

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

PRÍSCILA DE CÁSSIA SANCHEZ CRETE

**COMPARAÇÃO DE DOIS MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DA VIRULÊNCIA
BACTERIANA UTILIZANDO *Caenorhabditis elegans* COMO MODELO**



CURITIBA

2017

PRÍSCILA DE CÁSSIA SANCHEZ CRETE

**COMPARAÇÃO DE DOIS MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DA VIRULÊNCIA
BACTERIANA UTILIZANDO *Caenorhabditis elegans* COMO MODELO**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção de grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Área de concentração Análises Clínicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cyntia M. T. Fadel-Picheth

CURITIBA

2017

Crete, Priscila de Cássia Sanchez

Comparação de dois métodos para avaliação da virulência bacteriana utilizando *Caenorhabditis elegans* como modelo / Priscila de Cássia Sanchez Crete – Curitiba, 2017.

65 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm

Orientadora: Professora Dra. Cyntia Maria Telles Fadel-Picheth
Dissertação (mestrado) – Programa de Pós Graduação em Ciências
Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Inclui bibliografia

1. *Caenorhabditis elegans*. 2. Virulência. 3. Pesquisa. 4. Métodos. I. Fadel-Picheth, Cyntia Maria Telles. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDD 616.014



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
<http://www.farmacêuticas.ufpr.br>



TERMO DE APROVAÇÃO

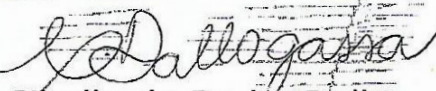
PRÍSCILA DE CÁSSIA SANCHEZ CRETE

Título: **"COMPARAÇÃO DE DOIS MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DA VIRULÊNCIA BACTERIANA UTILIZANDO *Caenorhabditis elegans* COMO MODELO"**

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Análises Clínicas.


Profª. Dra. Cyntia Maria Telles Fadel Picheth
Orientadora


Profª. Dra. Tania Maria Bordin Bonfim
Universidade Federal do Paraná


Profª. Dra. Cibelle de Borba Dallagassa
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Curitiba, 20 de fevereiro de 2017.

AGRADECIMENTO

Primeiramente quero agradecer a Deus pelo seu infinito amor por mim e por todas as bênçãos que Ele sempre me proporciona. Obrigada pela oportunidade de realizar o meu sonho e por estar sempre comigo.

À minha família, o meu refúgio, aos meus pais que sempre me encorajaram a lutar pelos meus objetivos e por nunca medirem esforços para que os meus sonhos se realizassem. Minhas irmãs, Pamela e Renata, por serem além de irmãs, minhas amigas. Por terem paciência comigo neste período. A minha irmã Renata, pelo seu companheirismo, e por sempre me auxiliar neste trabalho.

Agradeço a minha orientadora Prof.^aDr.^a Cyntia Maria Telles Fadel-Picheth pela oportunidade e confiança que me foi depositada, pela paciência que teve comigo neste período e pelo conhecimento e sabedoria que me foi passado neste tempo. Obrigada por ser mais que uma orientadora. Ao pessoal do laboratório Flávia, Isabel, Bárbara, Monica, Cláudio e Gisele por todo carinho, apoio e descontração. Agradeço a Cibelle por ser sempre amigável, confiável e por me ensinar muitas coisas desde que comecei no laboratório. Também quero agradecer a Karol, por ser mais que uma companheira de laboratório, pela sua amizade, disposição e paciência.

As professoras Dr.^a. Tania Maria Bordin Bonfim e Dr.^a. Debora Brand por disponibilizar a lupa, que foi uma ferramenta importante neste trabalho.

Ao prof.Dr. Geraldo Picheth, pela ajuda estatística deste trabalho.

Ao prof. Dr. Itamar Francisco Andreazza, por sempre disponibilizar a lupa com câmera, no qual foi possível fotografar os *C. elegans*.

RESUMO

Virulência é a medida da patogenicidade de um micro-organismo, e vários modelos têm sido utilizados para determinar a virulência bacteriana. O nematódeo *Caenorhabditis elegans* vem sendo aplicado para este fim através da realização de ensaios que determinam a redução ou não da sua viabilidade frente a diferentes bactérias, e diferentes metodologias podem ser empregadas. O objetivo deste trabalho foi comparar 2 métodos empregados na utilização de *C. elegans* como modelo para determinar a virulência de bactérias. Foi utilizada a estirpe de *C. elegans* N2, e como controle *Escherichia coli* OP50 utilizada em laboratório como alimento para o nematódeo. Os inóculos bacterianos foram preparados em caldo TSB. Os ensaios foram realizados em meio NGM com a transferência diária dos nematódeos para placas com meio e inóculo recém-preparados, ou em NGM contendo 30µM de FUDR, composto que inibe a síntese de DNA e proteínas, e um concentrado bacteriano sem transferência dos nematódeos durante o experimento. As placas foram mantidas a 23°C por um período de 10 dias, e diariamente foram contabilizados os números de *C. elegans* viáveis ou mortos. Foram testadas bactérias dos gêneros *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Herbaspirillum*, *E. coli*, *Shigella*, *Salmonella* e *Proteus* em ambos os ensaios. *Enterococcus* e *Staphylococcus* foram testados apenas em presença de FUDR. Em NGM a queda na viabilidade variou de 20 a 100%; e as bactérias mais virulentas, capazes de matar 50% ou mais da população de *C. elegans*, foram *A. caviae* 50, 8LM, 207M; *A. hydrophila* 4; *A. veronii* sobria 70 e 312M e *Salmonella* sorotipo Braenderup ATCC BAA664. Em média foram necessários 2 ou mais dias para a morte de *C. elegans*, sugerindo um processo infeccioso. Em FUDR o tempo para causar morte de *C. elegans* foi, em média, superior a 4 dias de contato com as bactérias. A redução da viabilidade variou de 6,7% a 79%. As bactérias que apresentaram maior virulência foram *Enterococcus faecalis*, *Salmonella* Typhimurium 59C e *Salmonella* Braenderup. Os resultados foram similares aos obtidos em NGM para 12 das 20 bactérias, mas para *A. caviae*, *A. hydrophila* 4; *A. trota* 2 e *A. veronii* sobria 70 e 312M ocorreu intensa queda na taxa de *C. elegans* mortos. Estes resultados indicam que as metodologias testadas podem fornecer resultados distintos dependendo das bactérias analisadas.

ABSTRACT

Virulence is the measure of the pathogenicity of a microorganism; several models have been used to determine bacterial virulence. The nematode *Caenorhabditis elegans* has been used for this purpose by conducting tests that determine the reduction or not of its viability against different bacteria; different methodologies can be used. The objective of this work was to compare 2 methods used to determine bacterial virulence using *C.elegans* as model. In this study *C. elegans* N2 strain was used, and *Escherichia coli* OP50 used in the laboratory as food for the nematode was the control. Bacterial inocula were prepared in TSB broth. The assays were carried out in NGM medium with the daily transfer of the nematodes to plates with fresh medium and inocula, or in NGM containing 30 μ M of FUDR, a compound that inhibits DNA and proteins synthesis, and a bacterial concentrate, without transfer of the nematodes during the experiment. Plates were maintained at 23 ° C for a period of 10 days, and daily number of *C. elegans* viable or dead were determined. Bacteria of the genera *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Herbaspirillum*, *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella* and *Proteus* were tested in both assays. *Enterococcus* and *Staphylococcus* were tested only in the presence of FUDR. In NGM the fall in viability ranged from 20 to 100%; the most virulent bacteria, those capable of killing 50% or more of the *C. elegans* population, were *A. caviae* 50, 8LM, 207M; *A.hydrophila* 4; *A. veronii* sobria 70 and 312M and *Salmonella* serotype Braenderup ATCC BAA664. On average, it took 2 or more days for the death of *C. elegans*, suggesting an infectious process. In FUDR the time to cause death of *C. elegans* was, on average, greater than 4 days of contact with the bacteria. The reduction in viability ranged from 6.7% to 79%. The most virulent bacteria were *Enterococcus faecalis*, *Salmonella* Typhimurium 59C and *Salmonella* Braenderup. The results were similar to those obtained in NGM for 12 of the 20 bacteria, but for *A. caviae*, *A. hydrophila* 4; *A. trota* 2 and *A. veronii* sobria 70 and 312M occurred an intense fall in the rate of dead *C. elegans*. These results indicate that the methodologies tested may provide different results depending on the bacteria analyzed.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CGC	<i>Caenorhabditis Genetics Center</i>
FUDR	5'-fuoro-2'-deoxiuridina
NGM	do inglês, <i>Nematode growth medium</i>
T3SS	Sistema de Secreção Tipo 3
T6SS	Sistema de Secreção Tipo 6

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - CICLO DE VIDA DO NEMATÓIDE <i>Caenorhabditis elegans</i>	5
FIGURA 2 - VIABILIDADE DE <i>C. elegans</i> FRENTE A ESPÉCIES DE <i>Aeromonas</i> ..	24
FIGURA 3 - ENSAIOS DE VIABILIDADE DE <i>C. elegans</i> ALIMENTADOS COM BACILOS NÃO-FERMENTADORES DOS GÊNEROS <i>Herbaspirillum</i> E <i>Pseudomonas</i>	26
FIGURA 4 - VIABILIDADE DE <i>C. elegans</i> ALIMENTADOS COM ENTEROBACTÉRIAS	28
FIGURA 5 - VIABILIDADE DE <i>C. elegans</i> ALIMENTADO COM <i>Aeromonas</i> EM PRESENÇA DE FUDR.....	30
FIGURA 6 - VIABILIDADE DE <i>C. elegans</i> EM PRESENÇA DO GÊNERO <i>Herbaspirillum</i> . E <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	32
FIGURA 7 - VIABILIDADE DE <i>C. elegans</i> ALIMENTADO COM ENTEROBACTÉRIAS EM PRESENÇA DE FUDR	33
FIGURA 8 - TESTES DE VIABILIDADE DE <i>C. elegans</i> UTILIZANDO <i>S. aureus</i> OU <i>E. faecalis</i> COMO ALIMENTO.	34

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE DURAÇÃO DOS ENSAIOS.....	22
GRÁFICO 2 - VIABILIDADE DE <i>C. elegans</i> FRENTE A <i>E. coli</i> OP50 EM PRESENÇA DE FUDR.	29

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - BACTÉRIAS UTILIZADAS NESTE TRABALHO	15
TABELA 2 - COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS NOS 2 MÉTODOS...	35

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 <i>Caenorhabditis elegans</i>	3
2.1.1 Histórico.....	3
2.1.2 Características gerais	4
2.1.3 Uso de <i>Caenorhabditis elegans</i> em estudos científicos	6
2.2 VIRULÊNCIA BACTERIANA.....	8
2.2.1 <i>Caenorhabditis elegans</i> e virulência bacteriana	9
2.3 MÉTODOS PARA A REALIZAÇÃO DE ENSAIOS DE VIABILIDADE DE <i>C. elegans</i>	11
3 OBJETIVOS	13
3.1 OBJETIVO GERAL	13
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
4 MATERIAIS E MÉTODOS	14
4.1 AMOSTRA	14
4.2 REAGENTES E MEIOS DE CULTIVO.....	15
4.2.1 Meio NGM	15
4.2.2 Tampão Fosfato 1M pH 6,0 (para 1 litro):.....	16
4.2.3 Solução CaCl ₂ 1M	16
4.2.4 Solução MgSO ₄ 1M:.....	16
4.2.5 Solução de colesterol 5mg/mL:	16
4.2.6 Meio S (Meio Líquido para <i>C. elegans</i>)	17
4.2.7 Solução Basal S:	17
4.2.8 Solução de citrato de potássio 1M pH 6,0:	17
4.2.9 Solução de metais traços:	18
4.3 SINCRONIZAÇÃO	18
4.4 CONDIÇÕES DE CULTIVO BACTERIANO.....	19
4.5 ENSAIOS DE VIRULÊNCIA.....	20
4.5.1 Ensaio em placas de Petri contendo meio NGM	20
4.5.2 Ensaio em Meio S	20
4.5.3 Ensaio em Meio NGM contendo FUDR	21
4.5.4 Análise Estatística	21
5 RESULTADOS	22
5.1 ENSAIOS EM MEIO S	22
5.2 ENSAIOS EM MEIO NGM	22
5.3 ENSAIO DE VIRULÊNCIA EM MEIO NGM CONTENDO FUDR.....	29
5.4 COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS NOS DOIS MÉTODOS....	34
6 DISCUSSÃO	37
6.1 ENSAIOS REALIZADOS EM MEIO NGM.....	37
6.2 ENSAIOS REALIZADOS EM MEIO NGM CONTENDO 30µM DE FUDR	42
6.3 COMPARAÇÃO DOS ENSAIOS REALIZADOS EM MEIO NGM E NGM CONTENDO FUDR.....	44
7 CONCLUSÃO.....	46
REFERÊNCIAS.....	47

1 INTRODUÇÃO

Caenorhabditis elegans é um pequeno nematódeo do solo que se alimenta de micro-organismos, primariamente bactérias. Pode ser mantido em Laboratório em meio “Nematode Growth Medium” (NGM) em presença da bactéria *Eschericia coli* OP50, e assim pode viver por aproximadamente duas semanas e meia a 25°C (STIERNAGLE, 2006).

Desde meados da década de 1960, quando foi selecionado por Brenner como modelo animal, passível de ser manipulado geneticamente, para o estudo do sistema nervoso central, *C. elegans* vem sendo utilizado para o estudo de diversas patologias humanas incluindo diabetes e cancer (BRENNER, 1974; KALETTA e HENGARTNER, 2006).

Em 1998, *C. elegans* foi o primeiro organismo multicelular a ter o seu genoma completo, e verificou-se que cerca de 40-60% dos seus genes tem homólogos em humanos. (WATERSTON, 1998; KALETTA e HENGARTNER, 2006). E apesar da distância evolutiva que existe entre os seres humanos e os nematódeos, *C. elegans* é um modelo importante e válido para estudar diversos processos de doenças humanas (DARBY et al, 1999).

A ampla aplicação de *C.elegans* em estudos científicos deve-se a suas muitas vantagens como, por exemplo, o tamanho reduzido que permite que o pesquisador o tenha em grandes quantidades sem ocupar muito espaço; é facilmente alimentado o que se reflete na facilidade e baixo custo para sua manutenção em laboratório; consegue se reproduzir rapidamente e em grande quantidade, além do seu sistema genético bem estudado e com diversos mutantes caracterizados (WATERSTON, 1998; LEUNG et al., 2008).

A patogenicidade é a habilidade de um organismo causar doença em um hospedeiro, enquanto que o termo virulência geralmente se refere ao grau de patogenicidade de um grupo de micro-organismos (WINN Jr. et al., 2006). Diversos fatores estão associados com a virulência bacteriana, entre eles componentes estruturais como o lipopolissacarídeo presente nas bactérias gram-negativas, produtos produzidos pelas bactérias que apresentam atividade tóxica para o hospedeiro, fatores capazes de sobrepular as defesas do hospedeiro, entre diversos outros. A virulência geralmente é multifatorial, e a distribuição dos fatores de

virulência é heterogênea entre as bactérias (PETERSON, 1996; WINN Jr. *et al.*, 2006).

C. elegans também vem sendo utilizado em estudos de virulência bacteriana, e os resultados indicam que é um modelo atrativo para o estudo de mecanismos de patogenicidade microbiana. Vários estudos mostram que um número crescente de patógenos humanos e animais são capazes de causar danos e matar *C. elegans*, e que este processo está relacionado a fatores de virulência bacteriana também associados com a patogenicidade em hospedeiros mamíferos. Além disso, *C. elegans* seria melhor modelo para o estudo da virulência quando comparado com outros hospedeiros como invertebrados e plantas (SIFRI *et al.*, 2005; KIM, 2008; KOMURA *et al.*, 2010). Finalmente, estudos com *C. elegans* não requerem instalações especiais requeridas para experimentos com animais ou cultivo celular, além do baixo custo para a sua realização.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Caenorhabditis elegans é um nematódeo hermafrodita, de vida livre, que apresenta aproximadamente 1mm de comprimento; é encontrado no solo e se alimenta basicamente de bactérias. Esse organismo se tornou conhecido pelo uso como modelo experimental na genética e neurobiologia a partir dos anos 1960 (EWBANK, 2002; ANKENY, 2001).

2.1 *Caenorhabditis elegans*

2.1.1 Histórico

C. elegans foi identificado por Maupas em 1900. Mas os estudos experimentais com o nematódeo foram iniciados por Ellsworth C. Dougherty, que estudou a nutrição e crescimento do organismo. Em 1948, juntamente com Calhoun, ele propôs *C. elegans* como alvo para pesquisa genética. Com seus colaboradores Hansen, Nigon e Nicholas, Dougherty promoveu o uso de *C. elegans* como organismo modelo (BRENNER, 1974; EWBANK, 2002; ANKENY, 2001).

Em 1963 Dougherty forneceu uma amostra de *C. elegans*, estirpe Bristol, para Brenner que estava em busca de um modelo para o estudo do sistema nervoso. Os estudos preliminares com o nematódeo indicaram que o organismo poderia ser utilizado para determinar a estrutura e desenvolvimento preciso de ao menos partes do sistema nervoso, e possivelmente a investigação da determinação genética (ANKENY, 2001).

