, 2009.

YASMIN, A. *et al.* Comparative genomics and transduction potential of *Enterococcus faecalis* temperate bacteriophages. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 4, p. 1122-1130, 2010.

ZAK, O; O'REILLY, T. Animal models in the evaluation of antimicrobial agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 35, n. 8, p. 1527-1531, 1991.

ZHAO, C. *et al.* Role of methionine sulfoxide reductases A and B of *Enterococcus faecalis* in oxidative stress and virulence. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 9, p. 3889-3897, 2010.

APÊNDICE

Bactéria	Condições de manutenção da larva	Características da larva	Inóculo UFC/larva e Via de inoculação	Antimicrobiano, composto ou antiovergado	Dose	Gene avaliado	Correlação com estudos em vertebrados	Referência
<i>S. aureus</i>	Adquiridas comercialmente e mantidas a 4°C e na ausência de luz. Utilizadas 7 dias após recebimento.	Último estágio e peso aproximado de 250 mg	1 x 10 ⁵ a 1 x 10 ⁷ Hemolinfa via última proleg esquerda	Daptomicina Penicilina Vancomicina	2, 10 e 50 mg/kg 0,5, 2 e 5 mg/kg 1, 10 e 50 mg/kg	- - arg	ND ND	Desbois e Cooté (2011) Peleg et al. (2009)
<i>S. aureus</i>	Adquiridas comercialmente e mantidas na ausência de luz. Utilizadas 7 dias após recebimento.	Último estágio e peso entre 250 e 350 mg	1 x 10 ⁵ e 1 x 10 ⁶ Hemolinfa via última proleg esquerda	-	-	-	Sim	Sharma-Kuinkel et al. (2015)
<i>S. aureus</i>	Adquiridas comercialmente e mantidas a 4°C, na ausência de luz. Colocadas à temperatura ambiente 24 horas antes dos experimentos.	Peso entre 250 e 300 mg	1 x 10 ⁵ e 1 x 10 ⁶ Hemolinfa	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	Adquiridas comercialmente e mantidas a 4°C e na ausência de luz. Utilizadas 2 semanas após recebimento.	Sexto estágio	3 x 10 ⁵ a 5 x 10 ⁶ Hemolinfa via última proleg esquerda	Vancomicina Epidermicina	1, 10 e 50 mg/kg 1, 10, 100 e 200 mg/kg	-	ND	Gibreel e Upton (2013)
<i>S. aureus</i>	-	-	-	Cefuroxima Ticlopidina	0,3 mg/kg	-	ND	Farha et al. (2013)
<i>S. aureus</i>	-	Último estágio e pesadas para não haver diferença no peso	0,5 x 10 ⁶ a 1 x 10 ⁶ Hemolinfa via última proleg esquerda	-	-	relA	ND	Gao et al. (2010)
<i>S. aureus</i>	Adquiridas comercialmente e mantidas a 4°C. Colocadas à temperatura ambiente 24 horas antes dos experimentos.	-	5 x 10 ⁷ Hemolinfa via injeção adjacente à quarta proleg	-	-	gapA e gapB	ND	Purves et al. (2010)
<i>S. aureus</i>	Adquiridas comercialmente e mantidas a 4°C por uma semana. Colocadas à temperatura ambiente 24 horas antes dos experimentos.	-	1 x 10 ⁶ Hemolinfa via última proleg	-	-	mprF	ND	Richards et al. (2015)
<i>S. aureus</i>	Adquiridas comercialmente e mantidas a 15°C, na ausência de luz e com aparas de madeira. Usadas uma semana após recebimento.	Último estágio e peso entre 300 e 500 mg	1 x 10 ⁵ Hemolinfa via última proleg esquerda	-	-	NorA	ND	Furi et al. (2013)
