

Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico Faculdade de Ciências Médicas

Renan de Souza Fructuoso da Silva

Interação de *Streptococcus agalactiae* com o nematódeo *Caenorhabditis elegans*

> Rio de Janeiro 2020

Renan de Souza Fructuoso da Silva

Interação de Streptococcus agalactiae com o nematódeo Caenorhabditis elegans

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Orientadora: Prof.ª Dra. Prescilla Emy Nagao Ferreira

Rio de Janeiro 2020

CATALOGAÇÃO NA FONTE UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

Silva, Renan de Souza Fructuoso da. Interação de <i>Streptococcus agalactiae</i> com o nematódeo <i>Caenorhabditis</i> <i>elegans</i> / Renan de Souza Fructuoso da Silva. – 2020. 87 f.
Orientadora: Prescilla Emy Nagao Ferreira. Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Programa de Pós-graduação em Microbiologia.
 Streptococcus agalactiae – Patogenicidade - Teses. 2. Caenorhabditis elegans – Microbiologia - Teses. 3. Comunicação celular – Teses. 4. Helminto – Teses. 5. Modelos animais em pesquisa - Teses. 6. Estudos de viabilidade - Teses. I. Ferreira, Prescilla Emy Nagao. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título. CDU 579.61:616-092

Bibliotecária: Kalina Silva CRB7/4377

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Renan de Souza Fructuoso da Silva

Interação de Streptococcus agalactiae com o nematódeo Caenorhabditis elegans

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Aprovada em 06 de março de 2020.

Orientadora: Prof.^a Dra. Prescilla Emy Nagao Ferreira Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Débora Leandro Rama Gomes Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro

Prof.^a Dra. Cíntia Silva dos Santos Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Dra. Pamella Silva Lannes Costa Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

> Rio de Janeiro 2020

AGRADECIMENTOS

Sou grato a minha família, aos meus amigos (Jeferson, Letícia, Phillippe, Daniel, Nicholas), e aos que conheci ao longo da pós-graduação (Felipe, Guilherme, Igor, Maria, Liliane, Thayná, Pedro), que certamente estarão comigo nas próximas etapas da minha vida.

Aos meus pais, que sempre me incentivam a estudar, independente do curso ou tempo de duração, colocando o estudo acima de qualquer outra obrigação, e por causa desse pensamento que pude me dedicar a essa pós-graduação.

Ao meu irmão, que se propôs em me ajudar a realizar meus sonhos na UERJ, não exigindo, mas sendo compreensivo e amigo desde sempre.

À minha companheira Graziela, que me ajudou e esteve ao meu lado quando os obstáculos pareciam ser difíceis demais para suportar sozinho. Obrigado por ser compreensiva e gentil, nunca vou esquecer da nossa história.

Obrigado pelo investimento da sociedade por ter me proporcionado uma Universidade Pública de qualidade.

À equipe do laboratório que sempre foram gentis e comprensivos com os desafios a mim atribuídos, e ajudaram sempre quando solicitados.

Aos colegas de graduação, que me fizeram amadurecer para estar na pós-graduação produzindo este trabalho.

Aos professores do depatarmento de Microbiologia (Cíntia, Ana Luiza), que nos momentos difíceis se mostraram presentes, sempre buscando ajudar os alunos.

Especialmente ao Prof. Rafael Hirata, que sempre fazia os alunos felizes com sua presença, não exitava em dar ideias nos experimentos, e sua gargalhada nos corredores e no laboratório enchia o departamento de vida, sempre fará falta, obrigado pela honra de tê-lo conhecido de perto, mesmo que por um breve momento.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

SILVA, Renan de Souza Fructuoso da. **Interação de** *Streptococcus agalactiae* **com o nematódeo** *Caenorhabtidis elegans*. 2020. 87 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2020.