Os experimentos também mostraram que *C. elegans* é um organismo adequado para análises genéticas. Além das suas vantagens incluindo o tamanho pequeno, ciclo de vida rápido, o ciclo reprodutivo simples com sistema sexual de autofertilização que facilita o isolamento de mutantes recessivos, e genoma simples e geneticamente tratável. O fato da sua reprodução não depender de acasalamento permite fazer estoques de mutantes homozigotos com fenótipos gravemente defeituosos (BRENNER, 1974). A partir dos estudos de Brenner, *C. elegans* tornou-se conhecido e considerado como organismo modelo. Tem sido utilizado para estudar uma grande variedade de processos biológicos incluindo apoptose, sinalização celular, ciclo celular, regulação gênica, metabolismo, envelhecimento,

entre outros temas. Muitas descobertas importantes em ciência básica e relevantes na área médica foram feitas primeiramente com *C. elegans* (ANKENY, 2002; SIFRI et al., 2005; KALETTA e HENGARTNER, 2006).

Em 1998, *C. elegans* foi o primeiro organismo multicelular a ter o seu genoma completamente sequenciado, e foi possível verificar a presença no nematódeo de genes com homólogos em humanos (WATERSTON, 1998; ANKENY, 2002).

Estudos com virulência bacteriana, com o foco na interação patógeno-hospedeiro iniciaram-se em 1999. Buscava-se um modelo animal no qual se pudesse observar em níveis moleculares a interação entre o patógeno e o hospedeiro, sugerindo assim o modelo *C. elegans*, já que nos modelos animais mamíferos havia complicações e em outros modelos de plantas e de invertebrados não era possível observar alguns detalhes em nível molecular (TAN et al, 1999).

2.1.2 Características gerais

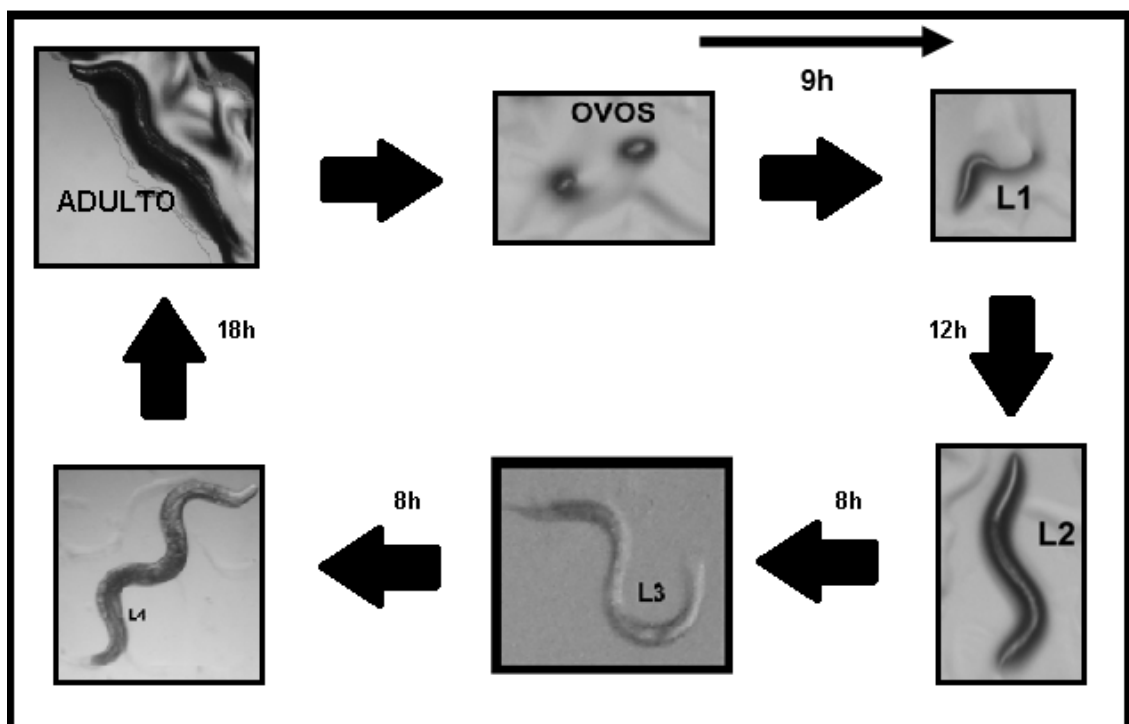
O invertebrado *C. elegans* pertence ao filo nematódeo, seu habitat natural é o solo; apresenta tamanho pequeno, multiplica-se e cresce rapidamente, e possui as formas reprodutivas hermafrodita e macho. O nematódeo adulto mede 1mm de comprimento e possui cerca de 600 células (excluindo o sistema reprodutivo), sendo metade dessas células neurônios (BRENNER, 1974). O adulto hermafrodita tem 959 células somáticas das quais 302 formam o sistema nervoso (KALETTA e HENGARTNER, 2006). Quando cultivado em laboratório, se alimenta da bactéria *E. coli* OP50, que não é patogênica para este animal em meio NGM (STIERNAGLE, 2006; KOMURA et al, 2010).

A sua anatomia é simples, sendo que o seu corpo é tubular, cilíndrico, alongado, com as extremidades cônicas, formado por uma parede celular hipodérmica e outra muscular que é subjacente, e encerra os sistemas reprodutivo e digestivo. Embora possua menos de 1.000 células, o verme possui a maior parte dos tecidos diferenciados, como por exemplo, os nervos, músculos, intestino e gônadas. A boca possui uma faringe muscular, que bombeia o alimento para o intestino, reto e ânus. Já o sistema nervoso é constituído por um anel de nervos, cordões nervosos ventrais e dorsais, além de receptores sensoriais nos gânglios (SULSTON e HORVITZ, 1977).

A capacidade de *C. elegans* se multiplicar rapidamente se deve à autofecundação do adulto hermafrodita, produzindo cerca de 280 ovos. Mas quando ocorre o cruzamento entre hermafrodita e macho há a produção de cerca de mil ovos, sendo que neste caso o esperma fertiliza os oócitos, preferencialmente (LEWIS e FLEMING, 1995). Machos surgem infreqüentemente (0,1%) na linha germinal hermafrodita, e em freqüência de até 50%, a partir do acasalamento (wormatlas.org/handbook/anatomyintro).

O nematódeo cresce de forma rápida, sendo que um ovo demora cerca de 8 horas para eclodir e virar larva (fase L1). O ciclo completo, a partir do ovo passando pelas fases larvais L1 a L4 até atingir a fase adulta dura aproximadamente 3 dias (LEWIS; FLEMING, 1995). O ciclo de vida completo de *C. elegans* está representado na Figura 1.

FIGURA 1 - CICLO DE VIDA DO NEMATÓIDE *Caenorhabditis elegans*



Nota: A figura representa o ciclo de vida de *C. elegans* mantido na temperatura de 20°C. As setas indicam a duração de cada etapa do ciclo de vida. L1 a L4, representam os estágios larvais correspondentes. As fotografias foram realizadas com câmara digital e microscópio Olympus BX40 aumento 40X.

FONTE: O AUTOR (2017).

As larvas de *C. elegans* macho inicialmente apresentam a mesma estrutura cilíndrica da hermafrodita. A partir do estágio L2 a forma da parte posterior começa a mudar com o início do desenvolvimento do órgão sexual

(wormatlas.org/handbook/anatomyintro). As diferenças entre hermafroditas e machos se tornam mais evidentes durante a fase L3. Neste período os machos apresentam a região caudal um pouco mais volumosa. Na fase L4 a formação da vulva na região ventral da hermafrodita e a cauda mais volumosa no macho são mais aparentes. A hermafrodita também começa a se distinguir pelo maior tamanho e pelo formato da cauda (LEWIS; FLEMING, 1995).

Existem outras diferenças entre hermafroditas e os machos, como por exemplo, a presença de ovos acumulados no útero dos primeiros quando estão na fase adulta. Já o macho adulto apresenta tamanho menor e a formação de uma estrutura em leque ou triangular na cauda. Além dessas características, é possível diferenciá-lo pelos seus movimentos, sendo a hermafrodita mais ativa e muda de direção com mais frequência, explorando o ambiente e muitas vezes acaba girando em círculos (JOHNSON; WOOD, 1982).

É fundamental haver alimento suficiente e não haver acúmulo de *C.elegans* numa única placa, pois se isso ocorre, os adultos morrem e as formas jovens até o final do estágio L2 podem entrar num estado de atividade reduzida denominado larva Dauer (LEWIS; FLEMING, 1995; wormatlas.org/handbook/anatomyintro). Durante este estágio a alimentação cessa e a locomoção é marcadamente reduzida; morfologicamente as larvas Dauer são muito finas, apresentam a cavidade bucal selada, e a cutícula espessa e mais resistente que o normal, o que lhes possibilita sobreviver meses em situações precárias. Este estado termina quando as condições se tornam favoráveis ao crescimento. Quando adicionado alimento novamente, essas larvas Dauer retomam o seu desenvolvimento de forma sincronizada (LEWIS; FLEMING, 1995; wormatlas.org/handbook/anatomyintro).

2.1.3 Uso de *Caenorhabditis elegans* em estudos científicos

O nematódeo *C. elegans* possui diversas características que justificam o seu uso como um excelente modelo animal para diversos estudos, dentre elas, é fácil de estudar, o seu tamanho pequeno permite que haja uma grande quantidade desses organismos, sem ocupar muito espaço, o seu ciclo de vida é rápido e a sua multiplicação também, permitindo que haja uma grande quantidade de adulto em pouco tempo, entre outras (LEUNG *et al*, 2008).

Apesar da sua aparente simplicidade *C. elegans* se tornou um importante modelo para pesquisa biomédica. Estudos realizados com *C. elegans* revelaram uma forte conservação em processos moleculares e celulares entre os nematódeos e mamíferos. Adicionalmente, a comparação dos genomas humano e de *C. elegans* confirmou que a muitos genes associados com doenças humanas estão presentes no nematódeo (CHALFIE, 1998; KALETTA e HENGARTNER, 2006). A complexidade celular e a conservação da patogênese de doenças entre *C. elegans* e organismos superiores, junto com a simplicidade e o custo benefício da sua manutenção em laboratório o tornam um modelo *in vivo* eficaz (KALETTA e HENGARTNER, 2006).

Inúmeras descobertas foram obtidas em relação à doenças humanas graças aos estudos com *C. elegans*, entre elas estão achados referentes à doença de Alzheimer. A primeira presenilina, membro de um grupo de proteínas transmembrana, foi descoberta em 1993 em *C. elegans*. Posteriormente, mutações no gene humano da presenilina-1 foram associados com o início familiar precoce da doença de Alzheimer. A expressão da presenilina-1 humana em *C. elegans* foi capaz de resgatar deficiências neuronais de *C. elegans* mutantes para a proteína. Outros estudos com o nematódeo permitiram o avanço na compreensão da doença de Alzheimer pela identificação das presenilinas como componentes da gama-secretase, complexo enzimático que cliva a proteína precursora amiloide (KALETTA e HENGARTNER, 2006; STROOPER, 2007).

No diabetes tipo 2, informações importantes resultaram de estudos genéticos em *C. elegans* que identificaram reguladores negativos da via de sinalização da insulina entre outros achados. Na depressão, além de servir como modelo para estudar os mecanismos moleculares da doença, *C. elegans* também é usado em estudos farmacológicos, como por exemplo, na identificação dos mecanismos de ação da fluoxetina e outros grupos de drogas, e também na descoberta de compostos com atividade antimicrobiana (KALETTA e HENGARTNER, 2006; EWBANK e ZUGASTI, 2011). Além disso, estudos com o nematódeo trouxeram informações valiosas sobre os mecanismos moleculares envolvidos em outras patologias incluindo a doença de Parkinson, doença de Huntington, distrofia muscular, câncer, entre outras (KALETTA e HENGARTNER, 2006). Também é um modelo importante para a compreensão dos processos envolvidos na síndrome

metabólica, obesidade e na senescência (KALETTA e HENGARTNER, 2006; YEN e MOBBS, 2010), além da sua aplicação na toxicologia (LEUNG et al., 2008).

2.2 VIRULÊNCIA BACTERIANA

Virulência pode ser definida como a medida da patogenicidade de um micro-organismo e o seu grau está relacionado com a capacidade de causar uma doença, mesmo na presença dos mecanismos de defesa do hospedeiro (PITOUT, 2012).

Pode-se determinar a virulência de uma bactéria por meio de experimentos em animais, nos quais é possível determinar o número de bactérias necessárias para causar uma doença, lesão, ou até mesmo a morte do animal. São utilizados parâmetros, como por exemplo, a dose letal de um micro-organismo. Nos estudos pode-se comparar os efeitos da dose letal de estirpes diferentes, verificando-se a porcentagem da população animal afetada; ou os seus efeitos em doses distintas. Essas informações são necessárias para poder comparar a virulência de diferentes bactérias (PETERSON, 1996). Este tipo de modelo está em desuso, e o cultivo celular e a genômica vem sendo utilizadas. Os estudos genômicos são importantes no estudo da virulência, pois identificam os genes que codificam cada fator específico. A determinação dos fatores de virulência está relacionada não apenas na presença ou ausência do gene, mas é preciso considerar também o nível da expressão gênica dos mesmos, que varia entre isolados patogênicos e não-patogênicos (PITOUT, 2012).

Os fatores de virulência bacterianos podem ser codificados no cromossomo, plasmídeos, transposons, e no DNA de bacteriófagos, estando os dois últimos integrados ao cromossomo bacteriano.

Diversas características bacterianas estão associadas com virulência. Alguns são importantes para a colonização do hospedeiro, como aqueles envolvidos na adesão que permite que as bactérias permaneçam aderidas a mucosa do hospedeiro, evitando a sua remoção. Entre os fatores associados com a adesão citam-se os pili ou fímbrias, os ácidos lipoteicoicos que se projetam para o exterior da parede celular das bactérias gram-positivas, cápsulas, e proteínas de membrana externa. Outras características bacterianas auxiliam na invasão do hospedeiro, como a formação de cápsulas, que protegem as bactérias da fagocitose. Outras causam danos no hospedeiro como a produção de toxinas. Entre elas está a

endotoxina ou lipopolissacarídeo, componente da parede celular das bactérias gram-negativas, que causa febre e pode levar a alterações na pressão sanguínea, entre outros eventos e até mesmo choque. Outros produtos com ação tóxica incluem as exotoxinas que são secretadas para o exterior da célula bacteriana, incluindo vários tipos de citotoxinas, neurotoxinas e enterotoxinas que apresentam diferentes mecanismos de ação e efeitos sobre o hospedeiro; além de enzimas como elastases, hialuronidases, entre outras (PETERSON, 1996; WINN, Jr et al., 2006).

Outra característica que pode afetar a virulência bacteriana é a capacidade de formação de biofilme, estrutura complexa na qual as bactérias vivem como comunidades aderidas a superfícies celulares (COSTERTON et al., 1999; HANCOCK et al., 2007; ONG et al., 2008). Problemas econômicos e na saúde estão relacionados aos biofilmes, pois muitas infecções agudas e crônicas persistentes ocasionadas por bactérias estão ligadas aos biofilmes bacterianos (COSTERTON et al., 1999), que auxiliam na proteção contra a fagocitose, resistência a desidratação e maior resistência a antibióticos (HANCOCK et al., 2007; PIRES et al., 2007; ONG et al., 2008).

2.2.1 *Caenorhabditis elegans* e virulência bacteriana

O modelo animal *C. elegans* vem sendo utilizado há alguns anos para analisar a virulência de bactérias de importância clínica (KOMURA et al., 2010). Um método comum para determinar se um micro-organismo é patogênico para *C. elegans* é realizar ensaios de viabilidade nos quais a virulência é medida pelo tempo requerido pela bactéria para matar uma proporção pré-determinada do hospedeiro. Tipicamente o tempo para matar 50% dos hospedeiros é usada. Resumidamente, o ensaio consiste em colocar os micro-organismos a serem testados sobre um meio de cultura em placas de Petri, e então o *C. elegans* no estágio desenvolvimental especificado e monitorar o tempo de morte (ALEGADO et al., 2003).

Uma das primeiras bactérias a serem estudadas utilizando *C. elegans* foi *Pseudomonas aeruginosa*, um bacilo gram-negativo comumente encontrado no solo, em ambientes aquáticos e em associação com muitos organismos eucarióticos. Em humanos *P. aeruginosa* pode causar várias infecções oportunistas em pacientes imunocomprometidos. *C. elegans*, um nematódeo que se alimenta de bactérias e

também vive no solo, possivelmente pode encontrar *P. aeruginosa* no seu ambiente natural (TAN e AUSUBEL, 2000).

Estudos realizados com *P. aeruginosa* mostraram que a bactéria pode matar *C. elegans* utilizando pelo menos 3 mecanismos distintos, dependendo da estirpe e do meio de cultura. O isolado clínico de *P. aeruginosa* estirpe PA14 em meio NGM, de osmolaridade relativamente baixa, causa morte do nematódeo de forma relativamente lenta no decorrer de 2 a 3 dias (morte lenta). Em contraste, *P. aeruginosa* PA14 cultivada em meio rico e de alta osmolaridade mata os nematódeos rapidamente excretando toxinas de baixo peso molecular (morte rápida). Por outro lado, a estirpe *P. aeruginosa* PA01 causa morte de *C. elegans* por um mecanismo que envolve a produção de uma ou mais neurotoxinas incluindo ácido cianídrico que causam paralisia de forma rápida e letal (DARBY et al., 1999; TAN e AUSUBEL, 2000; ABALLAY e AUSUBEL, 2002).