<i>S. aureus</i>	Adquiridas comercialmente e mantidas a 15°C e na ausência de luz.	Sexto estágio e peso de 300 mg	4 x 10 ⁷ Hemolinfa via última proleg esquerda	(1)-3-dibenzil-4,5-difenilimidazol-2-ildeno	0,2, 2 e 5 µg/larva	-	ND	Browne et al. (2014)
<i>S. aureus</i>	-	Peso entre 200 e 300 mg	5 x 10 ⁶ Hemolinfa via última proleg esquerda	Terfenadina	80, 160, 320 mg/kg	-	ND	Jacobs et al. (2013)
<i>S. aureus</i>	Adquiridas comercialmente e mantidas a 4°C por sete dias. Incubadas a 37°C meia hora antes do experimento.	-	2,5 x 10 ³ a 4 x 10 ³ Hemolinfa via última proleg esquerda	Triclosan	Pré-tratamento da bactéria	-	ND	Latimer e Forbes McBain (2012)
<i>S. aureus</i>	Adquiridas comercialmente e mantidas a 4°C.	Último estágio	1 x 10 ⁶ Hemolinfa via última proleg esquerda	-	-	secDF	ND	Quiblier et al. (2013)

Bactéria	Condições de manutenção da larva	Características da larva	Inóculo UFC/larva e Via de inoculação	Antimicrobiano, composto ou anticorpo testado	Dose	Gene avaliado	Correlação com estudos em vertebrados	Referência
<i>S. aureus</i>	-	Peso entre 200 e 300 mg	1 x 10 ⁹ Hemolinfa via última proleg esquerda	Lipopeptídeo cíclico e linear	40 e 80 µg/mL	-	ND	Bionda <i>et al.</i> (2013)
<i>S. aureus</i>	Durante o primeiro e segundo estágio foram criadas com pólen e cera, depois receberam uma dieta artificial composta por glicérol, mel, água, ração de cachorro e farelo de trigo. Mantidas a 30°C e na ausência de luz.	Peso entre 250 e 300 mg	1 x 10 ⁶ Hemolinfa via segunda proleg direita	Eugenol e citral	Pré-tratamento da bactéria	-	ND	Apolónio <i>et al.</i> (2014)
<i>S. aureus</i>	Adquiridas comercialmente e mantidas na ausência de luz.	Último estágio	1 x 10 ⁶ Hemolinfa via última proleg	Íons zinco	1,5, 2,5 e 3,5 ppm	-	ND	Coughlan <i>et al.</i> (2010)
<i>S. aureus</i>	-	Último estágio	1 x 10 ⁵ a 1 x 10 ⁶ Hemolinfa via última proleg esquerda	Íons prata	0,2 e 0,3 ppm	<i>nprF</i>	ND	Cameron <i>et al.</i> (2015) e Peleg <i>et al.</i> (2009)
<i>S. aureus</i>	Adquiridas comercialmente.	Último estágio e peso entre 200 e 300 mg	1 x 10 ⁵ a 1 x 10 ⁸ Hemolinfa via última proleg esquerda	Vancomicina	Pré-tratamento da bactéria	<i>agr</i>	ND	Lenhard <i>et al.</i> (2015)
<i>S. aureus</i>	Adquiridas comercialmente, mantidas a 15°C com aparas de madeira.	Sexto estágio e peso de 270 ± 50 mg	4 x 10 ⁷ Hemolinfa via última proleg	-	-	-	ND	Browne <i>et al.</i> (2015)
<i>S. mutans</i>	Adquiridas comercialmente e mantidas a 4°C e na ausência de luz. Utilizadas 7 dias após recebimento.	Último estágio, peso entre 200 e 300 mg e sem sinais de melanização	1 x 10 ⁶ Hemolinfa via última proleg esquerda	-	-	<i>cmm</i>	ND	Abranches <i>et al.</i> (2011)
<i>S. mutans</i>	-	-	5 x 10 ⁵ Hemolinfa via última proleg esquerda	-	-	<i>pgS</i> e <i>cmm</i>	ND	Avilés-Reyes <i>et al.</i> (2014b)