Streptococcus agalactiae, também conhecido como estreptococos do Grupo B (EGB) é considerado a causa mais comum de infecções bacterianas em recém-nascidos e adultos imunocomprometidos, sendo classificado em dez tipos capsulares (Ia, Ib, II-IX). As razões para o aumento da incidência do S. agalactiae ainda não estão bem compreendidas. As interações hospedeiro-patógeno no intestino são fundamentais para todos os organismos superiores. Caenorhabditis elegans tem sido utilizado como modelo substituto para entender os mecanismos conservados nas interações celulares. O objetivo do presente estudo foi avaliar pela primeira vez, o potencial patogênico de diferentes isolados de S. agalactiae no modelo C. elegans. Foram realizados ensaios de interação entre os helmintos com as amostras S. agalactiae GBS90356 (isolada de líquor), GBS1428 (isolada de urina) e GBS110 (isolada de mastite subclínica bovina) em meio sólido e líquido, com a presença ou não de antimicrobiano tetraciclina. Foi usado como controle positivo a amostra Corvnebacterium ulcerans 809 e como controle negativo a amostra Escherichia coli OP50. A tetraciclina foi utilizada para inibir o crescimento da E. coli OP50 quando necessário. O experimento de sobrevivência foi realizado quantificando diariamente os vermes vivos, mortos e sumidos das placas de interação, e observando alterações comportamentais e morfológicas. O experimento para avaliar a formação de worm-star foi realizado incubando os vermes com diferentes concentrações (5x10⁶ UFC/mL, 1x10⁷ UFC/mL, 1,5x10⁷ UFC/mL, 2x10⁷ UFC/mL) de bactéria por três dias ininterruptos em poços com M9 contendo tetraciclina. A quantificação de bactérias (UFC/mL) foi realizada após maceração dos helmintos. Imagens de microscopia de fluorescência foram realizadas utilizando as amostras de S. agalactiae GBS90356-GFP e GBS1428-GFP. Os resultados mostraram que as amostras GBS90356, GBS1428 e GBS110 foram capazes de causar alterações comportamentais e morfológicas no modelo helminto e a gravidade relacionada aos casos clínicos foram correspondentes à gravidade observada em C. elegans. Nossos dados demonstraram que a viabilidade dos vermes foi menor quando interagiram com a amostra hipervirulenta GBS90356, seguido pelo isolado animal GBS110 e pela amostra GBS1428. Desta forma, nossos resultados demonstraram que a interação celular com C. elegans possibilitou o avanço no conhecimento da patogênese do S. agalactiae, se tornando um importante modelo in vivo alternativo para o estudo da infecção bacteriana.

Palavras-chave: *Streptococcus agalactiae*. *Caenorhabditis elegans*. Interação. Modelo helminto. Viabilidade.

ABSTRACT

SILVA, Renan de Souza Fructuoso da. **Interaction between** *Streptococcus agalactiae* and the nematode *Caenorhabtidis elegans*. 2020. 87 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2020.

Streptococcus agalactiae, also known as Group B Streptococci (GBS) is considered the most common cause of bacterial infections in newborns and immunocompromised adults, being classified into ten capsular types (Ia, Ib, II-IX). The reasons for the increased incidence of S. agalactiae are still not well understood. Host-pathogen interactions in the gut are critical for all higher organisms. Caenorhabditis elegans has been used as a model to understand the mechanisms conserved in cellular interactions. The objective of the present study was to evaluate, for the first time, the pathogenic potential of different isolates of S. agalactiae with C. elegans model. Interaction between helminths were performed with S. agalactiae GBS90356 (isolated from CSF), GBS1428 (isolated from urine) and GBS110 (isolated from bovine subclinical mastitis) in solid and liquid medium, with or without the presence of tetracycline antimicrobial. The Corynebacterium ulcerans 809 strain was used as a positive control and the Escherichia coli OP50 strain as a negative control. Tetracycline was used to inhibit the growth of E. coli OP50 when necessary. The survival experiment was performed by daily quantifying live, dead and missing worms from the interaction plates, and observing behavioral and morphological changes. The experiment to assess worm-star formation was carried out by incubating the worms with different concentrations $(5x10^6 \text{ UFC/mL}, 1x10^7 \text{ UFC/mL}, 1.5x10^7)$ UFC/mL, 2x10⁷ UFC/mL) of bacteria for three uninterrupted days in wells with M9 containing tetracycline. The bacteria quantification (CFU/mL) was performed after maceration of the helminths. Fluorescence microscopy images were performed using GBS90356-GFP and GBS1428-GFP strains. The results showed that GBS90356, GBS1428 and GBS110 strains were able to cause behavioral and morphological changes in the helminth model and the severity related to clinical cases corresponded to the severity observed in C. elegans. Our data demonstrated that the viability of the worms was lower when interacting with the hypervirulent GBS90356 strain, followed by the animal isolate GBS110 and the urine GBS1428 strain. In this way, our results demonstrated that the cellular interaction with C. elegans allowed the advance in the knowledge of the pathogenesis of S. agalactiae, becoming an important alternative in vivo model for the study of bacterial infection.