Outra bactéria estudada utilizando esse modelo inclui *Salmonella* Typhimurium. Foi observado o acúmulo da bactéria no lúmen do intestino, levando a uma infecção persistente e por fim a morte dos nematódeos ao longo de vários dias. No entanto, a forma da bactéria com mutação no sistema de transdução de sinal PhoP/PhoQ causou menor número de morte dos vermes indicando a participação desse sistema na virulência do micro-organismo (ABALLAY et al., 2000).

Para *Legionella pneumophila* não foram encontradas diferenças significantes em relação a taxa de sobrevivência de *C. elegans* adultos (idade de 3 dias) alimentados com *E. coli* OP50. No entanto, a bactéria causou morte de nematódeos de 7,5 dias, mostrando que é virulenta para os nematódeos mais velhos (KOMURA et al., 2010).

Diversos outros estudos foram realizados usando *C. elegans* como modelo e mostraram que muitas bactérias patogênicas para humanos também o são para o nematódeo (COUILLAULT e EWBANK, 2002; ALEGADO et al., 2003; SIFRI et al., 2005; ENGELMANN e PUJOL, 2010). Foi observado que a maioria dos patógenos conhecidos de *C. elegans* usa duas vias principais de infecção, através da faringe ou da epiderme. Muitas bactérias infectam o nematódeo via oral durante a sua alimentação e conseguem estabelecer uma infecção intestinal (ENGELMANN e PUJOL, 2010).

Como já foi apresentado acima, *C. elegans* possui vida livre no solo onde se alimenta de bactérias e assim está exposto a potenciais patógenos. Foi mostrado

que *C. elegans* possui alguns mecanismos de defesa contra patógenos, sendo eles a resposta comportamental, a barreira física (cutícula) e um sistema imune inato (SCHULENBURG et al., 2004). A resposta comportamental possibilita que eles evitem micro-organismos patogênicos, isto ocorre através dos neurônios olfatórios que fazem com que alguns atraiam sua atenção, enquanto outros repelem o nematódeo (SCHULENBURG e EWBANK, 2007).

C. elegans não possui sistema imunológico adaptativo, nem células imunológicas especializadas, apenas 6 células denominadas coelomócitos, presentes na cavidade de seu corpo, que não são capazes de realizar a fagocitose, mas funcionam como células removedoras com uma elevada capacidade endocítica (BARRIÈRE e FÉLIX, 2005; ENGELMAN e PUJOL, 2010). Portanto, *C. elegans* depende do sistema inato para se defender dos patógenos, e foi descrito que o mesmo utiliza vias de sinalização evolutivamente conservadas (ENGELMAN e PUJOL, 2010). Foi verificado que a resposta anti-viral depende da maquinaria de RNA de interferência intracelular e fatores como a proteína argonauta RDE-1 e a proteína ligadora de dsRNA RDE-4 sendo essenciais no processo, enquanto que a via de sinalização MAPK ativa o sistema inato em resposta a infecção bacteriana (ERMOLAEVA e SCHUMACHER, 2014).

2.3 MÉTODOS PARA A REALIZAÇÃO DE ENSAIOS DE VIABILIDADE DE *C. elegans*

Além do método clássico utilizado para determinar a virulência bacteriana através da determinação da taxa de morte ou da viabilidade de *C. elegans* frente às bactérias, outras metodologias também são utilizadas. No método clássico é utilizado o ágar NGM ao qual se adiciona as bactérias a serem testadas e então o nematódeo com idade sincronizada (STIERNAGLE, 2006). Neste método é necessário que os nematódeos sejam transferidos diariamente para novas placas para evitar a mistura de gerações e para que possa estabelecer adequadamente a taxa de organismos viáveis. Alternativas incluem a utilização de meio líquido para a realização dos ensaios, ou ainda a adição do composto FUDR (5'-fuoro-2'-deoxiuridina) ao meio de cultura (COUILLAULT, EWBANK, 2002; CHEN et al., 2014). A presença de FUDR inibe a síntese de DNA, e a incorporação da fluorouracila, um dos seus produtos de degradação, no RNA inibe a síntese de

proteínas. Isto resulta na esterilização dos adultos evitando a eclosão dos ovos (HOSONO, 1978) e, portanto, a mistura de gerações durante os experimentos. Dessa forma, a adição desse composto ao meio é vantajosa uma vez que reduz a trabalhosa etapa de transferência dos nematódeos diariamente para novos meios.

Neste trabalho a viabilidade de *C. elegans* frente a diversas bactérias foi analisada realizando ensaios na presença ou ausência de FUDR.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Comparar métodos empregados na utilização de *C. elegans* como modelo para determinar a virulência de bactérias.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a viabilidade de *C. elegans* utilizando *Escherichia coli* OP50 como alimento em meio NGM;
- Realizar ensaios de viabilidade de *C. elegans* e verificar a virulência de bactérias de interesse;
- Verificar o efeito da presença de 5'-fluoro-2'-deoxiuridina (FUDR) sobre a viabilidade de *C. elegans* cultivado com *E. coli* OP50 ou outras bactérias como alimento;
- Comparar os resultados dos ensaios de viabilidade de *C. elegans* na presença e ausência de FUDR

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 AMOSTRA

C. elegans e a bactéria *Escherichia coli* OP50 utilizados neste trabalho, foram fornecidos pelo *Caenorhabditis Genetics Center* (CGC), financiado pelo “NIH Office of Research Infrastructure Programs” (P40 OD010440), e mantido na Universidade de Minnesota, Minneapolis, MN, Estados Unidos da América.

Descrição:

C. elegans wild type N2 (ancestral). Originalmente isolado de fungos em decomposição próximo de Bristol, na Inglaterra por L. N. Staniland. Cultivado por W. L. Nicholas, identificado quanto ao gênero por Gunther Osche e espécie por Victor Nigon; subsequentemente cultivado por C.E. Dougherty e fornecido para Sydney Brenner.

Estoques de *C. elegans* foram mantidos a 23°C em placas contendo meio NGM (*nematode growth medium*) e *E. coli* OP50 como alimento (STIERNAGLE, 2006). Os nematódeos foram transferidos semanalmente para novas placas de NGM contendo *E. coli* OP50. As transferências foram realizadas com auxílio da lupa *Olympus Z40*, com objetiva de aumento 20X e o uso de alças bacteriológicas plásticas estéreis.

Escherichia coli OP50 - *E. coli* B, auxotrofo para uracila. Nível de biossegurança 1 (BSL-1).

As demais bactérias testadas estão indicadas na Tabela 1.

TABELA 1 - BACTÉRIAS UTILIZADAS NESTE TRABALHO

Bactéria	Origem
<i>Aeromonas caviae</i> (4 estirpes)	Isolado clínico (fezes)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Isolado clínico (fezes)
<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC® 7966	ATCC*
<i>Aeromonas trota</i> 2	Isolado clínico (fezes)
<i>Aeromonas trota</i> 1999lcr	Isolado clínico (liquor)
<i>Aeromonas veronii</i> sobria (4 estipes).	Isolado clínico (fezes)
<i>Enterococcus faecalis</i> derivado de ATCC® 29212 [#]	Newprov
<i>Escherichia coli</i> M03 (STEC)	Isolado clínico (fezes)
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	Isolado do solo**
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> (2 estirpes)	Isolado clínico***
<i>Salmonella</i> Braenderup ATCC® BAA-664 ^{1M}	ATCC*
<i>Salmonella</i> Enteritidis 21C [#]	Isolado clínico (fezes)
<i>Salmonella</i> Typhimurium 59C [#]	Isolado clínico (fezes)
<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC® 14028	Newprov
<i>Shigella flexneri</i> derivada de ATCC® 12022 [#]	Newprov
<i>Shigella sonnei</i>	Isolado clínico (fezes)
<i>Staphylococcus aureus</i> derivado de ATCC® 25923 [#]	Newprov
<i>Proteus mirabilis</i> derivado de ATCC® 25933	Newprov
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 27853	ATCC*

Isolados clínicos mantidos na bacterioteca do Laboratório de Bacteriologia Clínica da Universidade Federal do Paraná; *Adquirido da *American Type Culture Collection*; **Spilker et al., 2008; ***Pedrosa et al., 1997; [#]bactérias testadas apenas em presença de FUDR.

4.2 REAGENTES E MEIOS DE CULTIVO

4.2.1 Meio NGM

Para o preparo do meio NGM são necessários os seguintes reagentes:

CaCl₂ 1M, colesterol 5 mg/mL, MgSO₄ 1M, Tampão Fosfato 1M, NaCl, peptona e ágar. O preparo das soluções está descrito a seguir

Componentes do meio NGM basal (para 1L)

- 3 g de NaCl;
- 1 g de ágar;
- 2,5 g de peptona;
- H₂O destilada 975mL

Os componentes foram pesados, e então transferidos e homogeneizados em um *erlenmeyer* de 2 litros. Adicionou-se 975mL de água destilada, vedou-se o frasco com tampão e esterilizou-se em autoclave a 121°C por 30 minutos. Após resfriar até 55°C, adicionou-se 1mL de CaCl₂ 1M, 1mL de colesterol 5mg/mL em etanol, 1mL de MgSO₄ 1M e 25mL de tampão fosfato 1M. Misturou-se bem e o meio foi transferido ainda líquido para placas de Petri, procurando encher 2/3 das placas (STIERNAGLE, 2006).

4.2.2 Tampão Fosfato 1M pH 6,0 (para 1 litro):

Componentes:

- 108,3g de KH₂PO₄;
- 35,6g de K₂HPO₄.
- H₂O destilada q.s.p 1000mL

Os reagentes foram transferidos para um frasco, adicionou-se água destilada. Em seguida, o pH foi verificado com auxílio de pHmetro (accumet® basic - Fisher Scientific) e ajustado, se necessário.

4.2.3 Solução CaCl₂ 1M

- 110,99g de CaCl₂
- 1 litro de água destilada.

4.2.4 Solução MgSO₄ 1M:

- 246,48g de MgSO₄.7H₂O;
- 1 litro de água destilada.

As soluções foram esterilizadas a 121°C, 1 atmosfera, por 30 minutos.

4.2.5 Solução de colesterol 5mg/mL:

- 5g de colesterol;
- 1 litro de álcool etílico.

Esterilizar a solução por filtração utilizando filtro de 0,2 μm .

* Quando utilizado o reagente FUDR, este deve ser adicionado após as soluções de CaCl_2 , colesterol, MgSO_4 e tampão fosfato.

4.2.6 Meio S (Meio Líquido para *C. elegans*)

Componentes:

- 1 litro da solução Basal S;
- 10mL de solução citrato de potássio 1M pH6;
- 10mL da solução metal traço;
- 3mL de CaCl_2 1M;
- 3mL de MgSO_4 1M;

4.2.7 Solução Basal S:

- 5,85g de NaCl;
- 1g de K_2HPO_4 ;
- 6g de KH_2PO_4 ;
- 1mL de colesterol (5mg/ml em etanol);
- 1 litro de água destilada.

Misturar os componentes (menos o colesterol em etanol) em um frasco erlenmeyer, adicionar a água destilada e autoclavar por 30 minutos.

4.2.8 Solução de citrato de potássio 1M pH 6,0:

- 20g de ácido cítrico monohidratado;
- 293,5g de citrato de potássio monohidratado;
- 1 litro de água destilada.

Misturar os componentes em um frasco, adicionar a água destilada e autoclavar a 121°C por 30 minutos.

4.2.9 Solução de metais traços:

- 1,86g de EDTA dissódico;
- 0,69g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$;
- 0,2g de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$;
- 0,29g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$;
- 0,025g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$;
- 1 litro de água destilada.

Misturar os componentes em um frasco, adicionar a água destilada e autoclavar a 121°C por 30 minutos. Guardar o frasco no escuro.

O reagente 5'-Fluoro-2'-deoxyuridine (FUDR) foi adquirido da Sigma e utilizado para o preparo de uma solução estoque na concentração de 100mg/mL em água ultrapura estéril.

4.3 SINCRONIZAÇÃO

Para a realização dos experimentos é necessário que os nematódeos *C. elegans* apresentem a mesma idade. Para isso é necessário a realização da sincronização. Foram utilizadas duas metodologias para sincronização neste trabalho.

O método sugerido pelo CGC (STIERNAGLE, 2006), que também pode ser usado em caso de contaminação do estoque de *C. elegans*, requer os reagentes NaOH 5N e solução de hipoclorito de sódio a 5%; e também hermafroditas grávidas. Para cada processo de sincronização foram utilizadas 4 placas de Petri com NGM contendo hermafroditas grávidas (*C. elegans* com idade de aproximadamente 3,5 dias).

Procedimento: com uma pipeta Pasteur estéril, lavar as placas com água destilada estéril várias vezes para soltar os nematódeos e ovos que estão presos na camada de bactéria que recobre o meio NGM. A seguir, transferir a suspensão para um tubo cônico estéril com capacidade de 5mL com tampa de rosca e adicionar água destilada até atingir o volume de 3,5mL. Adicionar 0,5mL de solução NaOH 5N (p/v) e 1mL de solução de hipoclorito de sódio a 5% (v/v). Então, homogeneizar o

tubo em agitador tipo vórtex por alguns segundos e deixar em repouso a temperatura ambiente por 2 minutos. Repetir o procedimento durante um período de 10 minutos. Centrifugar o tubo por 30 segundos a uma velocidade de 1300xg para ocorrer à liberação dos ovos. Desprezar o sobrenadante, e adicionar ao sedimento 5mL de água destilada estéril, agitar novamente no vortéx por alguns segundos, centrifugar novamente nas mesmas condições acima; repetir este procedimento mais uma vez. Após a centrifugação, desprezar o sobrenadante e usando pipeta Pasteur estéril, transferir a suspensão contendo os ovos para uma nova placa de Petri com meio NGM e *E. coli* OP50. Aguardar a eclosão dos ovos e o desenvolvimento larval até atingir a idade adulta para dar início aos experimentos. Como o ciclo de vida dos *C. elegans* é curto, aproximadamente 15 dias, a sua reprodução e crescimento são relativamente rápidos. Quando um ovo é colocado, o tempo de eclosão é de aproximadamente 9 horas, quando mantido a 20°C. Nesta temperatura, em aproximadamente 8 horas, uma larva na fase L1 passa para o L2, e no total de 37 horas aproximadamente, elas se encontram na fase L4 (STIERNAGLE, 2006).

O segundo método de sincronização utilizado consiste em transferir aproximadamente 10 a 15 hermafroditas grávidas para uma placa de NGM contendo *E. coli* OP50. Em um tempo médio de 6 a 8 horas essas hermafroditas põem muitos ovos. Após este período os *C. elegans* são retirados do meio. Após cerca de 9 horas ocorre a eclosão dos ovos e em aproximadamente 37 horas, em temperatura de 20°C, as larvas atingem a fase L4 (JOVE, 2016).

4.4 CONDIÇÕES DE CULTIVO BACTERIANO

E. coli OP50 (controle) e as bactérias testadas foram semeadas primeiramente em ágar MacConkey ou ágar Nutriente, durante o período de aproximadamente 18 horas a 37°C. Então, uma colônia isolada de cada bactéria foi utilizada para o preparo dos inóculos.

Preparo do inóculo. Para os ensaios de virulência realizados em NGM sem FUDR ou meio líquido S, as colônias isoladas foram transferidas para tubos tipo Eppendorf estéreis, com capacidade de 1,5mL, contendo 500µL de caldo TSB e incubadas a 37°C por cerca de 2 horas, até atingir a turvação do tubo 3,0 da escala de MacFarland; para estes ensaios os inóculos foram preparados diariamente.

Para os ensaios realizados em meio NGM contendo FUDR o inóculo foi preparado em tubos estéreis de 15mL, com tampa de rosca, contendo 10mL de caldo TSB e incubado a 37°C durante aproximadamente 18 horas. Então o meio foi centrifugado a 4000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado, e o sedimento contendo as bactérias foi ressuspensão no volume de 0,5mL de forma a obter uma cultura bacteriana concentrada 20X (HE, 2011).

4.5 ENSAIOS DE VIRULÊNCIA

Todos os ensaios realizados neste trabalho foram iniciados com os nematódeos com idade sincronizada e em fase L4. Foram realizados 3 tipos de ensaio: em placas de Petri contendo ágar NGM; em placas de 24 poços, fundo chato contendo meio líquido S, ou em meio sólido NGM contendo FUDR.

4.5.1 Ensaio em placas de Petri contendo meio NGM

Para estes ensaios, 10 exemplares de *C. elegans*, com idade sincronizada na fase L4, foram transferidos para placas de Petri contendo o meio NGM e 200µL da suspensão bacteriana já adicionada na região central da placa. As placas foram observadas diariamente, e foi determinado o número de nematódeos viáveis e mortos. Diariamente, durante o período de 10 dias, os nematódeos viáveis foram transferidos para novas placas contendo meio NGM, e a suspensão bacteriana recém preparada, para que não houvesse mistura de gerações. Foram considerados mortos somente os nematódeos que não reagiram ao toque da agulha bacteriológica (COUILLAULT e EWBANK, 2002).