<i>S. mutans</i>	-	-	5 x 10 ⁵ Hemolinfa via última proleg esquerda	Anticorpo anti-Cnm	-	<i>cmm</i> , <i>cbpA</i> e <i>cnab</i>	ND	Avilés-Reyes <i>et al.</i> (2014a)
<i>S. mutans</i>	-	Peso entre 200 e 300 mg e sem sinais de melanização	1 x 10 ⁷ Hemolinfa via última proleg esquerda	-	-	<i>BrpA</i>	ND	Bitoun <i>et al.</i> (2012) e Kajfasz <i>et al.</i> (2010)
<i>S. mutans</i>	Adquiridas comercialmente e mantidas a 4°C e na ausência de luz.	Peso entre 200 e 300 mg e sem sinais de melanização	1 x 10 ⁷ Hemolinfa via última proleg esquerda	-	-	<i>pgmB</i>	ND	Buckle, Faustoferri e Quivey (2014) e Kajfasz <i>et al.</i> (2010)
<i>S. mutans</i>	-	Peso entre 200 e 300 mg e sem sinais de melanização	1 x 10 ⁷ Hemolinfa via última proleg	-	-	<i>BER-encoding genes: fpg, mutY, smx e smm</i>	ND	Gonzalez, Faustoferri e Quivey (2012)

Bactéria	Condições de manutenção da larva	Características da larva	Inóculo UFC/larva e Via de inoculação	Antimicrobiano, composto ou anticorpo testado	Dose	Gene avaliado	Correlação com estudos em vertebrados	Referência
<i>S. mutans</i>	Adquiridas comercialmente e utilizadas 7 dias após recebimento.	Último estágio, Peso entre 200 e 300 mg e sem sinais de melanização	1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 e 1×10^8 Hemolinfa via última proleg esquerda	-	-	<i>spxA</i> e <i>spxB</i>	Sim	Kajfasz <i>et al.</i> (2010)
<i>S. pneumoniae</i>	Adquiridas comercialmente e mantidas à temperatura ambiente e ausência de luz.	Último estágio. Somente saudáveis e sem sinais de melanização	1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 e 1×10^8 Hemolinfa via injeção acima da primeira proleg direita	-	-	<i>ply</i> , <i>spxB</i> e <i>dltA</i>	ND	Evans e Rozen (2012)
<i>S. pyogenes</i>	Adquiridas comercialmente e mantidas à temperatura ambiente, na ausência de luz e com alimento. Utilizadas duas semanas após recebimento.	Peso entre 100 e 150 mg	1×10^6 a 2×10^7 Hemolinfa via proleg inferior esquerda	-	-	<i>emm1</i> e <i>pilus</i>	ND	Loh <i>et al.</i> (2013)
<i>S. pyogenes</i>	Adquiridas comercialmente e mantidas entre 10 e 12°C e na ausência de luz. Utilizadas 10 dias após recebimento.	2,0 a 2,5 cm de comprimento, com cutícula cor creme com o mínimo de descoloração ou pigmentação	1×10^6 , 1×10^5 , 1×10^6 e 1×10^7 Hemolinfa via última proleg esquerda	-	-	<i>msrR</i> , <i>mga</i> , <i>prsA</i> , <i>slxA</i> e <i>spxB</i>	ND	Olsen <i>et al.</i> (2011)
<i>E. faecalis</i>	Os ovos foram incubados a 25°C e as larvas criadas com pólen e cera de abelha. Mantidas sem alimentação 24 horas antes do experimento.	Quinto estágio e peso aproximado de 200 mg	1×10^8 Oral – alimentação forçada	-	-	-	ND	Fedhila <i>et al.</i> (2010)
<i>E. faecalis</i>	Os ovos foram incubados a 25°C e as larvas criadas com pólen e cera de abelha. Mantidas sem alimentação 24 horas antes dos experimentos.	Último estágio e peso aproximado de 200 mg	Aproximadamente	-	-	<i>fsrB</i> e <i>galE</i>	ND	Gaspar <i>et al.</i> (2009)