Keywords: Streptococcus agalactiae. Caenorhabditis elegans. Interaction. helminth model.

Viability.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 –	Fatores de virulência do S. agalactiae e seu papel na transição da	
	colonização para a doença invasiva	19
Figura 1 –	Interação do S. agalactiae com a barreira hemato-encefálica	22
Figura 2 –	Necessidades dietéticas de C. elegans e Homo sapiens	25
Figura 3 –	Ciclo de vida de <i>C. elegans</i>	27
Quadro 2 –	Comparação entre o modelo murino e nematódeo para o estudo das	
	interações patógeno-hospedeiro	31
Figura 4 –	Fontes de variabilidade no estudo de C. elegans	33
Figura 5 –	Ensaio de sobrevivência de C. elegans em meio sem tetraciclina	46
Figura 6 –	Comparação do efeito do antimicrobiano tetraciclina no experimento de	
	sobrevivência utilizando a amostra clínica C. ulcerans 809	47
Figura 7 –	Comparação do efeito do antimicrobiano tetraciclina no experimento de	
	sobrevivência utilizando a amostra clínica GBS90356	48
Figura 8 –	Comparação do efeito do antimicrobiano tetraciclina no experimento de	
	sobrevivência utilizando a amostra clínica GBS1428	48
Figura 9 –	Quantificação da amostra clínica GBS90356 no trato intestinal de C.	
	elegans	49
Figura 10 –	Quantificação da amostra clínica GBS1428 no trato intestinal de C.	
	elegans	50
Figura 11 –	Visualização da alteração de fenótipo após 120 h de interação com a amostra	
	GBS110	51
Figura 12 –	Visualização da alteração de fenótipo após 120 h de interação com a amostra	
	GBS90356	52
Figura 13 –	Visualização do fenótipo Dar após 120 h de interação com a amostra	
	GBS1428	53
Figura 14 –	Visualização do fenótipo Dar após 120 h de interação com a amostra C.	
	ulcerans 809	54
Figura 15 –	Visualização da colonização do intestino de C. elegans após interação com	
	a amostra GBS1428-GFP	55

Figura 16 –	Visualização da colonização do intestino de C. elegans após interação com	
	a amostra GBS90356-GFP	56
Figura 17 –	Visualização do worm-star após 72 h de interação com amostra	
	GBS90356	57
Figura 18 –	Visualização do worm-star após 72 h de interação com amostra	
	GBS1428	58
Figura 19 –	Visualização do worm-star após 72 h de interação com amostra GBS90356-	
	GFP	59
Figura 20 –	Visualização do worm-star após 72 h de interação com amostra GBS1428-	
	GFP	60
Figura 21 –	Quimiotaxia de C. elegans frente a amostras de S. agalactiae de origens	
	diversas	61
Tabela 1 –	Valores absolutos da quimiotaxia de C. elegans frente a amostras de S.	
	agalactiae de origens diversas	61
Tabela 2 –	Valores relativos da quimiotaxia de C. elegans frente a amostras de S.	
	agalactiae de origens diversas	62
Figura 22 –	Visualização da interação de C. elegans com a amostra E. coli OP50 no	
	tempo de 24 h	63
Figura 23 –	Visualização da interação de C. elegans com a amostra GBS1428 no tempo	
	de 24 h	63
Figura 24 –	Visualização da interação de C. elegans com a amostra GBS90356 no tempo	
	de 24 h	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACP	Proteína Alfa C
BHI	Infusão cérebro-coração
BibA	Proteína de adesão imunogênica
BsaB	Proteína de aderência à superfície
CAMP	Christie, Atkins e Miunch-Peterson
CC-17	Complexo Clonal 17
CDC	Center for Disease Control and Prevention
DO	Densidade Óptica
EGB	Estreptococos do Grupo B
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
Fbs	Fibrinogênio
FbsA	Proteína ligante ao fibrinogênio A
FbsB	Proteína ligante ao fibrinogênio B
GPCRs	Receptores acoplados à proteína G
HvgA	Adesina Hipervirulenta de S. agalactiae
ILR	Receptor semelhante à insulina
JKN	Cinase N-terminal c-Jun
Lmb	Laminina
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno P38
MEC	Matriz Extracelular
NGM	Nematode Growth Medium
PC	Polissacarídeo capsular
PCA	Peptídeos Catiônicos Antimicrobianos
PCD	Morte Celular Programada
PI-1	ilha pili 1
PI-2a	ilha pili 2-a
PI-2b	ilha pili 2-b
ScpB	Peptidase C5a
SodA	Superóxido dismutase
Srr	Proteína rica em repetição de serina

