PADRONIZAÇÃO DE PROTOCOLO HISTOLÓGICO PARA MODELO DE INFECÇÃO FÚNGICA EM LARVA DE *Tenebrio molitor*

Mariana Brandalise Tavares (PIBIC/UEM), Natalia Pecin Bagon (Coorientadora), Melyssa Fernanda Norman Negri (Orientadora). E-mail: ra129122@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Maringá, PR.

Microbiologia, Microbiologia Aplicada.

Palavras-chave: modelo alternativo; micologia; histologia.

RESUMO

As infecções fúngicas constituem uma ameaça global emergente. Cerca de 700 espécies de fungos, das catalogadas até o presente, estão associadas aos humanos. Por meio da análise histopatológica e do uso de corantes, como Hematoxilina-Eosina (HE), é possível visualizar o tecido e suas alterações causadas pelos fungos. O modelo experimental com insetos apresenta diversas vantagens em relação ao modelo animal, e o uso crescente da larva do besouro *Tenebrio molitor* vem ganhando destaque. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi estabelecer um protocolo histológico para estudos de infecções fúngicas utilizando o modelo de larvas de *T. molitor*.

INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas têm se tornado uma ameaça global emergente (KAINZ *et al.*, 2020). Anualmente, relata-se 1,7 milhões de mortes relacionadas a infecções fúngicas, com 150 milhões de casos graves no mundo todo (KAINZ *et al.*, 2020). Os modelos experimentais de mamíferos (ratos, camundongos, coelhos) são tradicionalmente utilizados em pesquisas de patógenos, porém, atualmente, sistemas não-vertebrados têm sido introduzidos neste tipo de pesquisa devido às questões éticas relacionadas ao uso de animais experimentais e também por conta das vantagens econômicas no uso de invertebrados (LIONAKIS, 2011). A vantagem do inseto como modelo deve-se ao seu baixo custo e à alta eficiência em testes em larga escala, além de não haver restrições éticas ao seu uso em pesquisas (LIONAKIS, 2011). O uso do besouro *Tenebrio molitor* (*Coleoptera*) em pesquisas vem crescendo, pois sua forma larval pode ser mantida em temperaturas entre 15 °C e 37 °C, o que é ótimo para estudos de patógenos à temperatura ambiente, já que a temperatura afeta a forma de infecção (LI *et al.*, 2013). Além disso, seu cultivo em laboratório é de fácil criação e manutenção e as larvas são facilmente comercializadas no Brasil (DE SOUZA *et al.*, 2015). A forma de inoculação na larva de *T. molitor* é feita por meio de injeção, o que permite uma maior acurácia na internalização do fungo (DE SOUZA *et al.*, 2015). Os procedimentos que compõem

o processamento histológico devem ser realizados em sequência e seguindo um protocolo, que pode ser adaptado a cada amostra, pois todas possuem especificidades (NUNES; CINSA, 2016). Desta forma, a padronização de larvas de *T. molitor* utilizadas como modelo de infecção fúngica torna-se de suma importância ser desenvolvida, uma vez que há lacunas na literatura quanto a um protocolo específico que disponibilize o processamento correto para uma avaliação histopatológica de qualidade, preservando o material e o fungo a serem analisados (NUNES; CINSA, 2016), tornando o presente estudo relevante para o cenário atual.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas larvas de *T. molitor* disponibilizadas pelo laboratório de Micologia Médica da Universidade Estadual de Maringá e estocadas a uma temperatura aproximada de 25 °C. A levedura *Exophiala dermatitidis* foi utilizada para a infecção das larvas, sendo preparado o inóculo a uma concentração de $1x10^5$ UFC/mL, em Tween 0,1%. A injeção de 10 µl foi realizada entre o segundo e o terceiro esternito visíveis acima das pernas, na porção ventral, com uma seringa de insulina. As larvas controle foram injetadas com Tween 0,1% e os grupos foram incubados em BOD a 25 °C por 48 h. Após o período de incubação, as larvas foram colocadas em placa de Petri com parafina e fixadas com auxílio de alfinetes posicionados em cada extremidade, sendo realizados furos em cada anel lateral, para permitir a entrada da solução fixadora de formaldeído a 10%. Foram então dispostas em frascos individuais contendo o fixador por 24 h e, posteriormente, foram cortadas no eixo longitudinal, com o auxílio de um bisturi, e permaneceram por mais 24 h na solução. Por fim, foram dispostas em frascos com álcool 70% até o início do processamento. A desidratação das amostras foi feita em série crescente de álcool e clarificação em xilol, para serem inseridas em parafina. Os blocos de parafina foram mantidos em frascos contendo água mineral e detergente por 3 dias. Cortes semi-seriados de 5 µm de espessura foram obtidos em micrótomo rotativo, e colocados em lâminas de vidro com albumina (glicerina e clara de ovo), com auxílio do banho-maria a 40 °C contendo gelatina incolor. A coloração de Hematoxilina-Eosina (HE) foi realizada para avaliação histológica, conforme protocolo já estabelecido no laboratório de Patologia da UEM, e a captura de imagens foi realizada em microscópio óptico acoplado a um sistema de captura de imagens (Motic BA400), nas objetivas de 4x, 20x e 60x.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação dos diferentes protocolos testados permitiu estabelecer um protocolo padrão para o processamento histológico das larvas. O corte da larva no eixo longitudinal e os furos em cada anel lateral proporcionaram melhores resultados de fixação e de microtomia, em comparação com a larva inteira e sem cortes. No processamento, os tempos de 1 h 30 em cada álcool (80%, 90%, 100% I, 100% II e 100% III), 1 h em xilol (xilol-álcool, xilol I e xilol II), 2 h nos banhos I e II de parafina e 12 h no banho III foram ideais para a obtenção de cortes íntegros. O tempo de