<i>E. faecalis</i>	-	Último estágio, aproximadamente 300 mg e 3 cm de comprimento	2×10^6 Hemolinfa via base da última proleg $6 \times 10^6 \pm 0,6 \times 10^6$ Subcutânea	-	-	<i>ace</i>	Sim	Lebreton <i>et al.</i> (2009)
<i>E. faecalis</i>	-	Último estágio e peso de 330 ± 25 mg	5×10^4 Hemolinfa via última proleg esquerda	Extrato fresco de <i>Z. officinale</i> Extrato seco de <i>Z. officinale</i> Extrato glicólico de <i>Z. officinale</i>	12,5 µg/larva 25 µg/larva 12,5 µg/larva	-	ND	Maekawa <i>et al.</i> (2015)
<i>E. faecalis</i>	Adquiridas comercialmente e mantidas a 4°C, na ausência de luz. Utilizadas 5 dias após recebimento.	Peso entre 200 e 300 mg e sem sinais de melanização	$2,5 \times 10^7$ Hemolinfa via última proleg esquerda	-	-	<i>clpB</i> e <i>ctfR</i>	ND	De Oliveira <i>et al.</i> (2011)

Bactéria	Condições de manutenção da larva	Características da larva	Inóculo UFC/larva e Via de inoculação	Antimicrobiano, composto ou anticorpo testado	Dose	Gene avaliado	Correlação com estudos em vertebrados	Referência
<i>E. faecalis</i>	Adquiridas comercialmente e utilizadas 7 dias após o recebimento.	Último estágio e peso entre 250 e 350 mg	4 x 10 ⁶ Hemolinfa via última proleg esquerda	Daptomicina Linezolid Gentamicina + Daptomicina Rifampicina + Daptomicina Gentamicina + Daptomicina	6 e 10 mg/kg 600 mg/kg 1,3 mg/kg + 6 mg/kg 300 mg/kg + 6 mg/kg 1,3 mg/kg + 10 mg/kg	-	ND	Luther <i>et al.</i> (2014) e Peleg <i>et al.</i> (2009)
<i>E. faecalis</i>	-	Aproximadamente 300 mg e 3 cm de comprimento	6 x 10 ⁶ ± 0,6 x 10 ⁶ Subcutânea	-	-	<i>cspR</i>	Sim	Michaux <i>et al.</i> (2012)
<i>E. faecalis</i>	-	Aproximadamente 300 mg e 3 cm de comprimento	6 x 10 ⁶ ± 0,6 x 10 ⁶ Subcutânea	Anticorpo anti-CspR	0,0025, 0,0125 e 0,025 mL/larva	-	ND	Michaux <i>et al.</i> (2013)
<i>E. faecalis</i>	-	Aproximadamente 300 mg e 3 cm de comprimento	6 x 10 ⁶ ± 0,6 x 10 ⁶ Subcutânea	-	-	<i>pmvE</i> e <i>slyA</i>	Sim	Martini <i>et al.</i> (2015) e Lebreton <i>et al.</i> (2009)
<i>E. faecalis</i>	-	Aproximadamente 300 mg e 3 cm de comprimento	6 x 10 ⁶ ± 0,6 x 10 ⁶ Subcutânea	-	-	<i>slyA</i>	Sim	Michaux <i>et al.</i> (2011)
<i>E. faecalis</i>	Criadas a 28°C, na ausência de luz e com pólen e cera de abelha.	Peso entre 200 e 300 mg, comprimento entre 2,0 e 2,5 cm e cutícula cor creme com o mínimo de descoloração ou pigmentação	1,8 x 10 ⁶ , 1,9 x 10 ⁶ e 2,1 x 10 ⁶ Hemolinfa via última proleg esquerda	-	-	<i>PgdA</i>	ND	Benachour <i>et al.</i> (2012)
<i>E. faecalis</i>	Adquiridas comercialmente.	Peso entre 200 e 300 mg e sem sinais de melanização	5 x 10 ⁶ Hemolinfa via última proleg esquerda	-	-	<i>EF0026</i> , <i>EF0797</i> , <i>EF1533</i> , <i>EF3245</i>	ND	Abranches <i>et al.</i> (2013)