ST	Sequência-tipo
ST-1	Sequência-Tipo 1
ST-12	Sequência-Tipo 12
ST-17	Sequência-Tipo 17
ST-19	Sequência-Tipo 19
ST-23	Sequência-Tipo 23
TGF-β	Fator de crescimento transformador-β
TLR	Receptor Toll-like
TSA	Tryptic Soy Agar
UDO	Unidades de Densidade Ótica
UFC/ml	Unidades Formadoras de Colônia por mililitro
β-H/C	Hemolisina-β/Citolisina

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	11
1	OBJETIVOS	38
1.1	Geral	38
1.2	Específicos	38
2	MATERIAL E MÉTODOS	39
2.1	Amostras bacterianas e condições de crescimento	39
2.2	Manutenção do <i>C. elegans</i>	40
2.3	Ensaio de sobrevivência de <i>C. elegans</i> em meio sem tetraciclina	40
2.4	Ensaio de sobrevivência de <i>C. elegans</i> em meio com tetraciclina	41
2.5	Quantificação bacteriana no intestino do <i>C. elegans</i>	41
2.6	Quimiotaxia	42
2.7	Microscopia de luz de <i>C. elegans</i>	42
2.8	Microscopia de fluorescência de <i>C. elegans</i>	43
2.9	Microscopia de luz de <i>C. elegans</i> formando <i>worm-star</i>	44
2.10	Microscopia de fluorescência de <i>C. elegans</i> formando <i>worm-star</i>	44
2.11	Quantificação e análise estatística	45
3	RESULTADOS	46
3.1	Ensaio de sobrevivência de <i>C. elegans</i> em meio sem tetraciclina	46
3.2	Ensaio de sobrevivência de <i>C. elegans</i> em meio com tetraciclina	46
3.3	Quantificação bacteriana no intestino do <i>C. elegans</i>	49
3.4	Microscopia de luz de <i>C. elegans</i>	50
3.5	Microscopia de fluorescência de <i>C. elegans</i> em meio sólido	55
3.6	Microscopia de luz de <i>C. elegans</i> formando <i>worm-star</i>	56
3.7	Microscopia de fluorescência de C. elegans formando worm-star	59
3.8	Quimiotaxia	60
4	DISCUSSÃO	65
	CONCLUSÕES	73
	REFERÊNCIAS	74

INTRODUÇÃO

Streptococcus agalactiae, também conhecido como Estreptococos do grupo B (EGB), são cocos patogênicos pertencentes à família *Streptococcaceae* e caracterizados por serem Gram-positivos, encapsulados, alguns beta-hemolíticos, anaeróbicos facultativos, catalase e oxidase negativos, hipurato e técnica para confirmação laboratorial do EGB (CAMP, que corresponde às iniciais de Christie, Atkins e Miunch-Peterson) positivos (LANCEFIELD; HARE, 1935). Possuem o antígeno do grupo B de Lancefield constituído por resíduos de ramnose e N-acetilglicosamina (LANCEFIELD, 1933).

Esse microrganismo é considerado patobionte, ou seja, é encontrado como parte da microbiota humana, mas pode causar doenças severas locais ou sistêmicas (VERANI; MCGEE; SCHRAG, 2010; LANDWEHR-KENZEL; HENNEKE, 2014). Na década de 70, esse patógeno passou a ser reconhecido como pertencente à microbiota anfibiôntica dos tratos respiratório, gastrointestinal e urogenital de pessoas saudáveis (DUTRA et al., 2014; LEVENT et al., 2010). Além disso, sabe-se que o *S. agalactiae* coloniza o trato gastrointestinal e urogenital de mais de 50% da população adulta saudável (KREIKEMEYER et al., 2011).