4.5.2 Ensaio em Meio S

Esses ensaios foram realizados em placas com 24 poços de fundo chato. Foram adicionados 100µL de meio NGM no fundo dos poços e após a solidificação do meio foram acrescentados 2,5mL de meio líquido S contendo FUDR (0.1 mg ml⁻¹) (HE, 2011). Então 50µL da suspensão bacteriana foram adicionados e a placa deixada a 23°C em uma caixa fechada. No dia seguinte foram adicionados 10 exemplares de *C. elegans* em cada poço. E depois de 24 horas, foram analisados o número de viáveis e mortos (SOLIS e PETRASCHECK, 2011).

4.5.3 Ensaio em Meio NGM contendo FUDR

A concentração de FUDR utilizada, 30 μM , foi baseada no trabalho de Gandhi e colaboradores (1980). Após a solidificação do meio NGM contendo o FUDR, foram adicionados 500 μL da suspensão bacteriana 20X concentrada (item 4.3) no centro da placa que foi deixada no escuro por 24 horas. Então, aproximadamente 30 a 60 exemplares de *C. elegans* na fase L4 foram adicionados, por placa. O número de nematódeos vivos ou mortos foi contabilizado durante 10 dias consecutivos de experimento (SUTPHIN e KAEBERLEIN, 2009), sem realizar a transferência dos mesmos para novas placas, uma vez que estes permaneceram estéreis, não havendo risco de mistura de gerações. Os nematódeos que não respondiam ao toque da agulha bacteriológica foram considerados mortos. Os ensaios foram realizados em duplicata e sem o conhecimento da identidade da bactéria, que foi revelada somente após o término do experimento.

Para cada bactéria foram realizados ao menos dois experimentos independentes.

4.5.4 Análise Estatística

Média e desvio padrão foram calculadas utilizando o software Excel, o teste de Qui quadrado foi realizado com o software Statistica for Windows versão 8.0. Foram considerados como significativos valores de $P < 0,05$.

5 RESULTADOS

Em todos os ensaios realizados a bactéria *E. coli* OP50 foi utilizada como controle, já que esta não patogênica para o *C. elegans* nas condições testadas, e é recomendada como alimento para a manutenção do nematódeo em laboratório (STIERNAGLE, 2006).

5.1 ENSAIOS EM MEIO S

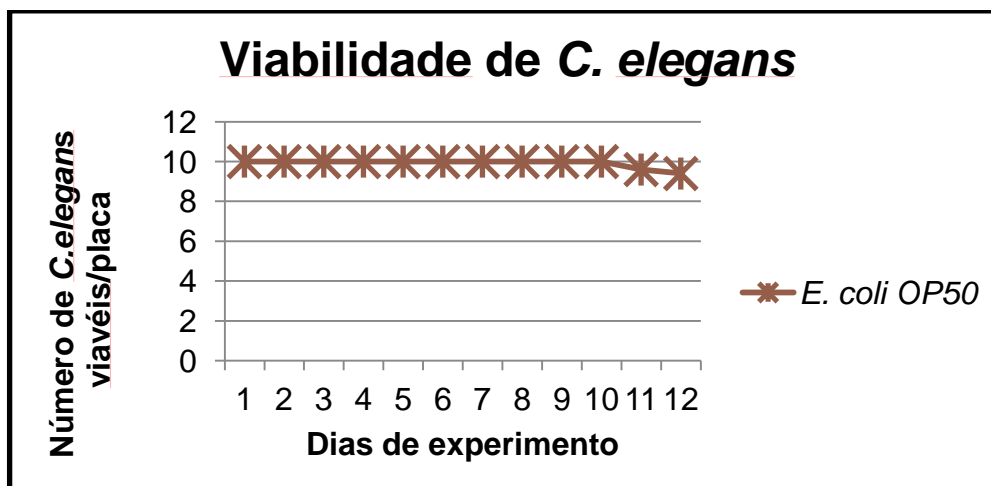
No decorrer dos experimentos realizados em meio líquido S, foi observado que os nematódeos avaliados permaneceram imóveis, diferente do que ocorre em meio NGM em que eles se mantêm altamente móveis o que facilita a diferenciação entre os exemplares vivos e mortos. Esse comportamento em meio líquido foi descrito na literatura especializada (STIERNAGLE, 2006).

Como a mobilidade é um dos fatores utilizados neste trabalho para definir a viabilidade de *C. elegans*, este método foi considerado insatisfatório e os ensaios foram descontinuados.

5.2 ENSAIOS EM MEIO NGM

Inicialmente foram realizados 5 ensaios independentes com *C. elegans* e a bactéria controle *E. coli* OP50 para verificar o comportamento do nematódeo e determinar a duração dos testes. Os resultados estão indicados no gráfico 1.

GRÁFICO 1 - DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE DURAÇÃO DOS ENSAIOS



FONTE: O Autor (2017)

Através destes ensaios verificou-se que os nematódeos permaneciam ativos e móveis. Até o 10º dia todos os exemplares de *C. elegans* permaneceram viáveis, e

a partir do 11º dia do início dos experimentos começaram a surgir exemplares mortos (GRÁFICO 1). Assim, foi determinada a duração dos experimentos em 10 dias de modo a minimizar o efeito da morte decorrente da idade dos nematódeos.

Neste ensaio foram testadas bactérias pertencentes a 7 gêneros: *Aeromonas*, *Escherichia*, *Herbaspirillum*, *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus* e *Pseudomonas*. Todas as bactérias testadas são bacilos gram-negativos, mas pertencem a diferentes grupos:

Enterobactérias - *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella* e *Proteus* que são anaeróbios facultativos, fermentadores de glicose e citocromo oxidase negativos.

Família *Aeromonadaceae* – *Aeromonas*, inclui anaeróbios facultativos, fermentadores de glicose e citocromo oxidase positivos.

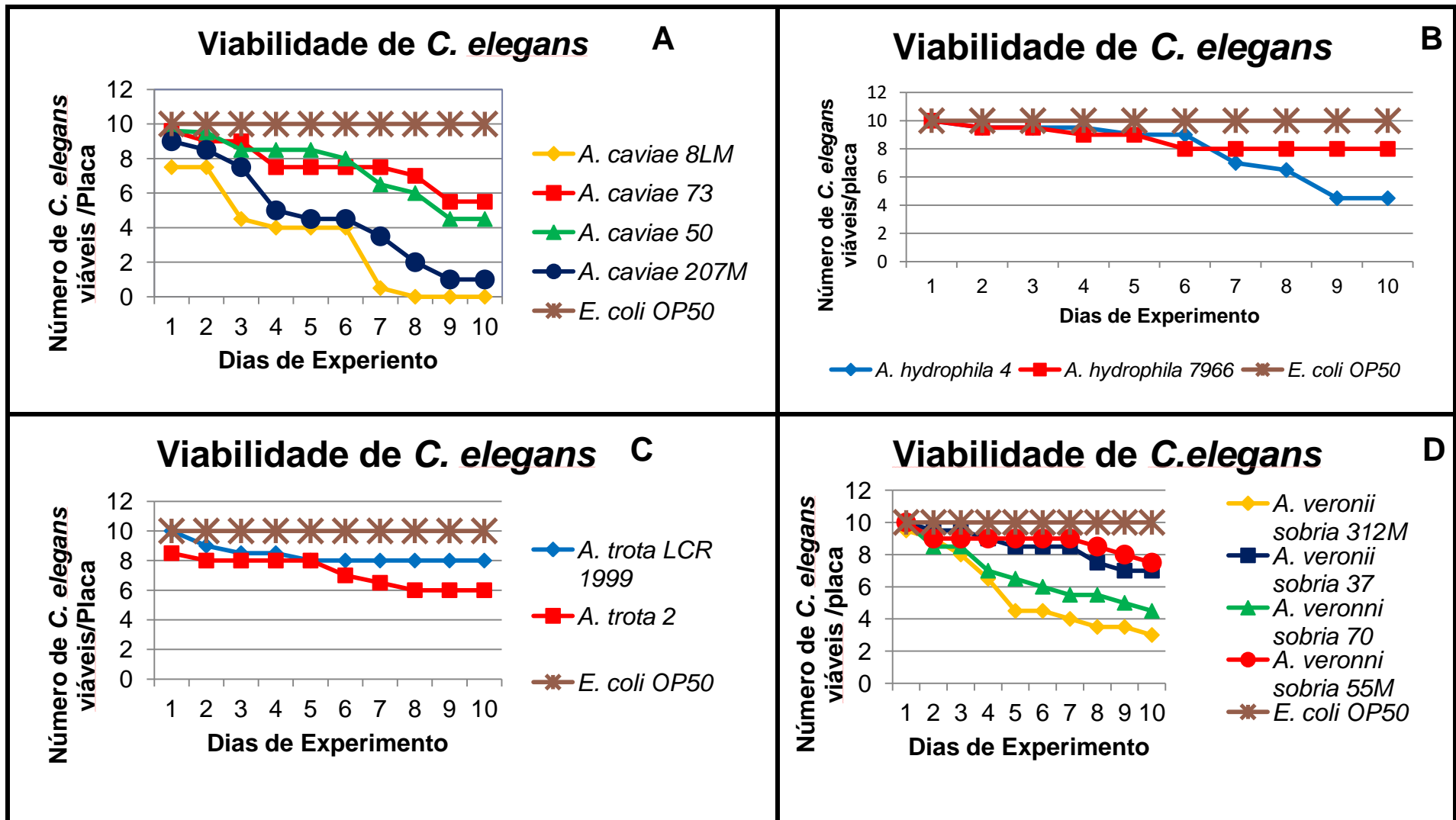
Bacilos gram-negativos não fermentadores: *Herbaspirillum* e *Pseudomonas* bactérias incapazes de fermentar a glicose (WINN Jr. et al., 2006).

Para cada grupo de experimentos realizados, *E. coli* OP 50 foi testada como controle de modo a garantir que as condições de teste estavam adequadas.

Foram realizados testes de viabilidade de *C. elegans* frente a bactérias de 4 espécies do gênero *Aeromonas*, entre elas *A. caviae* (4 estirpes), *A. hydrophila* (2 estirpes), *A. trota* (2 estirpes) e *A. veronii* sobria (4 estirpes). Os resultados obtidos para *A. caviae* estão indicados na Figura 2.

Observa-se que a viabilidade de *C. elegans* alimentado com *E. coli* OP50 permaneceu inalterada até o último dia de experimento, indicando que as condições de teste (alimento, meio, temperatura, umidade) estavam adequadas. Em relação à viabilidade de *C. elegans* alimentados com *A. caviae*, a viabilidade foi reduzida já no 1º dia do experimento (isolado 207M), mas para os demais esse efeito foi observado a partir do 2º, 3º ou 4º dia. A figura 2A indica também que cada bactéria apresentou efeitos diferentes sobre a viabilidade de *C. elegans*. Quando alimentados com *A. caviae* 50 e 73 o número de nematódeos viáveis no 10º dia do experimento foi respectivamente, de 5 e 4 exemplares, ao passo que com os isolados *A. caviae* 207LM e 8LM restou apenas 1 ou nenhum exemplar. Estes resultados sugerem que os isolados apresentam diferentes graus de virulência para *C. elegans*. *A. caviae* 73 parecer ser menos virulenta, pois aproximadamente 60% dos nematódeos permaneceram viáveis, ao passo que *A. caviae* 8LM seria mais virulenta uma vez que matou todos os nematódeos (FIGURA 2A).

FIGURA 2 - VIABILIDADE DE *C. elegans* FRENTE A ESPÉCIES DE *Aeromonas*.



Os resultados mostrados representam a média de no mínimo dois experimentos independentes.

FONTE: O Autor (2017)

Para os nematódeos alimentados com *A. hydrophila* (FIGURA 2B), o início da queda na viabilidade ocorreu a partir do 2º dia na maioria dos experimentos. *A. hydrophila* ATCC 7966 causou a morte de apenas 2 dos 10 nematódeos, enquanto que *A. hydrophila* 4 causou um efeito um pouco mais intenso na redução da viabilidade.

Para *C. elegans* alimentados com *A. trota* o efeito sobre a viabilidade também foi discreto (FIGURA 2C), e o período no qual se observou o início do surgimento de mortos variou bastante, do 1º ao 9º dia do experimento (TABELA 2).

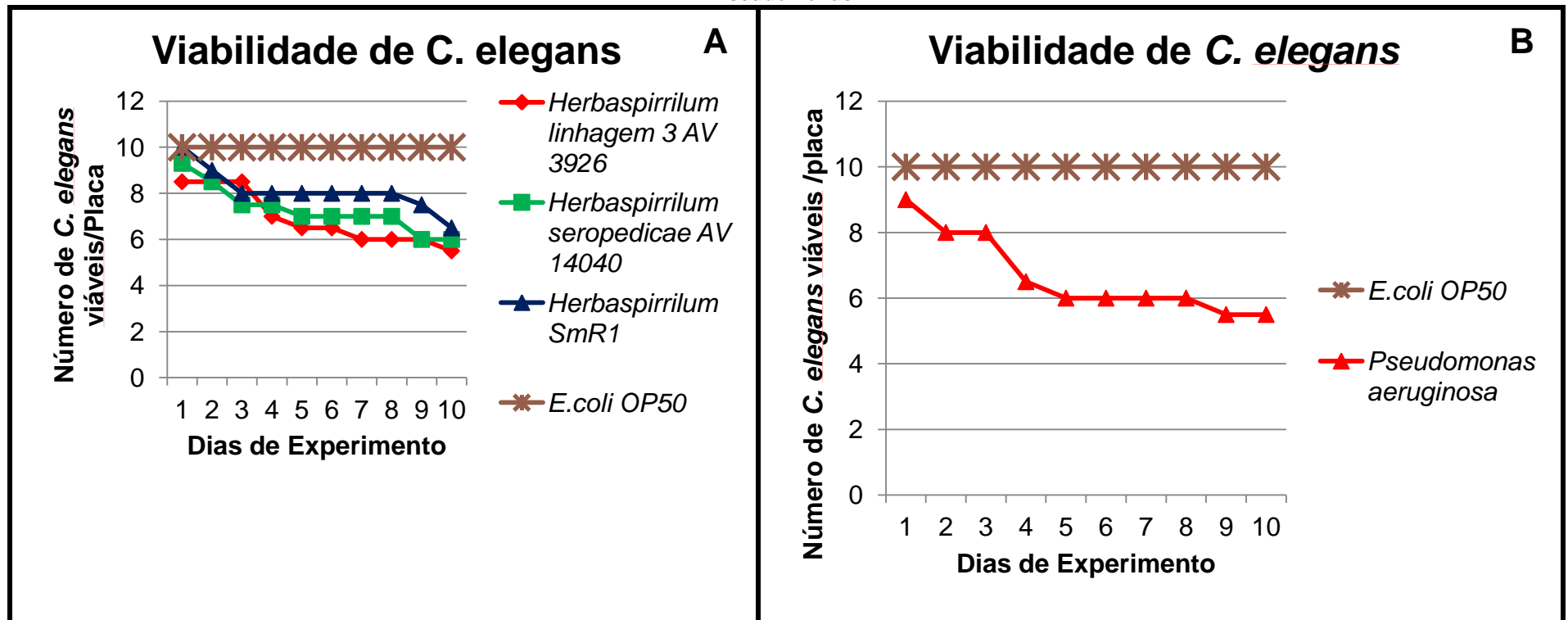
Em relação à espécie *A. veronii* sobria, 4 isolados foram estudados, com resultados variáveis (FIGURA 2D). Na maioria dos experimentos *C. elegans* mortos foram observados a partir do 2º dia de experimento, e o número total de mortes variou de 0 (*A. veronii* sobria 55M) a 8 (*A. veronii* sobria 312M) dos dez espécimes do nematódeo testados.

Portanto estes ensaios sugerem que a virulência em *Aeromonas* não é uniforme, e que diferentes níveis podem ser observados em uma mesma espécie. Com *C. elegans* como modelo maior grau de virulência foi observado em *A. caviae* 8LM e 207M, e *A. veronii* sobria 312M (FIGURA 2).

O gênero *Herbaspirillum* é composto por bactérias do solo que são endofíticas de algumas plantas e raramente causam infecções em humanos (MARQUES et al., 2015). Neste trabalho foram estudadas 3 bactérias pertencentes a este gênero. Os resultados dos ensaios de viabilidade de *C. elegans* alimentados com as bactérias estão indicados na Figura 3A. Novamente a viabilidade de *C. elegans* alimentado com *E. coli* OP50 permanece inalterado ao longo dos experimentos (FIGURA 3A e 3B). As estirpes de *Herbaspirillum* mostraram um comportamento uniforme sobre a viabilidade de *C. elegans* causando a morte de em média 3 dos exemplares testados (FIGURA 3A). O início do surgimento de exemplares mortos variou entre o 1º e o 4º dias nos diferentes experimentos.

Neste trabalho foi testada apenas uma espécie do gênero *Pseudomonas*, sendo ela *P. aeruginosa* ATCC 27853. Esta bactéria também afetou a viabilidade de *C. elegans*, causando a morte de 4 dos 10 exemplares testados por ensaio (FIGURA 3B). As mortes se iniciaram a partir do 1º ou 2º dia de experimento.