Bactéria	Condições de manutenção da larva	Características da larva	Inóculo UFC/larva e Via de inoculação	Antimicrobiano, composto ou anticorpo testado	Dose	Gene avaliado	Correlação com estudos em vertebrados	Referência
<i>E. faecalis</i>	-	Peso aproximado de 200 mg	7×10^5 , $1,5 \times 10^6$ e 3×10^6 Hemolinfa via penúltimo segmento perto da última prolegérea direita	-	-	<i>RelA</i>	ND	Yan <i>et al.</i> (2009)
<i>E. faecalis</i>	Criadas a 37°C com cera de abelha e pólen e na ausência de luz.	Peso entre 200 e 300 mg	5×10^8 Hemolinfa via penúltima prolegérea	-	-	<i>mstA</i> e <i>mstB</i>	Sim	Zhao <i>et al.</i> (2010)
<i>E. faecalis</i>	-	Peso de 300 mg e 3 cm de comprimento aproximadamente	$3,5 \times 10^6$ Subcutânea	-	-	<i>ef_0377</i> , <i>ef_0041</i> , <i>ef_3282</i> , <i>ef_3196</i> , <i>ef_3197</i> e <i>ef_0378</i>	Sim	Hanin <i>et al.</i> (2010)
<i>E. faecalis</i>	Adquiridas comercialmente.	Quinto estágio	4×10^6 Hemolinfa via última prolegérea esquerda	-	-	-	ND	La Rosa <i>et al.</i> (2012)
<i>E. faecalis</i>	Adquiridas comercialmente e mantidas a 15 °C. Utilizadas 5 dias após recebimento.	Quinto estágio	2×10^6 Hemolinfa via última prolegérea esquerda	-	-	<i>cyl</i> e <i>gelE</i>	Sim	La Rosa <i>et al.</i> (2013)
<i>E. faecalis</i>	-	Peso de 300 mg e comprimento entre 2,5 e 3 cm	8×10^6 Subcutânea	-	-	<i>Bacteriófagos</i>	ND	Yasmin <i>et al.</i> (2010)
<i>E. faecalis</i>	-	Peso de 200 mg e comprimento de 3 cm aproximadamente	$6,85 \times 10^6$ Subcutânea	-	-	-	ND	Repizo <i>et al.</i> (2014)
<i>E. faecium</i>	Os ovos foram incubados a 25°C e as larvas criadas com pólen e cera de abelha. Mantidas sem alimentação 24 horas antes dos experimentos.	Último estágio e peso aproximado de 200 mg	Aproximadamente 2×10^6 Hemolinfa via base da última prolegérea	-	-	-	ND	Gaspar <i>et al.</i> (2009)
<i>E. faecium</i>	-	-	$1,8 \times 10^6 \pm 0,5 \times 10^6$ Dorsolateralmente na hemolinfa	-	-	<i>AsrR</i>	Sim	Lebreton <i>et al.</i> (2012) e Lebreton <i>et al.</i> (2011)
<i>E. faecium</i>	-	Último estágio	$0,5$ a $1,0 \times 10^7$ Hemolinfa via primeira prolegérea direita	-	-	-	ND	Lam <i>et al.</i> (2013)
<i>E. faecium</i>	Adquiridas comercialmente e utilizadas 7 dias após recebimento.	Último estágio e peso entre 250 e 350 mg.	1×10^6 e 5×10^6 Hemolinfa via prolegérea posterior esquerda	-	-	<i>G2576T</i>	ND	McLaughlin <i>et al.</i> (2013)
<i>E. faecium</i>	-	-	$2 \times 10^6 \pm 0,7$ e $8 \times 10^8 \pm 0,4$ Dorsolateralmente na hemolinfa	-	-	<i>sodA</i>	ND	Lebreton <i>et al.</i> (2011)

Bactéria	Condições de manutenção da larva	Características da larva	Inóculo UFC/larva e Via de inoculação	Antimicrobiano, composto ou anticorpo testado	Dose	Gene avaliado	Correlação com estudos em vertebrados	Referência
<i>E. faecium</i>	Adquiridas comercialmente e utilizadas 7 dias após recebimento.	Último estágio e peso entre 250 e 300 mg	7 x 10 ⁶ a 9 x 10 ⁶ Hemolinfa via última proleg esquerda	Daptomicina	6 e 10 mg/kg	-	ND	Luther <i>et al.</i> (2014) e Peleg <i>et al.</i> (2009)