Durante o início de 1930, o *S. agalactiae* foi identificado como um patógeno veterinário frequentemente associado à mastite bovina, sendo considerado agente etiológico da doença em bovinos (KEEFE, 1997). A mastite é responsável pela maior perda econômica para a indústria de laticínios (ERSKINE, 1992; KEEFE, 1997). A qualidade do leite e a prevalência de mastite são considerados fatores determinantes para a análise de rentabilidade da produção de leite e derivados (RENEÁU; PACKARD, 1991).

O primeiro caso fatal em humano decorrente de uma infecção por *S. agalactiae* foi reportado por Fry (1938), sendo descritas, posteriormente, infecções perinatais pelo microrganismo em 1960. Contudo, somente na década de 1970, o *S. agalactiae* foi considerado como uma das principais causas de mortalidade e morbidade neonatal nos EUA (DERMER et al., 2004).

Esse problema despertou o interesse de autoridades de saúde, onde a partir de 1996, o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC, 1996, 2010, 2020) publicou um relatório de normas e recomendações, sob a perspectiva da saúde pública, para prevenção perinatal de doenças causadas por *S. agalatiae* com apoio da *American College of Obstetricans and Gynecologygists, American Academy of Pediatrics* e outras agências.

S. agalactiae é uma das principais causas de sepse neonatal, pneumonia e meningite (SCHRAG et al., 2000; SPRINGMAN et al., 2009). Além disso, esse patógeno é uma causa importante de infeções invasivas em três populações: neonatos, mulheres grávidas e adultos não grávidos como idosos ou portadores de doença crônica subjacente (PARKS; BARRETT; JONES, 2015).

Geralmente, os recém-nascidos adquirem o *S. agalactiae* no útero ou durante a passagem pela vagina (isto é, transmissão vertical), onde a colonização da mãe pelo *S. agalactiae* é o principal fator de risco para doença neonatal (PARKS; BARRETT; JONES, 2015; VORNHAGEN et al., 2018). Normalmente, o *S. agalactiae* é encontrado no trato gastrointestinal e urogenital humano de indivíduos assintomáticos (DENG et al., 2018) de 20% a 30% dos adultos saudáveis (HANCOCK; DORAN, 2017).

Sabe-se que 11% a 22% das mulheres saudáveis são colonizadas por *S. agalactiae* durante a gravidez, e, essa bactéria coloniza o epitélio vaginal de 15% a 30% de mulheres saudáveis. Estima-se que 3,5 milhões de nascimentos prematuros sejam atribuídos a esse patógeno (KWATRA et al., 2016; LIN et al., 2017; SEALE et al., 2017; VORNHAGEN et al., 2018).

Em algumas áreas da África, o *S. agalactiae* emergiu como uma das causas mais importantes de sepse e meningite neonatal com incidência geral superior a 1.8/1.000 nascimentos, enquanto as taxas de mortalidade chegavam a ser maiores do que 33% (SCHUCHAT, 1997; OSRIN; VERGANO; COSTELLO, 2004).

Atualmente, a doença estreptocócica de início precoce – incluindo sepse, meningite e pneumonia – é uma das principais causas de morbidade e mortalidade infantil, mesmo com uma incidência limitada de 0,41 casos por 1.000 nascidos vivos (0,32 na Ásia a 0,71 na África), e um total estimado correspondente a 205.000 casos por ano (HASPERHOVEN et al., 2020).

A infecção neonatal causada por este patógeno oportunista pode se apresentar de duas formas: início precoce ou início tardio. Mais de dois terços dos recém-nascidos com infecção por *S. agalactiae* apresentam doença de início precoce, ocorrendo na primeira semana de vida com uma taxa de letalidade de 3 a 10%, enquanto os demais apresentam doença de início tardio, ocorrendo entre 7 e 89 dias de vida, com uma taxa de letalidade de 1 a 6% (ZIMMERMANN; GWEE; CURTIS, 2017).

Em casos de início precoce, a bactéria é transferida da mãe para o feto no útero, a partir da infecção ascendente das membranas placentares ou durante a passagem pelo canal vaginal através da aspiração dos fluidos vaginais infectados durante o parto normal. A infecção de início precoce se manifesta entre as primeiras horas ou até 3 dias de vida, apresentando quadros de pneumonia ou falha respiratória que pode progredir para sepse e choque séptico (DORAN; NIZET, 2004).