FIGURA 3 - ENSAIOS DE VIABILIDADE DE *C. elegans* ALIMENTADOS COM BACILOS NÃO-FERMENTADORES DOS GÊNEROS *Herbaspirillum* E *Pseudomonas*.



Os resultados indicam o valor médio de dois experimentos independentes.

FONTE: O Autor (2017)

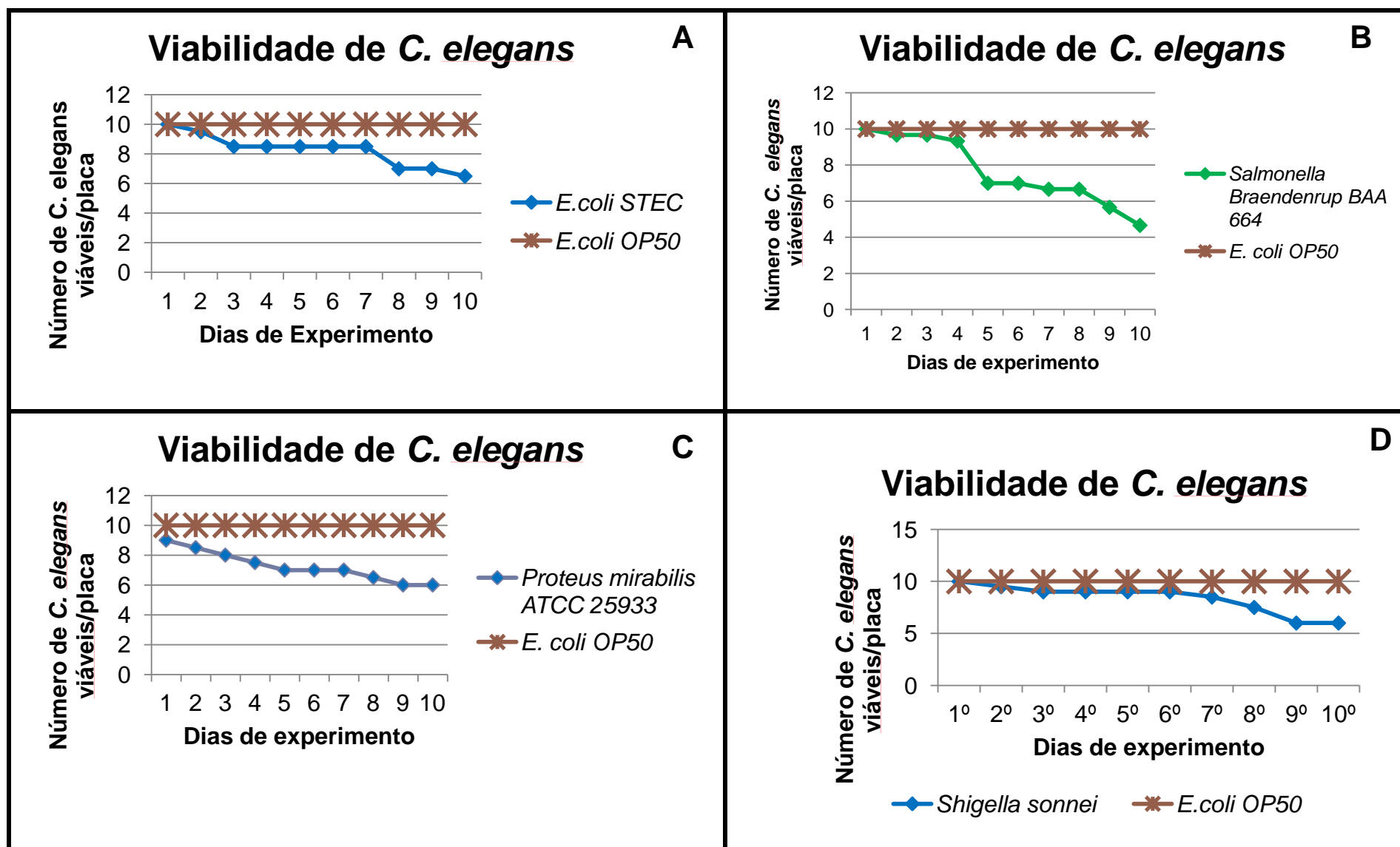
Escherichia coli, *Salmonella* sorotipo Braendenrup, *Proteus mirabilis* e *Shigella sonnei* pertencem todos à família *Enterobacteriaceae*. Todas foram capazes de causar morte de *C. elegans* como indicado na Figura 4.

E. coli M03, pertencente ao grupo das *E. coli* produtoras de toxina Shiga (STEC) causou a morte de, em média, 4 nematódeos por experimento (FIGURA 4A), foi observado que o número dias requeridos para o início das mortes variou entre os experimentos, de 2 a 8.

Salmonella estão mais frequentemente associadas com casos de diarreia em humanos. Quando *Salmonella* sorotipo Braendenrup ATCC BAA 664 (FIGURA 4B) foi utilizada como alimento para *C. elegans* a bactéria provocou a morte de cerca de 5 nematódeos em média, e o tempo inicial para as mortes variou entre 2 a 4 dias.

P. mirabilis é a espécie deste gênero mais frequentemente isolada de humanos, particularmente de infecções de trato urinário e feridas (WINN, Jr et al., 2006). Neste trabalho, foi utilizado *P. mirabilis* ATCC 25933 (FIGURA 4C) que causou a morte, em média, de 2 exemplares de *C. elegans* por experimento. O período para início das mortes variou entre 1 a 4 dias.

Shigella também são causas de diarreia em humanos (WINN Jr et al., 2006). Quando *S. sonnei* foi utilizada como alimento de *C. elegans* foi observada a morte de 4 nematódeos por ensaio (FIGURA 4D), e as mortes se iniciaram entre o 2° e 3° dias de teste.

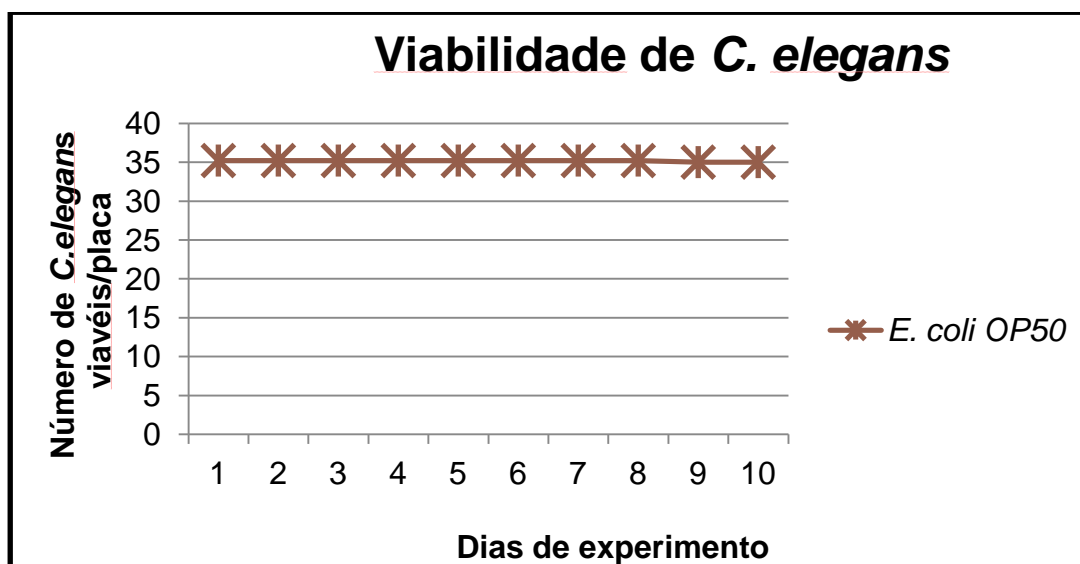
FIGURA 4 - VIABILIDADE DE *C. elegans* ALIMENTADOS COM ENTEROBACTÉRIAS

FONTE: O Autor (2017)

5.3 ENSAIO DE VIRULÊNCIA EM MEIO NGM CONTENDO FUDR

As mesmas bactérias utilizadas como alimento para *C. elegans* em meio NGM também foram testadas em NGM adicionado de 30 μ M de FUDR. O número de exemplares do nematódeo (aproximadamente 30 a 60) em cada ensaio foi superior ao utilizado na ausência de FUDR. Adicionalmente foram analisados isolados de *Salmonella* sorotipos Enteritidis ou Typhimurium, *Shigella flexneri*, e as bactérias gram-positivas *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*. Novamente *E. coli* OP50 foi utilizada com controle (GRÁFICO 2).

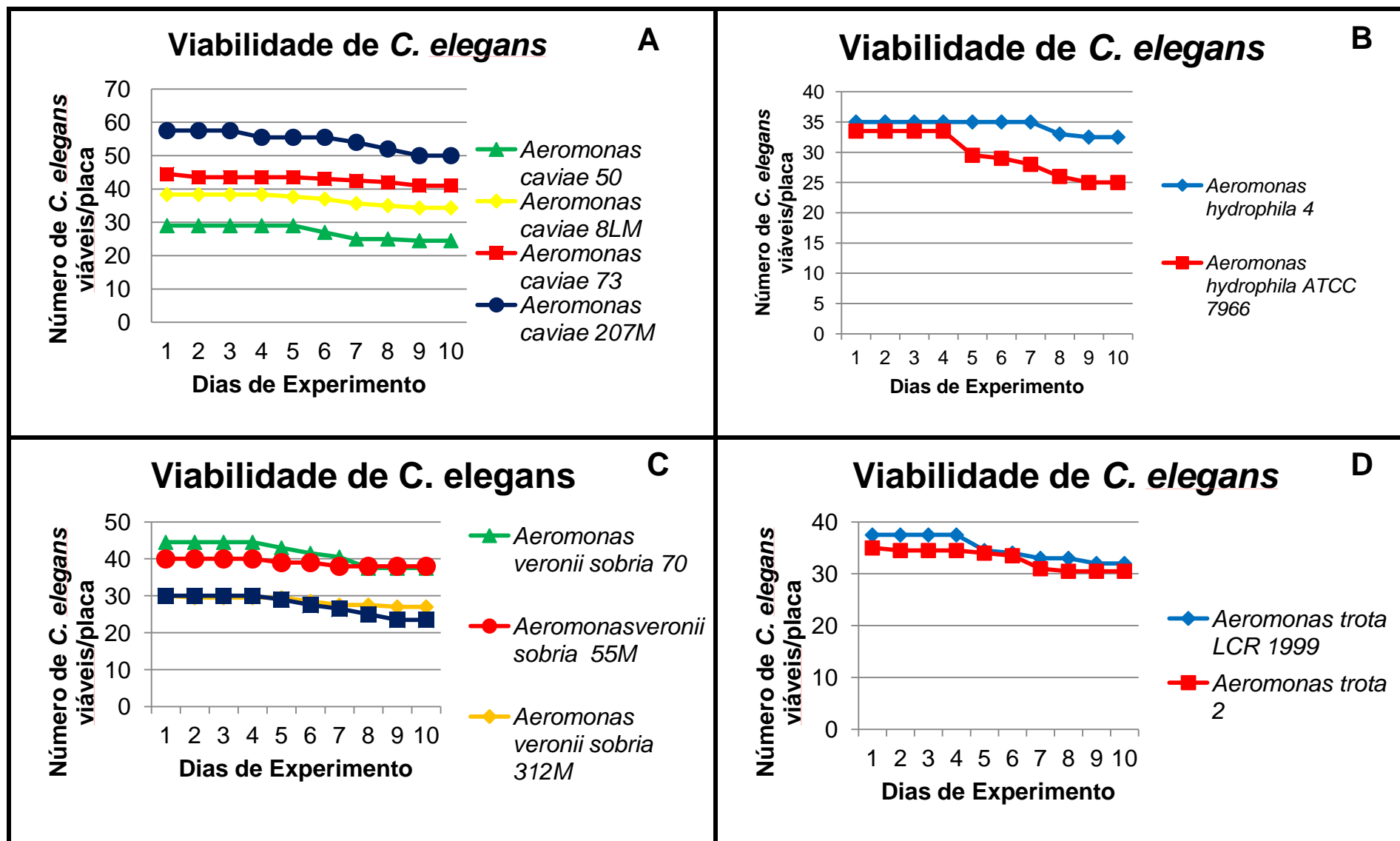
GRÁFICO 2 - VIABILIDADE DE *C. elegans* FRENTE A *E. coli* OP50 EM PRESENÇA DE FUDR.



FONTE: O Autor (2017)

Como indica o gráfico 2, nos experimentos com FUDR a viabilidade de *C. elegans* frente a *E. coli* OP50 se manteve praticamente inalterada nos 10 dias de experimento; e no total, foi observado a morte de 1 exemplar de *C. elegans* entre 141 (0,71%) testados, inferior ao observado para as demais bactérias analisadas.

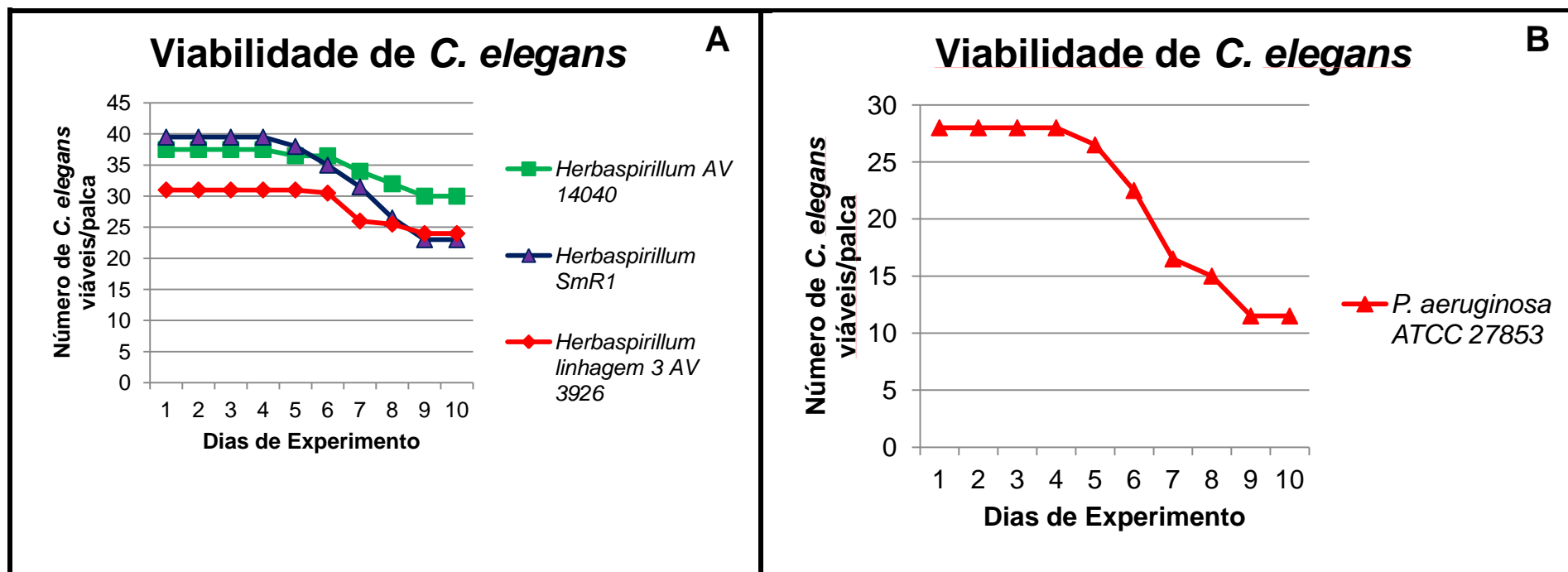
Como esperado todas as espécies de *Aeromonas* foram capazes de provocar a morte de *C. elegans* (FIGURA 5A-D). No entanto, em geral, o tempo requerido para causar a morte de *C. elegans* foi maior, e proporcionalmente o número de mortos é aparentemente menor que na ausência de FUDR.

FIGURA 5 - VIABILIDADE DE *C. elegans* ALIMENTADO COM *Aeromonas* EM PRESENÇA DE FUDR.