				Linezolida + Daptomicina	600 mg/kg + 6 mg/kg	-	-	
				Rifampicina + Daptomicina	300 mg/kg + 6 mg/kg	-	-	
				Gentamicina + Daptomicina	1,3 mg/kg + 10 mg/kg	-	-	
				Rifampicina + Daptomicina	300 mg/kg + 10 mg/kg	-	-	
				Gentamicina + Linezolida	1,3 mg/kg + 600 mg/kg	-	-	
				Rifampicina + Linezolida	300 mg/kg + 600 mg/kg	-	-	
				Gentamicina	1,3 mg/kg	-	-	
				Gentamicina	6 mg/kg	-	-	
				Ampicilina	150 mg/kg	-	-	
				Streptomomicina	15 mg/kg	-	-	
				Vancomicina	50 mg/kg	-	ND	Chibebe Junior <i>et al.</i> (2013)
<i>E. faecium</i>	Adquiridas comercialmente e mantidas a 15°C e na ausência de luz. Utilizadas 7 dias após recebimento.	Último estágio e peso entre 250 e 350 mg	1 x 10 ⁵ , 1 x 10 ⁶ e 1 x 10 ⁷ Hemolinfa via última proleg esquerda	Terapia fotodinâmica (foto-sensibilizante: fenotiazina - azul de metileno e filtro de 660 ± 15nm)	0 - 3,6 J/cm ²	-	-	
<i>E. mundtii</i>	-	Peso de 200 mg e comprimento aproximado de 3 cm	1,3 x 10 ⁷	Terapia fotodinâmica + Vancomicina	0,9 J/cm ² + 50 mg/kg	-	ND	Repizo <i>et al.</i> (2014)
<i>B. cereus</i>	Criadas a 25°C com pólen e cera de abelha. Mantidas sem alimentação 24 horas antes dos experimentos.	Último estágio, peso entre 180 e 250 mg e comprimento entre 2 e 3 cm	1 x 10 ⁸ a 1 x 10 ⁶ Hemolinfa 3 x 10 ⁸ a 1 x 10 ⁷ Oral - alimentação forçada	-	-	-	ND	Ramarao, Nielsen-Ieroux e Lereclus (2012)
<i>B. cereus</i>	Os ovos foram incubados a 25°C e as larvas criadas com pólen e cera de abelha.	Quinto estágio	5 x 10 ⁸ a 2 x 10 ⁴ Hemolinfa via base da última proleg 4 x 10 ⁸ a 5 x 10 ⁶ Oral - alimentação forçada	-	-	Operon <i>dit</i>	ND	Khattar <i>et al.</i> (2009)

Bactéria	Condições de manutenção da larva	Características da larva	Inóculo UFC/larva e Via de inoculação	Antimicrobiano, composto ou anticorpo testado	Dose	Gene avaliado	Correlação com estudos em vertebrados	Referência
<i>B. cereus</i>	Adquiridas comercialmente e mantidas a 24°C.	Peso de 400 ± 50 mg	1 x 10 ⁴ Hemolinfa via última proleg esquerda	Amicacina	0,375, 0,625 e 0,875 ng/mg de larva	-	ND	Frenzel <i>et al.</i> (2015)
<i>B. cereus</i>	-	Último estágio e peso de 270 ± 60 mg	1 x 10 ⁶ Hemolinfa via base da última proleg	-	-	<i>codY</i> e <i>picR</i>	ND	Frenzel <i>et al.</i> (2012)
<i>B. cereus</i>	Os ovos foram incubados a 25°C e as larvas criadas com pólen e cera de abelha.	Quinto estágio e peso aproximado de 200 mg	2 x 10 ⁵ a 2 x 10 ⁴ Hemolinfa	-	-	<i>yv/TU</i> e <i>picR</i>	ND	Brillard <i>et al.</i> (2008)
<i>B. cereus</i>	Os ovos foram incubados a 25°C e as larvas criadas com pólen e cera de abelha.	Último estágio e peso aproximado de 200 mg	5 x 10 ⁵ a 5 x 10 ⁶ Oral – alimentação forçada	-	-	<i>RZC02761</i> , <i>yso</i> , <i>ARZC05116</i> , <i>yaaK</i> , <i>yidi</i> , <i>yhfP</i> , <i>argF</i> , <i>efiA</i> , <i>cydA</i> , <i>pdtC</i> , <i>mingE</i> , <i>RZC04991</i> , <i>yacA</i> , <i>MesJ</i> , <i>RZC02976</i> , <i>clpC</i> , <i>RZC04714</i> , <i>RZC02452</i> , <i>yvrC</i> , <i>motA</i> / <i>motB</i> e <i>dnaK</i>	ND	Fedhila <i>et al.</i> (2006)