hidratação de 3 dias dos blocos de parafina, antes da microtomia, mostrou-se ideal para obtenção de cortes íntegros. Os cortes semi-seriados de 5 µm foram ideais para observação em lâmina. As lâminas de vidro com albumina evitaram que os cortes se descolassem durante a coloração, preservando a integridade do tecido para observação e captura de imagens. Em relação aos grupos testados, no grupo controle com Tween 0,1%, houve preservação do tecido, com boa visualização das estruturas das larvas e dos órgãos internos, como cutícula, musculatura intersegmentar, corpo gorduroso visceral, intestino médio (Figura 1A), lúmen (Figura 1B), trofócitos com citoplasma granuloso e núcleo (Figura 1C) e túbulos de Malpighi (Figura 1D), bem preservados. Nas larvas infectadas, no tempo de incubação de 48 h, as estruturas se mantiveram íntegras, porém não foi possível visualizar a presença do fungo na coloração utilizada (HE).

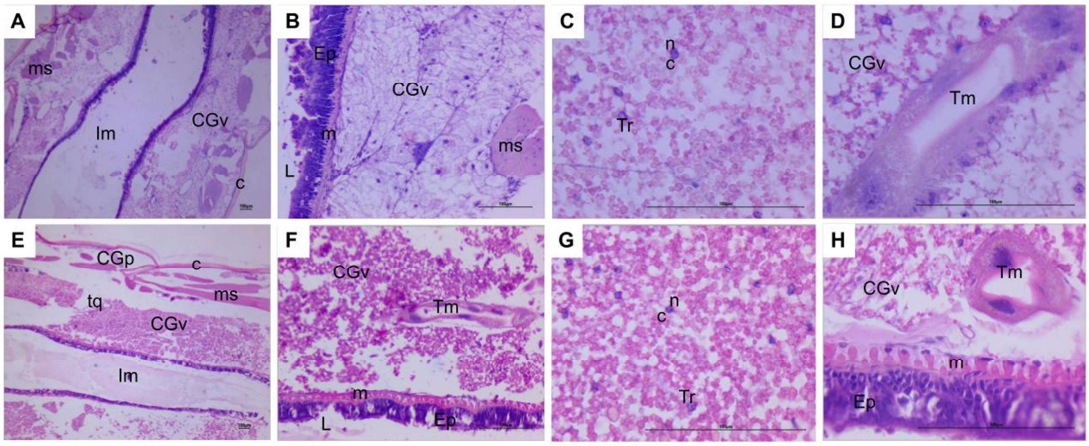


Figura 1 – Fotomicrografias das larvas do grupo controle com Tween a 0,1% (A-D) e do grupo infectado (E-H). (1A): c - cutícula, ms - musculatura intersegmentar, Im - intestino médio, CGv - corpo gorduroso visceral. (1B): L - lúmen do intestino médio, Ep - epitélio do intestino médio, m - camada muscular do intestino, ms - musculatura intersegmentar, CGv - corpo gorduroso visceral. (1C): Tr - trofócito, n - núcleo do trofócito, c - citoplasma granuloso. (1D): Tm - túbulo de Malpighi, CGv - corpo gorduroso visceral. (E): CGp - corpo gorduroso parietal, CGv - corpo gorduroso visceral, tq - traqueíola, Im - intestino médio, ms - musculatura intersegmentar, c - cutícula. (F): CGv - corpo gorduroso visceral, Tm - túbulo de Malpighi, L - lúmen do intestino médio, Ep - epitélio do intestino médio, m - camada muscular do intestino. (G): Tr - trofócito, n - núcleo do trofócito, c - citoplasma granuloso. (H): Tm - túbulo de Malpighi, CGv - corpo gorduroso visceral, Ep - epitélio do intestino médio, m - camada muscular do intestino. Cortes semi-seriados com 5 µm de espessura, corados em Hematoxilina-Eosina. Barra de calibração (100 µm).

CONCLUSÕES

Por meio deste projeto de pesquisa, foi possível estabelecer um protocolo histológico com coloração Hematoxilina-Eosina, que permitiu a boa preservação tecidual e a visualização de alterações teciduais em estudos de infecção fúngica em modelo de larva de *T. molitor*.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Estadual de Maringá pelo financiamento do projeto, ao grupo de pesquisa OneMyco, ao laboratório de Patologia por disponibilizar a estrutura e os reagentes utilizados no trabalho.

REFERÊNCIAS

DE SOUZA, P. C. *et al*. *Tenebrio molitor* (*Coleoptera: Tenebrionidae*) as an alternative host to study fungal infections. **Journal of Microbiological Methods**, v. 118, p. 182-186, nov. 2015.

KAINZ, K. *et al*. Fungal infections in humans: the silent crisis. **Microbial Cell**, v. 7, n. 6, p. 143-145, jun. 2020.

LI, D. D. *et al*. Using *Galleria mellonella-Candida albicans* Infection Model to Evaluate Antifungal Agents. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 36, n. 9, p. 1482-1487, 2013.

LIONAKIS, M. S. *Drosophila* and *Galleria* insect model hosts. **Virulence**, v. 2, n. 6, p. 521-527, nov. 2011.

NUNES, C.; CINSA, L. A. PRINCÍPIOS DO PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO DE ROTINA. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**, v. 8, n. 1, p. 31-40, 2016.