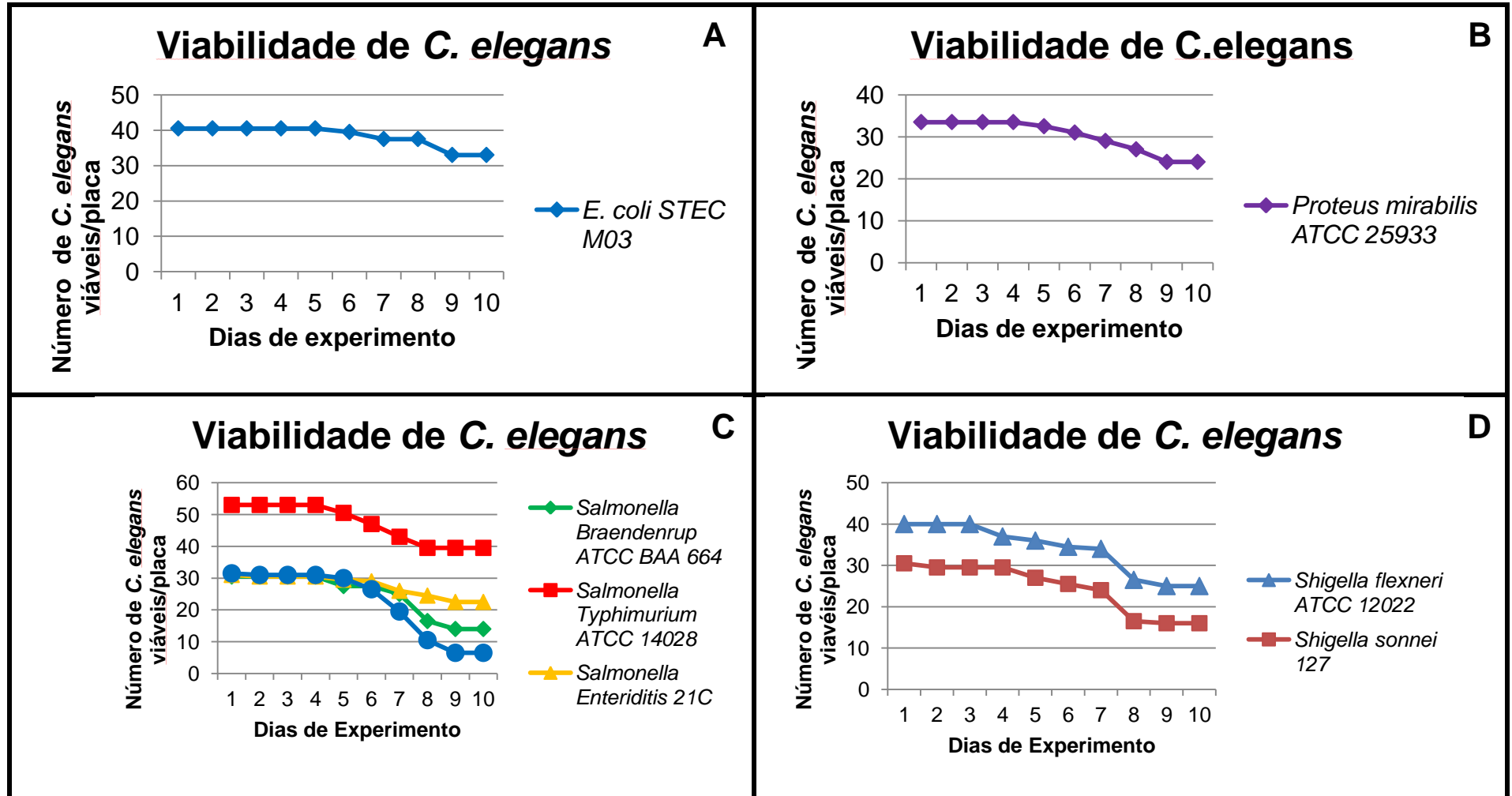
FONTE: O Autor (2017)

Os resultados obtidos com *Herbaspirillum* e *P. aeruginosa* estão mostrados na figura 6. Todas as bactérias afetaram a viabilidade de *C.elegans*, mas em diferentes proporções.

Em relação às enterobactérias, além de *E. coli* M03, *P. mirabilis*, *Shigella sonnei* 127 e *Salmonella* Braenderup, foram testadas *Shigella flexneri* e *Salmonella* sorotipos Typhimurium (2 estirpes) e Enteritidis. Os resultados estão indicados na figura 7. Deste grupo *Salmonella* sorotipo Typhimurium 59C foi a bactéria que apresentou maior habilidade em causar morte dos nematódeos.

FIGURA 6 - VIABILIDADE DE *C. elegans* EM PRESENÇA DO GÊNERO *Herbaspirillum*. E *Pseudomonas aeruginosa*.

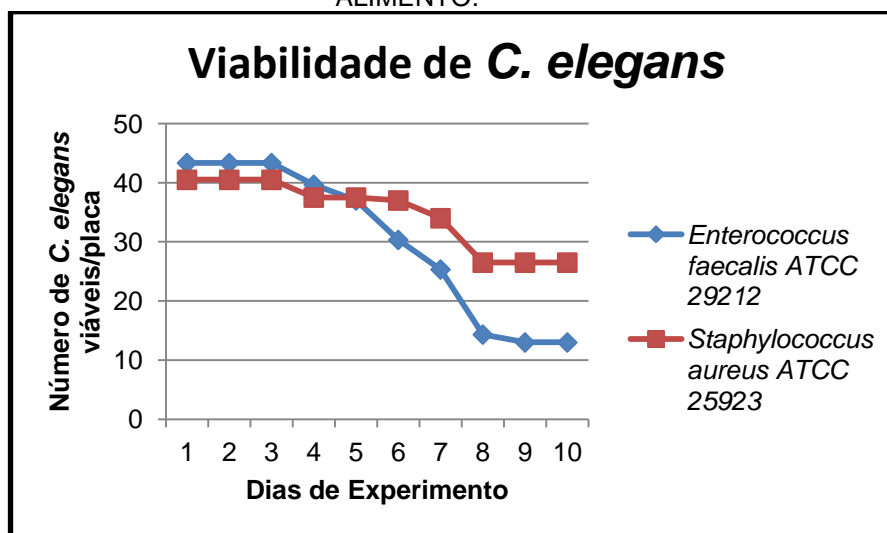
FONTE: O Autor (2017)

FIGURA 7 - VIABILIDADE DE *C. elegans* ALIMENTADO COM ENTEROBACTÉRIAS EM PRESENÇA DE FUDR

FONTE: O Autor (2017)

Os resultados obtidos com *E. faecalis* ATCC 29212 e *S. aureus* ATCC 25923 estão indicados na Figura 8. Ambas as bactérias demonstraram ser virulentas para o nematódeo. *E. faecalis* parece ser mais virulento, nos experimentos realizados causou a morte de 91 de 130 nematódeos testados (70%), ao passo que para *S. aureus* o número de mortes foi 28 de 81 dos exemplares (34,5%).

FIGURA 8 - TESTES DE VIABILIDADE DE *C. elegans* UTILIZANDO *S. aureus* OU *E. faecalis* COMO ALIMENTO.



FONTE: O Autor (2017)

5.4 COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS NOS DOIS MÉTODOS

Os resultados obtidos em ambas as metodologias foram compilados e estão indicados na Tabela 2, juntamente com resultados da análise estatística utilizada para comparar o número de *C. elegans* mortos por cada bactéria na presença ou ausência de FUDR.

TABELA 2 - COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS NOS 2 MÉTODOS

Bactéria	Meio NGM		Meio NGM + FUDR		Valor de P
	Número de mortos (média±desvio padrão)	Tempo (dias)	Número de mortos (média±desvio padrão)	Tempo (dias)	
<i>A.caviae</i> 8LM	16/16 (8 ± 0)	3/2	11/115 (3,6 ± 2,1)	7/5/5	<0,001 [#]
<i>A.caviae</i> 73	12/29 (4 ± 3)	4/2/3	7/79 (3,5 ± 2,1)	6/2	<0,001
<i>A.caviae</i> 207M	16/18 (8 ± 0)	2/1	15/115 (7,5 ± 2,1)	4/7	<0,001*
<i>A.caviae</i> 50	15/29 (5 ± 2)	3/3/3	9/58 (4,5 ± 6,3)	6	<0,001
<i>A.hydrophila</i> 4	16/30 (5,3 ± 2,5)	5/3/2	5/70 (2,5 ± 0,7)	8/8	<0,001
<i>A.hydrophila</i> ATCC 7966	6/30 (2 ± 0)	4/2/2	17/67 (8,5 ± 2,1)	5/5	0,565
<i>A.trota</i> 2	8/20 (4 ± 4,2)	1/7	9/70 (4,5 ± 3,5)	2/5	0,006
<i>A.trota</i> LCR1999	6/20 (3 ± 0)	9/2	11/75 (5,5 ± 3,5)	5/7	0,111
<i>A.veronii</i> sobria 312M	20/28 (7,3 ± 1,1)	1/2/2	6/60 (3 ± 0)	6/2	<0,001
<i>A.veronii</i> sobria 70	11/20 (5,5 ± 2,1)	2/4	13/89 (6,5 ± 0,7)	5/5	<0,001
<i>A.veronii</i> sobria 37	6/20 (3 ± 0)	4/2	12/60 (6 ± 0)	5/5	0,354
<i>A.veronii</i> sobria 55M	4/19 (2 ± 2,8)	2	4/60 (2 ± 0)	4/7	0,07
<i>Herbaspirillum</i> AV 3926	6/18 (3 ± 0)	4/4	24/62 (12 ± 11,3)	6/7	0,678
<i>H. seropedicae</i> AV 14040	9/29 (3 ± 1)	2/4/1	11/75 (5,5 ± 0,7)	5/7	0,057
<i>H. seropedicae</i> SmR1	7/20 (3,5 ± 0,7)	3/2	33/79 (16,5 ± 4,9)	5/5	0,581
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	8/19 (4 ± 1,4)	1/2	21/56 (10,5 ± 13,4)	5/5	0,722
<i>E.coli</i> M03	7/20 (3,5 ± 0,7)	8/2	15/81 (7,5 ± 7,7)	7/6	0,110
<i>Salmonella</i> ATCC 664	16/30 (5,3 ± 2,5)	2/5/4	33/61 (21 ± 6,3)	5/5	0,945
<i>P. mirabilis</i> ATCC 25933	4/18 (2 ± 1,4)	1/4	19/67 (9,5 ± 0,7)	6/5	0,603
<i>Shigella sonnei</i>	8/20 (4±0)	2/3	29/61 (14,5 ± 4,9)	2/5	0,557

Número de mortos – indica o número total de mortos/número total de exemplares de *C. elegans* testados; Tempo – indica o número de dias para o aparecimento do (s) primeiro(s) *C. elegans* morto (s) em cada experimento independente; valor de P do teste de Qui-quadrado, [#] indica a utilização do Qui-quadrado com correção de Yates, *indica a utilização do teste exato de Fisher 2 tailed.

FONTE: O Autor (2017).

Para 12 das 20 bactérias utilizadas neste trabalho não houve diferença estatisticamente significativa nos resultados obtidos através das duas metodologias. No entanto, para 8 das bactérias os resultados dos 2 métodos diferem, e todas pertencem ao gênero *Aeromonas*.

6 DISCUSSÃO

O nematódeo *C. elegans* vem sendo utilizado no estudo de diversas doenças humanas, e também na compreensão das interações patógeno-hospedeiro e da virulência bacteriana (KOMURA et al., 2010). Os primeiros ensaios de virulência bacteriana utilizando o nematódeo como modelo de hospedeiro foram realizados com *P. aeruginosa* (TAN e AUSUBEL, 2000), e posteriormente diversas outras bactérias foram estudadas (COUILLAULT e EWBank, 2002; ALEGADO et al., 2003; SIFRI et al., 2005; CHEN et al., 2014). Nestes trabalhos diferentes metodologias foram empregadas. Aqui comparamos o método clássico utilizando o meio NGM e a transferência diária dos nematódeos para placas com meio e alimento frescos, com o método realizado em NGM contendo FUDR. Nesta condição *C. elegans*, estéril devido á presença do reagente, não é transferido e sim mantido no mesmo meio contendo um concentrado de bactérias cuja duplicação também é inibida pelo FUDR (COUILLAULT e EWBank, 2002) até o final do experimento.

6.1 ENSAIOS REALIZADOS EM MEIO NGM

Com esta metodologia foram avaliadas 12 bactérias do gênero *Aeromonas* das quais 4 pertencentes à espécie *A. caviae*, 2 *A. hydrophila*, 4 *A. veronii* sobria e 2 *A. trota*; 3 bactérias do gênero *Herbaspirillum*, 1 *P. aeruginosa* e 4 enterobactérias: *Salmonella* sorotipo Braenderup, *Shigella sonnei*, *E. coli* produtora de toxina Shiga e *Proteus mirabilis*.

Os resultados (FIGURA 2A – D e TABELA 2) mostram que todas as bactérias do gênero *Aeromonas* reduziram a viabilidade de *C. elegans*, e a taxa de morte variou de 20% para *A. hydrophila* ATCC 7966 a 100% com *A. caviae* 8LM.

Aeromonas compreendem vários patógenos importantes causadores de uma variedade de infecções em humanos variando de diarreia, quadro que ocorre mais frequentemente, a pneumonia e sepse; as duas últimas principalmente em pacientes imunocomprometidos (JANDA e ABBOTT, 2010).

Dentre as espécies que compõem o gênero *Aeromonas*, *A. hydrophila*, *A. media*, *A. caviae*, *A. veronii*, *A. schubertii*, *A. jandaei*, *A. trota*, *A. bestiarum*, e *A. popoffii* são consideradas de importância clínica. No entanto, as espécies *A. hydrophila*, *A. caviae* e *A. veronii*, são responsáveis por cerca de 85% das doenças

ocasionadas por bactérias deste gênero (VILA et al., 2003; JANDA e ABBOTT, 2010).

A virulência de *Aeromonas* é multifatorial, e estas bactérias são capazes de produzir uma variedade de fatores de virulência, entre os quais podemos citar diversas adesinas; uma variedade de toxinas incluindo hemolisinas, enterotoxinas e citotoxinas; enzimas extracelulares incluindo proteases, fosfolipases e lipase, entre outros. Mas a distribuição dessas características entre as estirpes é heterogênea (JANDA e ABBOTT, 2010; GRIM et al., 2014)

A. hydrophila ATCC 7966 foi originalmente isolada de uma lata de leite com odor de peixe (SESHADRI et al., 2006), ao passo que as demais *Aeromonas* estudadas são isolados clínicos (TABELA 1). Vários estudos foram realizados com bactérias deste gênero. Os resultados de Couillault e Ewbank (2002) indicaram que com as estirpes de *A. hydrophila* analisadas a taxa de sobrevivência de *C. elegans* foi próxima da observada com o nematódeo alimentado com *E. coli* OP50, mas esta espécie é considerada como patogênica para *C. elegans* (EWBANK, 2002; ALEGADO, 2003). Outros estudos realizados utilizando metodologias distintas, e incluindo outras espécies de *Aeromonas* e/ou estirpes de *A. hydrophila* também indicam que essas bactérias são virulentas para *C. elegans*, mas em diferentes níveis (CHEN et al., 2014; MOSSER et al., 2015).

Mosser e colaboradores (2015) avaliaram várias bactérias do gênero *Aeromonas*, entre elas, as espécies *A. caviae*, *A. hydrophila*, *A. dhakensis* e *A. veronii*. Concluíram que uma baixa porcentagem de isolados de *Aeromonas* recuperadas de infecções humanas foram altamente virulentas quando testadas individualmente. Porém, em geral, as estirpes estudadas por Mosser e colaboradores (2015) foram capazes de matar os nematódeos em um período menor, entre o 5º e o 7º dia de experimento, enquanto no presente trabalho a redução mais intensa no número de *C. elegans* foi observada entre o 8º ao 10º dia dos experimentos. Essa diferença pode ser devida ao fato de que se trata de estirpes diferentes.

As bactérias analisadas neste trabalho foram previamente caracterizadas quanto a virulência através de estudos de citotoxicidade em linhagem celular HRT-18, e a presença de genes de virulência (WOLF, 2011), considerando a presença ou não dos sistemas de secreção tipo 3 (SST3), tipo 6 (SST6) e das enzimas extracelulares lipase e elastase; toxinas AerA, Act, Alt, Ast, HlyA. Porém não foi

possível correlacionar a presença de tais fatores de virulência com os resultados obtidos nos ensaios com os nematódeos, pois elastase e lipase, assim como várias toxinas estão amplamente distribuídas entre as bactérias. A presença de fatores como T6SS, presente na estirpe 8LM que causou a morte de todos os nematódeos, e na estirpe 55M que provocou a morte de somente 25% dos nematódeos. E *A. hydrophila* ATCC 7966 que apresenta todos os fatores exceto o SST3, apresentou um efeito discreto sobre a viabilidade de *C. elegans* (FIGURA 2B, TABELA 2).

Em relação a citotoxicidade em células HRT-18, 7 das bactérias do gênero *Aeromonas* estudadas em ambos trabalhos, tiveram resultados diferentes nos dois sistemas (*C. elegans* e células HRT-18).

Em estudo de virulência bacteriana com *P. aeruginosa* utilizando *C. elegans* como modelo, Tan e colaboradores (1999) concluíram que a morte do nematódeo pode ocorrer de duas maneiras, através de toxinas liberadas pelas bactérias, sendo que isto ocorre entre 4 – 24 horas de experimento, em condições de alta concentração de sal; ou devido a um processo infeccioso resultante da colonização no trato intestinal, e isto ocorre geralmente entre a partir do 2º dia de exposição da bactéria, e em baixo sal. No presente estudo a morte dos nematódeos ocorre na maioria das vezes a partir do segundo dia de experimento (FIGURA 2; TABELA 2) sugerindo um processo infeccioso.

Herbapirillum são bactérias gram negativas, não fermentadores de glucose que são encontradas no meio ambiente. O maior interesse dessas bactérias é na área agrícola, já que algumas espécies deste gênero conseguem fixar o nitrogênio e são endofíticas de algumas plantas de interesse comercial. Na área clínica *Herbaspirillum* raramente é citada como causador de doença em humanos, e há poucos estudos em relação a virulência deste grupo de bactérias. Marques et al., (2015) estudaram 3 estirpes do gênero *Herbaspirillum*, *H. seropedicae* SmR1 e AV 14040 e a linhagem 3 AV 3926 também utilizadas no presente trabalho.