<i>B. cereus</i>	Os ovos foram incubados a 25°C e as larvas criadas com pólen e cera de abelha. Mantidas sem alimentação 24 horas antes do experimento.	Quinto estágio e peso aproximado de 200 mg	5 x 10 ⁵ a 1 x 10 ⁶ Oral – alimentação forçada	-	-	-	ND	Fedhila <i>et al.</i> (2010)
<i>B. cereus</i>	Os ovos foram incubados a 25°C e as larvas criadas com pólen e cera de abelha.	Segundo estágio	1 x 10 ⁶ esporos para cada 10 larvas Oral – alimentação livre	-	-	-	ND	Fedhila <i>et al.</i> (2010)
<i>B. cereus</i>	-	Último estágio e peso aproximado de 200 mg	3 x 10 ⁶ a 7 x 10 ⁶ Oral – alimentação forçada	-	-	-	ND	Arnesen <i>et al.</i> (2011)
<i>B. cereus</i>	-	Último estágio e peso aproximado de 200 mg	5 x 10 ⁵ a 1,4 x 10 ⁴ Hemolinfa	-	-	-	ND	Arnesen <i>et al.</i> (2011)

Bactéria	Condições de manutenção da larva	Características da larva	Inóculo UFC/larva e Via de inoculação	Antimicrobiano, composto ou anticorpo testado	Dose	Gene avaliado	Correlação com estudos em vertebrados	Referência
<i>B. cereus</i>	Ovos foram incubados a 30°C e as larvas foram criadas com cera de abelha e pólen.	Último estágio e peso entre 150 e 350 mg	1 x 10 ⁶ Oral – alimentação forçada e hemolinfa via base da última proleg	-	-	<i>plcR</i>	Sim	Salamitou <i>et al.</i> (2000)
<i>B. anthracis</i>	Os ovos foram incubados a 25°C e as larvas criadas com pólen e cera de abelha. Mantidas sem alimentação 24 horas antes do experimento.	Quinto estágio e peso de 200 mg	1 x 10 ⁶ Oral – alimentação forçada	-	-	-	ND	Fedhila <i>et al.</i> (2010)
<i>B. weihenstephanensis</i>	Os ovos foram incubados a 25°C e as larvas criadas com pólen e cera de abelha.	Último estágio e peso aproximado de 250 mg	5 x 10 ⁸ a 4 x 10 ⁶ Oral – alimentação forçada	-	-	-	ND	Rejasse <i>et al.</i> (2012)
<i>B. weihenstephanensis</i>	-	Último estágio e peso aproximado de 200 mg	3 x 10 ⁶ a 7 x 10 ⁶ Oral – alimentação forçada	-	-	-	ND	Arnesen <i>et al.</i> (2011)
<i>L. monocytogenes</i>	Durante o primeiro e segundo estágio foram criadas com pólen e cera, depois receberam dieta artificial composta por glicérol, mel, água, ração de cachorro e farelo de trigo. Mantidas a 30°C e na ausência de luz.	Peso entre 250 e 300 mg	1 x 10 ⁶ Hemolinfa via segundo da proleg direita	Eugenol e citral	Pré-tratamento da bactéria	-	ND	Apolónio <i>et al.</i> (2014)
<i>L. monocytogenes</i>	Adquiridas comercialmente e mantidas a temperatura ambiente e na ausência de luz.	Último estágio	Aproximadamente 3 x 10 ⁵ Hemolinfa via primeira proleg direita do segundo conjunto de prolegs e oral	-	-	<i>actA</i> , <i>iniAB</i> , <i>sigB</i> , <i>hly</i> , <i>prfA</i> , <i>cheA</i> e <i>flhA</i>	ND	Joyce e Gahan (2010)
<i>L. monocytogenes</i>	Criadas a 32°C, na ausência de luz e com dieta artificial (22% de farinha de milho, 22% de germe de trigo, 11% de levedura seca, 17,5% de cera de abelha, 11% mel, e 11% de glicerina).	Último estágio e peso entre 250 e 350 mg	1 x 10 ⁴ , 1 x 10 ⁵ , 1 x 10 ⁶ e 1 x 10 ⁷ Dorsolateralmente na hemolinfa	-	-	Gene cluster (<i>vgc</i>) compreendendo os genes <i>prfA</i> , <i>plcA</i> , <i>hly</i> , <i>npl</i> , <i>actA</i> e <i>plcB</i> . <i>uhpT</i>	ND	Mukherjee <i>et al.</i> (2010)
<i>L. monocytogenes</i>	Criadas a 32°C, na ausência de luz com dieta artificial (22% de farinha de milho, 22% de germe de trigo, 11% de levedura seca, 17,5% de cera de abelha, 11% mel, e 11% de glicerina).	Último estágio e peso entre 250 e 350 mg	1 x 10 ⁶ Dorsolateralmente na hemolinfa	-	-	<i>dlbB</i> , <i>mprF</i> e <i>virR</i>	ND	Mukherjee <i>et al.</i> (2011)
<i>L. monocytogenes</i>	Adquiridas comercialmente e mantidas à temperatura ambiente e na ausência de luz.	-	1 x 10 ⁶ Hemolinfa via primeira proleg direita do segundo conjunto de prolegs	-	-	<i>frvA</i> e <i>fur</i>	Sim	McLaughlin <i>et al.</i> (2012)

Bactéria	Condições de manutenção da larva	Características da larva	Inóculo UFC/larva e Via de inoculação	Antimicrobiano, composto ou anticorpo testado	Dose	Gene avaliado	Correlação com estudos em vertebrados	Referência
<i>L. monocytogenes</i>	Criadas a 32°C, na ausência de luz e com dieta artificial (22% de farinha de milho, 22% de germe de trigo, 11% de levedura seca, 17,5% de cera de abelha, 11% mel, e 11% de glicerina).	Ultimo estágio e peso entre 250 e 350 mg	1 x 10 ⁶ Dorsolateralmente na hemolinfa	Rifampicina Ácido Araquidônico	1,25 µM 1 µM 2,5 µM	<i>actA</i> e <i>hly</i>	ND	Mukherjee <i>et al.</i> (2013)
<i>L. monocytogenes</i>	Criadas a 32°C, na ausência de luz e com dieta artificial (22% de farinha de milho, 22% de germe de trigo, 11% de levedura seca, 17,5% de cera de abelha, 11% mel, e 11% de glicerina).	Ultimo estágio e peso entre 250 e 350 mg	1 x 10 ⁶ Dorsolateralmente na hemolinfa	-	-	<i>uspA</i>	Sim	Gomes <i>et al.</i> (2011)
<i>L. monocytogenes</i>	-	Ultimo estágio	1 x 10 ⁶ Dorsolateralmente na hemolinfa	-	-	-	ND	Kiennen <i>et al.</i> (2013)
<i>L. monocytogenes</i>	Os ovos foram incubados a 25°C e as larvas criadas com pólen e cera de abelha. Mantidas sem alimentação 24 horas antes dos experimentos.	Quinto estágio e peso aproximado de 200 mg	1 x 10 ⁶ Oral – alimentação forçada	-	-	-	ND	Fedhila <i>et al.</i> (2010)
<i>L. monocytogenes</i>	Durante o primeiro e segundo estágio foram mantidas com pólen e cera, depois receberam dieta artificial composta por glicérol, mel, água, ração de cachorro e farelo de trigo. Mantidas a 30°C e na ausência de luz.	Último estágio e peso entre 250 e 300 mg	1 x 10 ⁶ Hemolinfa via segunda proleg direita	-	-	<i>hly</i>	ND	Schrama <i>et al.</i> (2013)

ND: não determinado