Marques et al., (2015) verificaram que essas bactérias foram capazes de aderir a células Vero, e os efeitos citotóxicos foram discretos dando suporte ao fato de que essas bactérias são oportunistas com baixo grau de virulência. Nos ensaios com *C. elegans*, as mesmas bactérias foram capazes de reduzir a viabilidade dos mesmos mas em baixa proporção, cerca de 35% (TABELA 2) em 10 dias, o que está de acordo com os resultados de Marques e colaboradores (2015), sugerindo baixa virulência.

Pseudomonas são bactérias gram-negativas não fermentadoras da glucose e podem habitar diversos ambientes, terrestre ou aquático, possuindo uma fisiologia e metabolismo variado, permitindo sua sobrevivência nos vários ambientes. São considerados patógenos oportunistas de humanos, animais e plantas (PALLERONI, 1992; FICK e ROBERT, 1992).

A espécie *P. aeruginosa* é a principal causadora de doenças em humanos, podendo ocasionar infecções da pele, até sepse fulminante. A bactéria pode apresentar diversos mecanismos de virulência, incluindo a produção de toxinas e a capacidade de formação de biofilme, entre outros fatores (SADER et al., 1993; MURRAY, 1995; PALLERONI, 1998; FERREIRA et al., 2005).

Neste trabalho foi utilizada a estirpe de *P. aeruginosa* ATCC 27853. A bactéria foi capaz de reduzir a viabilidade dos nematódeos em 42%. Tan e colaboradores (1999) foram os primeiros a estudarem o nematódeo *C. elegans* como um possível hospedeiro para avaliar a virulência bacteriana. No seu trabalho, avaliaram a bactéria *P. aeruginosa* PA14, que causou a morte de 100% dos nematódeos, utilizando dois mecanismos distintos: a produção de toxinas, que causa morte rápida, e um processo infeccioso que envolve o acúmulo da bactéria no intestino do nematódeo e requer 2 ou mais dias para a morte de *C. elegans*. Considerando o tempo requerido para o início das mortes (FIGURA 3B), a estirpe aqui utilizada provocou um processo infeccioso em *C. elegans*.

O gênero *Proteus* corresponde a um grupo de bactérias Gram-negativas, pertencente à família das *Enterobacteriaceae*, e que faz parte da microbiota do sistema gastrointestinal humano (MURRAY et al., 2003). Dentre as espécies que compoem este grupo, *P. mirabilis* é o mais frequentemente isolado de amostras clínicas humanas, sendo capaz de ocasionar infecções do trato urinário como cistite e infecções de feridas (WINN Jr et al., 2006; SCHAFFER e PEARON, 2015).

A estirpe de *P. mirabilis* ATCC 25933 testada neste trabalho não demonstrou elevada virulência, causando a morte de somente 22% dos nematódeos. JebraMercy e colaboradores (2013) estudaram o sistema imunológico inato de *C. elegans* com a bactéria *P. mirabilis*. Em seu trabalho, puderam observar que em *C. elegans* estirpe N2 não houve alteração da viabilidade quando alimentado com *P. mirabilis* dentro de 10 dias de experimento.

Salmonella é uma enterobactéria que pode ocasionar infecções em humanos, como febre tifóide e gastroenterite. Este gênero contém duas espécies, *S.*

enterica e *S. bongori*. A primeira contém aproximadamente 2500 sorotipos, dos quais *S. enterica* sorotipos Enteritidis e Typhimurium são atualmente os agentes mais comuns de gastroenterites em humanos. Já *S. enterica* sorotipo Typhi é causa da febre tifóide, pouco comum atualmente (TRABULSI, 2008).

Neste trabalho foi avaliado o efeito de *Salmonella* Braenderup ATCC BAA 664 sobre a viabilidade de *C. elegans*. A bactéria reduziu em 55% o número de nematódeos a partir do 2º dia de experimento. Sem e Rhen (2012) estudaram a virulência de *S. Typhimurium* e observaram que os nematódeos alimentados com a bactéria apresentaram uma redução na sua viabilidade desde o segundo dia de experimento, sendo que no 10º dia não havia nenhum *C. elegans* viável. Ambos os trabalhos indicam que *Salmonella* é virulenta para *C. elegans*, no entanto sugere que há diferenças no grau de virulência entre os sorotipos.

E. coli é um anaeróbio facultativo colonizador na microbiota da mucosa gastrointestinal de humanos, sendo considerado não patogênico para os seus hospedeiros. Porém algumas estirpes desenvolveram a capacidade de causar infecções em humanos, como as *E. coli* produtoras de toxinas Shiga (STEC) que podem provocar diarreia não complicada, colite hemorrágica e síndrome urêmica hemolítica (NATARO; KAPER, 1998, WEINTRAUB, 2007, PITOUT, 2012). O isolado de *E. coli* M03 utilizado neste trabalho é uma STEC, e causou a morte de 35% dos nematódeos (FIGURA 4). Um estudo realizado com a STEC O157:H7 mostrou que a bactéria foi capaz de causar a morte de todos os nematódeos no período de 15 dias, e cerca de 90% deles em 10 dias (CHOU, et al, 2013). Portanto, os resultados sugerem que as STEC variam em relação à virulência, e que o isolado MO3 é pouco virulento.

O gênero *Shigella* é formado por bactérias gram-negativas, pertencentes à família Enterobacteriaceae e estão associadas mais frequentemente com diarreia e disenteria (WINN Jr. et al., 2006; THE, et al, 2016). Atualmente este grupo de bactérias é dividido em subgrupos, conforme a sorologia e seus antígenos específicos. São eles: *S. dysenteriae* (subgrupo A) tem 15 sorotipos; *S. flexneri* (subgrupo B) possui 19 sorotipos e subsorotipos; *S. boydii* (subgrupo C) tem 20 sorotipos; e *S. sonnei* (subgrupo D) consiste um único sorotipo (THE et al., 2016).

A bactéria *S. sonnei* 127 apresentou baixo grau de virulência para *C. elegans* (FIGURA 4; TABELA 2), causando a morte de 40% dos nematódeos. Não foram encontrados estudos com *S. sonnei* e *C. elegans*. No entanto, os resultados

obtidos no presente trabalho com esta bactéria foram similares aqueles reportados por George e colaboradores (2014) para *S. flexneri*, que causou redução de 30 a 40% dos nematódeos viáveis. Estes dados sugerem que as 3 espécies de *Shigella* apresentam comportamentos homogêneos em relação à virulência em *C. elegans*.

6.2 ENSAIOS REALIZADOS EM MEIO NGM CONTENDO 30 μ M DE FUDR

Inicialmente os testes com FUDR foram realizados na concentração final de 0,1 mg/mL (HE, 2011). Nesta condição não houve alteração no comportamento do *C. elegans* em relação a motilidade. No entanto, não ocorreu morte de nenhum exemplar em até 15 dias de observação, sugerindo que a concentrado estaria afetando a viabilidade dos *C. elegans*. Por essa razão as concentrações de FUDR foram reduzidas, seguindo a concentração sugerida em Gandhi e colaboradores (1980).

Todas as bactérias testadas foram capazes de causar morte de *C. elegans* em a presença de FUDR (FIGURAS 5 A 8; TABELA 2). Para as bactérias testadas apenas em presença de FUDR, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium e *Shigella flexneri* causaram morte do nematódeo a partir de 4 ou 5 dias. *S. flexneri* causou a morte de 15/40 (37,5%) dos nematódeos em 10 dias, o que sugere baixa virulência. George et al. (2014) analisaram a queda na viabilidade de *C. elegans* frente a duas estirpes de *Shigella*, uma estirpe virulenta (SFL1520) e outra avirulenta (SFL1223) utilizando meio líquido na ausência de FUDR. Verificaram que o tempo de morte (TD₅₀), tempo para matar 50% da população inicial de nematódeos, foi de 46 \pm 1 horas para a estirpe virulenta, enquanto a bactéria avirulenta causou aproximadamente 20% de mortos no mesmo período, similar ao resultado obtido com *E. coli* OP50 (GEORGE et al., 2014).

E. faecalis pertence ao gênero *Enterococcus*, formado por cocos gram-positivos, anaeróbios facultativos, que crescem a uma temperatura de 10-45°C. Dentre as espécies pertencentes à este gênero, as mais frequentemente associadas com infecções em humanos são *E. faecium* e *E. faecalis*, sendo esta última responsável por cerca de 80% das infecções causadas por bactérias deste gênero em humanos (MURRAY, 1997). A partir dos anos 70 e 80, essas bactérias se estabeleceram entre os principais patógenos nosocomiais (JETT et al., 1994).

Estas bactérias podem fazer parte da nossa microbiota, e podem ser encontradas, por exemplo, no trato intestinal, uretra, vagina, entre outros sítios anatômicos. Podem causar endocardite, infecções de feridas, infecções no trato urinário (HARBARTH *et al.*, 2002). Podem expressar fatores de virulência, que facilitam a sua ação no processo infeccioso, como a formação de biofilme, permitindo a sua colonização em diversas superfícies, além de se proteger da fagocitose. Além da presença de adesinas, que facilitam a adesão às células do hospedeiro, e também podem produzir toxinas extracelulares, como por exemplo, citolisina, que ocasiona lesão tecidual no hospedeiro (JETT *et al.*, 1994; HARBARTH *et al.*, 2002).

A virulência de *E. faecalis* utilizando *C. elegans* como modelo foi previamente determinada (EWBANK, 2002). No ensaio em presença de FUDR, *E. faecalis* ATCC 29212 foi a segunda bactéria que causou o maior número de mortes (70%) em *C. elegans* (FIGURA 8), perdendo apenas para *Salmonella* Typhimurium 59C que causou morte de 79% dos exemplares.

S. aureus, do gênero *Staphylococcus* que é formado por cocos gram positivos, imóveis, encontrados em diversos habitats. As bactérias podem se encontrar isoladas, ou em agrupamentos irregulares. Este gênero é composto por 33 espécies, sendo que 17 são isoladas de amostras clínicas de humanos. Estas bactérias fazem parte da nossa microbiota, encontradas na pele e nas fossas nasais de pessoas saudáveis. *S. aureus* pode causar diversas infecções, tais como furúnculos, pneumonia, meningite, septicemia, entre outras enfermidades (KONEMAN *et al.*, 2001; CASSETTARI *et al.*, 2005; CAVALCANTI *et al.*, 2005).

Já era sabido que *S. aureus* é capaz de infectar *C. elegans* (EWBANK *et al.*, 2002; ALEGADO *et al.*, 2003), no presente estudo a estirpe ATCC 7966 causou morte de 28/81 (34,5%) exemplares de *C. elegans*. Garsin e colaboradores (2001) estudaram a interação patógeno-hospedeiro, entre *C. elegans* e algumas bactérias gram-positivas, dentre elas *E. faecalis* e *S. aureus* (isolado clínico), ambas as espécies foram consideradas as mais virulentas naquele trabalho, no qual 50% dos nematódeos testados morreram entre o 2 e 4^o dia. E observaram que *E. faecalis* é capaz de colonizar o intestino de *C. elegans*, resultando numa infecção persistente.

6.3 COMPARAÇÃO DOS ENSAIOS REALIZADOS EM MEIO NGM E NGM CONTENDO FUDR

Por meio do ensaio em presença de FUDR foi possível confirmar os resultados obtidos no meio NGM para a maioria das bactérias testadas, uma vez que não houve diferença significativa ($P > 0,05$) na queda da viabilidade de *C. elegans* nas duas situações (TABELA 2).

No entanto, além da presença de FUDR há outra diferença entre os ensaios. No meio NGM os nematódeos são transferidos diariamente para placas contendo novo meio NGM ao qual se adiciona cultura bacteriana preparada no mesmo dia, enquanto que no experimento com FUDR isso não ocorre, ou seja, não há transferência dos nematódeos, estes são mantidos na mesma placa e alimentados com um concentrado de bactérias adicionado ao meio 24 horas antes de *C. elegans*. No concentrado estão presentes bactérias cuja duplicação está inibida pelo efeito do FUDR (COUILLAULLT e EWBank, 2002).

Resultados preliminares de Couillault e Ewbank (2002) sugerem que a utilização do FUDR, que bloqueia a síntese de DNA e evita a duplicação bacteriana, elimina a redução observada na taxa de sobrevivência de *C. elegans* testado com bactérias mantidas na ausência daquele composto. Os resultados obtidos com FUDR foram similares àqueles em que bactérias mortas pelo calor foram usadas e próximos dos de *E. coli* OP50, implicando que a redução na taxa de viabilidade requer bactérias vivas (COUILLAULLT e EWBank, 2002).

No presente estudo não foi observada diferença na viabilidade de *C. elegans* entre os ensaios realizados na ausência ou presença de FUDR para 12 das 20 bactérias testadas (TABELA 2). E a taxa de morte de *C. elegans* com todas as bactérias em presença de FUDR, foi superior à observada com *E. coli* OP50 (1/141 exemplares, 0,7%). Portanto os resultados do presente estudo diferem dos resultados preliminares de Couillault e Ewbank (2002).

É possível que isso seja devido à diferentes condições de teste. Neste estudo foi utilizado um concentrado bacteriano, e é possível que lá coexistam além das células incapazes de se multiplicar pelo efeito do FUDR, outras não viáveis e ainda uma parcela que mantenha a capacidade de se multiplicar.

Aitlhadj e Stürzenbaum (2010) testaram o efeito do 5-fluoro-2'-deoxiuridina em *C. elegans* estirpe N2 e mutante *tub-1* em relação ao prolongamento da longevidade

do nematódeo. Observaram que o mutante *tub-1* foi o único a ter uma longevidade maior, sendo que este efeito não ocorreu na estirpe N2.

Portanto, o efeito observado para várias das bactérias testadas no presente trabalho, para as quais houve maior demora para causar a morte de *C. elegans*, não poderia ser atribuído ao FUDR. Como os resultados sugerem (FIGURAS 2-8; TABELA 2), o processo de morte de *C. elegans* por estas bactérias parece ser via infecciosa, uma vez que em geral são requeridos dois ou mais dias para o início do processo (TAN et al., 1999). Dessa forma, poderia se especular que restaria, no concentrado bacteriano, número reduzido de células capazes de se multiplicar. Isto representaria um inóculo menor, com conseqüente demora no início do processo de infecção e morte em *C. elegans*.

No entanto, para as bactérias do gênero *Aeromonas* incluindo todos os isolados de *A. caviae*, *A. hydrophila* 4, *A. trota* 2 e *A. veronii* sobria 70 e 312M (TABELA 2), foi observada diferença nos resultados obtidos nos dois ensaios ($P < 0,006$ para *A. trota* 2 e $P < 0,001$ para as demais). Foi observada queda intensa no número de nematódeos mortos em presença de FUDR, indicando que processo de morte de *C. elegans* requer células bacterianas capazes de se reproduzirem. Mas, mesmo em presença de FUDR, a queda na viabilidade de *C. elegans* alimentados com *Aeromonas* foi superior à observada com *E. coli* OP50. O comportamento das bactérias testadas em presença de FUDR, e respectivo efeito sobre a viabilidade de *C. elegans*, deve ser melhor estudado buscando identificar os mecanismos envolvidos, e também utilizando concentrações diferentes de FUDR.

7 CONCLUSÃO

Ensaio de viabilidade realizados com a bactéria controle, *E. coli* OP50, mostraram que *C. elegans* permaneceu viável por um período de 10 dias, tempo que foi definido para a duração dos experimentos.

Exceto *E. coli* OP50, todas as outras bactérias analisadas mostraram virulência frente a *C. elegans* causando, nos ensaios realizados em meio NGM, redução de viabilidade variando de 20 a 100%.

A maioria das bactérias testadas (13/20) foi pouco virulenta, causando a morte de menos de 50% dos nematódeos no período de 10 dias. Apenas 07 bactérias - *A. caviae* 50, 8LM, 207M; *A. hydrophila* 4; *A. veronii* sobria 70 e 312M e *Salmonella* sorotipo Braenderup ATCC BAA664 – apresentaram maior grau de virulência, causando a morte de mais de 50% dos nematódeos; o tempo para isso variou de 3,5 a 9,5 dias em média.

Nos ensaios realizados em meio NGM contendo FUDR a redução de *C. elegans* viáveis variou de 7 a 54% para as 20 bactérias também testadas em NGM; e entre 27% a 79% para *E. faecalis*, *S. aureus*, *Shigella flexneri* e *Salmonella* sorotipos Enteritidis ou Typhimurium, testadas apenas em presença de FUDR. O tempo para surgimento de *C. elegans* mortos aparentemente foi superior ao observado na ausência de FUDR.

Nos ensaios realizados com FUDR apenas *E. faecalis*, *Salmonella* Typhimurium 59C e *Salmonella* Braenderup causaram a morte de mais de 50% da população de *C. elegans* testada, em período de, em média, 8 a 9,5 dias.

Considerando o tempo para redução da viabilidade, os resultados sugerem que as bactérias causam morte de *C. elegans* através de processo infeccioso, uma vez que dois ou mais dias são requeridos para a redução do número de nematódeos viáveis.

Em presença de FUDR não houve diferença significativa na viabilidade de *C. elegans* em relação aos testes realizados em NGM para 12 das 20 bactérias. No entanto, diferença estatisticamente significativa entre os resultados dos dois métodos foi observada nos ensaios realizados com *A. caviae* 8LM, 50, 73 e 50M; *A. hydrophila* 4; *A. trota* 2 e *A. veronii* sobria 70 e 312M.

As metodologias testadas podem fornecer resultados distintos dependendo das bactérias analisadas.

REFERÊNCIAS

- ALTWEGG, M.; GEISS, H. K.; FREIJ, B. J. *Aeromonas* as a human pathogen. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 16, n. 4, p. 253-286, 1989.
- ABALLAY, A.; YORGEY, P.; AUSUBEL, F. M. *Salmonella typhimurium* proliferates and establishes a persistent infection in the intestine of *Caenorhabditis elegans*. **Current Biology**, v. 10, n. 23, p. 1539–1542, 2000.
- ABALLAY, A.; AUSUBEL, F. M. *Caenorhabditis elegans* as a host for the study of host–pathogen interactions. **Current opinion in microbiology**, v. 5, n. 1, p. 97-101, 2002.
- AITLHADJ, L.; STÜRZENBAUM, S. R. The use of FUdR can cause prolonged longevity in mutant nematodes. **Mechanisms of ageing and development**, v. 131, n. 5, p. 364-365, 2010.
- ALEGADO, R. A. et al. Characterization of mediators of microbial virulence and innate immunity using the *Caenorhabditis elegans* host–pathogen model. **Cellular microbiology**, v. 5, n. 7, p. 435-444, 2003.
- BARRIÈRE, A.; FÉLIX, M. Isolation of *C.elegans* and related nematodes. Wormbook [doi/10.1895/wormbook.1.115.1, <http://www.wormbook.org>].2006.
- BRENNER, S. *Caenorhabditis elegans*. **Methods**, v.77, n.1, p.71-94, 1974.
Disponível em:
<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1213120&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.Acesso em 01 de fevereiro de 2017.
- CASSETTARI, V. C.; STRABELLI, T.; MEDEIROS, E. A. S. *Staphylococcus aureus* bacteremia: what is the impact of oxacillin resistance on mortality? **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 9, n. 1, p. 70-76, 2005.
- CAVALCANTI, S. M.M.; FRANÇA, E.R.; CABRAL, C.; VILELA, M.A.; MONTENEGRO, F.; MENEZES, D.; MEDEIROS, A.C.R. Prevalence of *Staphylococcus aureus* introduced into intensive care units of a University Hospital. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 9, n. 1, p. 56-63, 2005.
- CHEN, P. et al. Virulence diversity among bacteremic *Aeromonas* isolates: ex vivo, animal, and clinical evidences. **PloS one**, v. 9, n. 11, p. e111213, 2014.
- CHOU, T.C. et al. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 Shiga-like toxin 1 is required for full pathogenicity and activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in *Caenorhabditis elegans*. **Cellular microbiology**, v. 15, n. 1, p. 82-97, 2013.
- COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318–1322, 1999.

COUILLAULT, C.; EWBANK, J. J. Diverse bacteria are pathogens of *Caenorhabditis elegans*. **Infection and immunity**, v. 70, n. 8, p. 4705-4707, 2002.

DARBY, C.; COSMA, C.L.; THOMAS, J.H.; MANOIL, C. Lethal paralysis of *Caenorhabditis elegans* by *Pseudomonas aeruginosa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 26, p. 15202-15207, 1999.

DAVIES, S.K.; LEROI, A.M.; BUNDY, J. G. Fluorodeoxyuridine affects the identification of metabolic responses to daf-2 status in *Caenorhabditis elegans*. **Mechanisms of ageing and development**, v. 133, n. 1, p. 46-49, 2012.

DOBRINDT, U.(Patho-) genomics of *Escherichia coli*. **International journal of medical microbiology**, v. 295, n. 6, p. 357-371, 2005.

DUPONT, H. L.; HORNICK, R. B. Diarrheal Diseases. **Disease a month**, p. 40, 1969.

ENGELMANN, I.; PUJOL, N. Innate immunity in *C. elegans* In:Söderhäll K, editor. Invertebrate Immunity. Austin, TX: Landes Bioscience; p. 105-121. 2010.

ERMOLAEVA, M. A.; SCHUMACHER, B. Insights from the worm: the *C. elegans* model for innate immunity. In: **Seminars in immunology**. Academic Press, p. 303-309, 2014.

EWBANK, J. J.; ZUGASTI, O. *C. elegans*: model host and tool for antimicrobial drug discovery. **Disease models & mechanisms**, v. 4, n. 3, p. 300-304, 2011.

FERREIRA, L. L. et al. **Estrutura clonal e multirresistência em *Pseudomonas aeruginosa***. 2005. Tese de Doutorado.

GANDHI, S. et al. A simple method for maintaining large, aging populations of *Caenorhabditis elegans*. **Mechanisms of ageing and development**, v. 12, n. 2, p. 137-150, 1980.

GARSIN D.A., SIFRI C.D., MYLONAKIS E. et al. A simple modelhost for identifying Gram-positive virulence factors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n.19 p.10892–1089, 2001.

GEORGE, D. T. et al. *Shigella flexneri* Infection in *Caenorhabditis elegans*: cytopathological examination and identification of host responses. **PloS one**, v. 9, n. 9, p. e106085, 2014.

GODBALLE, T; HANSEN, K.G.; KJAERBO, R.E.R.; PETERSEN, P.D.; TIKANDER, E. C. *elegans* as a virulence model for *E. coli* strain 042. Dinamarca. 47 p. Tese. Department of Science, Systems and Models (NSM), RUC. Institut for Natur, Systemer og Modeller (NSM), RUC. 2010.

GRAHNQUIST, L.; LUNDBERG, B.; TULLUS, K. Neonatal *Proteus* meningoencephalitis. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 100, n. 7-12, p. 734-736, 1992.

GRIM, Christopher J. et al. Functional genomic characterization of virulence factors from necrotizing fasciitis-causing strains of *Aeromonas hydrophila*. **Applied and environmental microbiology**, v. 80, n. 14, p. 4162-4183, 2014.

HANCOCK, V.; FERRIÈRES, L.; KLEMM, P. Biofilm formation by asymptomatic and virulent urinary tract infectious *Escherichia coli* strains. **FEMS Microbiology Letters**, v. 267, n. 1, p. 30–37, 2007.

HARBARTH, S.; COSGROVE, S.; CARMELI, Y. Effects of antibiotics on nosocomial epidemiology of vancomycin-resistant *enterococcus*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 6, p. 1619-1628, 2002.

HE, F. Lifespan Assay. **Bio-Protocol**. Bio 101:e57. DOI:10.21769/BioProtoc.57. 2011.

HOSONO, R.. Sterilization and growth inhibition of *Caenorhabditiselegans* by 5-fluorodeoxyuridine. **Experimental gerontology**, v. 13, n. 5, p. 369-373, 1978.

JANDA, J. M.; ABBOTT, S. L. The genus *Aeromonas*: Taxonomy, pathogenicity, and infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 1, p. 35–73, 2010.

JETT, B. D.; HUYCKE, M. M.; GILMORE, M. S. Virulence of *enterococcus*. **Clinical microbiology reviews**, v. 7, n. 4, p. 462-478, 1994.

JOVE Science Education Database. *Essentials of Biology 1: east, Drosophila and C. elegans*. *C. elegans* Maintenance. **JoVE**, Cambridge, MA, 2017 (doi: 10.3791/5104).

JOHNSON, T. E.; WOOD, W. B. Genetic analysis of life-span in *Caenorhabditis elegans*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 79, n. 21, p. 6603–6607, 1982.

KALETTA, T.; HENGARTNER, M. O. Finding function in novel targets: *Caenorhabditis elegans* as a model organism. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 5, n. 5, p. 387–398, 2006.

KENNEY, S. J.; ANDERSON, G. L.; WILLIAMS, P. L.; MILLNER, P. D.; BEUCHAT, L. R. Persistence of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Newport, and *Salmonella* Poona in the gut of a free-living nematode, *Caenorhabditis elegans*, and transmission to progeny and uninfected nematodes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 101, n. 1-2, p. 227–236, 2005.

KESIKA, P. KARUTHA PANDIAN, S.; BALAMURUGAN, K. Analysis of *Shigella flexneri*-mediated infections in model organism *Caenorhabditiselegans*. **Scandinavian journal of infectious diseases**, v. 43, n. 4, p. 286-295, 2011.

KIM, Dennis. Studying host-pathogen interactions and innate immunity in *Caenorhabditis elegans*. **Disease Models and Mechanisms**, v. 1, n. 4-5, p. 205-208, 2008.

KOMURA, T.; YASUI, C.; MIYAMOTO, H.; NISHIKAWA, Y. *Caenorhabditis elegans* as an alternative model host for *Legionella pneumophila*, and protective effects of bifidobacterium infantis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 12, p. 4105–4108, 2010.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN JR, W.C. **Diagnóstico microbiológico**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

LAM, D. S.; KWOK, A. K.; CHEW, S. Post-keratoplasty endophthalmitis caused by. **Proteus mirabilis**, p. 139-140, 1998.

LEUNG, M. C. K.; WILLIAMS, P. L.; BENEDETTO, A.; AU, C.; KIRSTEN, J.H.; ASCHNER, M.; MEYER, J.N. *Caenorhabditis elegans*: An emerging model in biomedical and environmental toxicology. **Toxicological Sciences**, v. 106, n. 1, p. 5–28, 2008.

LEWIS, J.; FLEMING, J. T.. **Basic Culture Methods**. In: EPSTEIN, H. F; SHAKES, D.C., editor. *Caenorhabditis elegans: Modern Biological Analysis of an Organism. Methods in Cell Biology*.v.18. Elsevier Science & Technology; 1995.

MACCALLUM, W. G.; HASTINGS, T.W. A case of acute endocarditis caused by *Micrococcus zymogenes* (nov. spec.), with a description of the microorganism. **The Journal of experimental medicine**, v. 4, n. 5-6, p. 521-534, 1899.

MARQUES, A. C. Q. Caracterização fenotípica e molecular de isolados humanos e ambientais de *Herbaspirillum* spp. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2011.

MARQUES, A. C.Q.; PALUDO, K.S.; DALLAGASSA, C.B.; SUREK, M.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M.; CRUZ, L.M.; LIPUMA, J.J.; ZANATA, S.M.; REGO, F.G.M.; FADEL-PICHETH, C.M.T. Biochemical characteristics, adhesion, and cytotoxicity of environmental and clinical isolates of *Herbaspirillum* spp. **Journal of clinical microbiology**, v. 53, n. 1, p. 302-308, 2015.

MOSSER, T.; TALGRAND-REBOUL, E.; COLSTON, S.M.; GRAF, J.; FIGUERAS, M.J.; JUMAS-BILAK, E.; LAMY, B. Exposure to pairs of *Aeromonas* strains enhances virulence in the *Caenorhabditis elegans* infection model. **Frontiers in microbiology**, v. 6, 2015.

MOURA, M. D. R. S. D. A. L.; MELLO, M. J. G. DE; CALÁBRIA, W. B.; GERMANO, E.M.; MAGGI, R.R.S.; CORREIA, J.B. Frequência de *Escherichia coli* e sua sensibilidade aos antimicrobianos em menores de cinco anos hospitalizados por diarreia aguda. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, v. 12, n. 2, p. 173–182, 2012.

MULVEY, M. A. Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. **Cellular Microbiology**, v. 4, p. 257–271, 2002.

MURRAY, P.R. Laboratory Procedures for Epidemiologic Analysis. In: Manual of Clinical Microbiology 6th ed., 1995.

MURRAY, P. R. et al. In: Manual of clinical microbiology.8 th ed., 2003.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 1, p. 142–201, 1998.

OKEKE, I. N. Diarrheagenic *Escherichia coli* in sub-Saharan Africa: Status, uncertainties and necessities. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 3, n. 11, p. 817–842, 2009.

ONG, C. L. Y.; ULETT, G. C.; MABBETT, A. N.; BEATSON, S.A.; WEBB, R.I.; MONAGHAN, W.; NIMMO, G.R; LOOKE, D.F.; MCEWAN, A.G.; SCHEMBRI, M.A.. Identification of type 3 fimbriae in uropathogenic *Escherichia coli* reveals a role in biofilm formation. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 3, p. 1054–1063, 2008.

PALLERONI, N. J. *Pseudomonas* classification. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 64, n. 3-4, p. 231-251, 1992.

PARKER, J. L.; SHAW, J. G. *Aeromonas* spp. clinical microbiology and disease. **Journal of Infection**, v. 62, n. 2, p. 109–118, 2011. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2010.12.003>>.

PEDROSA, F.O.et al. Structural organization and regulation of the *nif* genes of *Herbaspirillum seropedicae*. *Soil Biol Biochem* v.29, p.843–846, 1997.

PETERSON, J.W. **Bacterial Pathogenesis**. In: BAROM, S, editor. *Medical Microbiology*.4th Edição. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Capítulo 7, páginas 1-5.

PIRES, M. C. D. S.; FROTA, K. D. S.; MARTINS, P. D. O.; CORREIA, A.F.; CORTEZ-ESCALANTE, J.J.; SILVEIRA, C.A. Prevalência e suscetibilidades bacterianas das infecções comunitárias do trato urinário, em Hospital Universitário de Brasília, no período de 2001 a 2005. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 6, p. 643–647, 2007.

PITOUT, J. D. D. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: A combination of virulence with antibiotic resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 3,p. 1–7, 2012.

SADER, H. S. et al. Epidemiologic typing of multiply drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from an outbreak in an intensive care unit. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 17, n. 1, p. 13-18, 1993.

SCHAFFER, J. N.; PEARSON, M. M. *Proteus mirabilis* and urinary tract infections. **Microbiology spectrum**, v. 3, n. 5, 2015.

SCHULENBURG, H; EWBANK, J J. Diversity and specificity in the interaction between *Caenorhabditis elegans* and the pathogen *Serratia marcescens*. **BMC evolutionary biology**, v. 4, n. 1, p. 49, 2004.

SCHULENBURG, H.; EWBANK, J.J. The genetics of pathogen avoidance in *Caenorhabditis elegans*. **Molecular microbiology**, v. 66, n. 3, p. 563-570, 2007.

SESHADRI, R. et al. Genome sequence of *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966T: jack of all trades. **Journal of bacteriology**, v. 188, n. 23, p. 8272-8282, 2006.

SEM, X.; RHEN, M. Pathogenicity of *Salmonella enterica* in *Caenorhabditis elegans* relies on disseminated oxidative stress in the infected host. **PLoS one**, v. 7, n. 9, p. e45417, 2012.

SIFRI, C. D.; BEGUN, J.; AUSUBEL, F. M. The worm has turned—microbial virulence modeled in *Caenorhabditis elegans*. **Trends in microbiology**, v. 13, n. 3, p. 119-127, 2005.

SOLIS, G. M.; PETRASCHECK, M. Measuring *Caenorhabditis elegans* life span in 96 well microtiter plates. **Journal of Visualized Experiments**, n. 49, p. e2496-e2496, 2011.

SPIPKER T. et al. Recovery of *Herbaspirillum* species from persons with cystic fibrosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.46, n.8, p.2774–2777, 2008.

STAMM, W. E.; NORRBY, S. R. Urinary tract infections: disease panorama and challenges. **The Journal of infectious diseases**, v. 183, p. S1–S4, 2001.

STIERNAGLE, T. Maintenance of *Caenorhabditis elegans*. **WormBook : the online review of C. elegans biology**, n. 1999, p. 1–11, 2006.

SULSTON, J. E.; HORVITZ, H. R. Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. **Developmental biology**, v. 56, n. 1, p. 110-156, 1977..

SUTPHIN, G. L.; KAEBERLEIN, M. Measuring *Caenorhabditis elegans* life span on solid media. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 27, p. e1152-e1152, 2009.

TAN, M. W.; RAHME, L. G.; STERNBERG, J. A; TOMPKINS, R. G.; AUSUBEL, F. M. *Pseudomonas aeruginosa* killing of *Caenorhabditis elegans* used to identify *P. aeruginosa* virulence factors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 5, p. 2408–2413, 1999.

TAN, Man-Wah; AUSUBEL, Frederick M. *Caenorhabditis elegans*: a model genetic host to study *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. **Current opinion in microbiology**, v. 3, n. 1, p. 29-34, 2000.

THE, H.C. et al. The genomic signatures of *Shigella* evolution, adaptation and geographical spread. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 4, p. 235-250, 2016.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**, 5ª edição. São Paulo: Atheneu, 2008.

VILA, J.; RUIZ, J.; GALLARDO, F.; VARGAS, M.; SOLER, L.; FIGUERAS, M.J.; GASCON, J. *Aeromonas* spp. and Traveler's Diarrhea: Clinical Features and Antimicrobial Resistance. **Emerging Infectious Diseases Journal**, v. 9, n. 5, p. 552–555, 2003.

WATERSTON, R. Genome sequence of the nematode *Caenorhabditis elegans*: a platform for investigating biology. The *C. elegans* Sequencing Consortium. **Science**, v. 282, n. 5396, p. 2012-2018, 1998

WEINTRAUB, A. Enteroaggregative *Escherichia coli*: Epidemiology, virulence and detection. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 4–8, 2007.

WINN, W.C Jr; Allen S.; Janda, W.; Koneman, E.; Procop, G., Schreckenberger, P., et al. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 6ª edição. **Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins**, 2006.

WOLF, S. **Características de virulência em estirpes de *Aeromonas* spp.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, 2012.