Na infecção de início tardio, a doença causada pelo *S. agalactiae* pode ocorrer nos primeiros meses de idade, com elevada taxa de infecção sanguínea (40-60%) e progressão para a meningite (JOHRI et al., 2006). Recém-nascidos que sobrevivem à meningite causada por *S. agalactiae* podem sofrer sérias sequelas neurológicas como perda de audição e dano cognitivo (BARRICHELLO et al., 2013).

Segundo Morinis et al. (2011), a manifestação de sepse por *S. agalactiae* requer múltiplos mecanismos, como colonização persistente da membrana mucosa neonatal, contaminação de equipamentos compartilhados por outros neonatos infectados, ou pelo leite materno infectado. Atualmente, nenhuma estratégia preventiva demonstrou reduzir efetivamente a incidência de sepse tardia por *S. agalactiae*.

No entanto, Lin et al. (2017) demonstram a importância da alimentação através do leite materno, mais especificamente, dos oligossacarídeos presentes que são abundantes compreendendo de 10-15 g/L (BODE; JANTSCHER-KRENN, 2012). Em um estudo anterior, foi demonstrado que os oligossacarídeos no leite materno e a presença de anticorpos específicos inibem diretamente o crescimento de *S. agalactiae* (LIN et al., 2017).

São considerados fatores de risco para infecções por *S. agalactiae* a prematuridade, o baixo peso no nascimento, o rompimento prolongado das membranas, a febre intraparto, a corioamnionite, a etnia materna (mães negras e hispânicas possuem maior risco comparado às mães caucasianas) e a endometriose (HEATH; JARDINE, 2010; LAW et al., 2005). *S. agalactiae* é também responsável pela elevada taxa de mortalidade e morbidade em adultos não-grávidos, particularmente em idosos e adultos com doenças subjacentes (FARLEY, 2001; SCHUCHAT, 1997).

Nas décadas de 1880 e 1990, ocorreram aumento de 2 a 4 vezes na incidência de doença invasiva por *S. agalactiae* em adultos, e mais de dois terços dos casos de doenças invasivas nos Estados Unidos foram em adultos (FARLEY, 2001). A maioria das infecções não estavam relacionados à gravidez, mas sim em adultos com mais de 65 anos de idade (EDWARDS; BAKER, 2005). Cerca de 1 a cada 20 (5%) adultos não-grávidos com infecções causadas por *S. agalactiae* são levados a óbito. A taxa de doenças invasivas é de aproximadamente 25 casos a cada 100.000 adultos com mais de 65 anos (CDC, 2016).

Noventa por cento (90%) dos pacientes com infecções invasivas causadas por *S. agalactiae* apresentam pelo menos uma doença crônica debilitante, particularmente diabetes mellitus, cirrose hepática, falha renal crônica, falha no coração, doenças pulmonares ou

qualquer tipo de imunossupressão (BATISTA; FERREIRA, 2015). Fatores individuais como estilo de vida e saúde podem explicar, em parte, porque o *S. agalactiae* é uma causa importante de infecções de tecidos moles e trato urinário, artrite e sepse em pacientes maiores de 65 anos e naqueles com doenças crônicas, como acidente vascular cerebral, diabetes, insuficiência renal ou hepática e câncer (JACKSON et al., 1995).

Em adultos saudáveis, o *S. agalactiae* coloniza predominantemente a camada externa de muco do cólon, mas pode ocasionalmente residir no intestino delgado. Em mulheres grávidas, o *S. agalactiae* é uma causa frequente de infecções urinárias e do trato genital superior, infecções intra-amnióticas e sepse (LANDWEHR-KENZEL; HENNEKE, 2014).

O aumento dos casos de infecções por *S. agalactiae* pode ser atribuído à expansão populacional de adultos e ao aumento da expectativa de vida, mesmo em portadores de doenças crônicas (FARLEY, 2001). Manifestações clínicas de infecções por *S. agalactiae* em adultos são variadas e podem ocorrer na pele, tecidos moles, além de infecções no trato urinário, sepse, pneumonia, artrite e endocardite (RAJAGOPAL, 2009).

A colonização e infecção dos tecidos alvo por *S. agalactiae* requer a capacidade do patógeno de aderir e invadir as superfícies da mucosa epitelial (ROSINI; MARGERIT, 2015). As interações de maior afinidade do *S. agalaciae* com células hospedeiras são mediadas por uma série de proteínas hidrofóbicas de superfície (WIBAWAN; LÄMMLER, 1992).

S. agalactiae é capaz de aderir uma série de células humanas incluindo o epitélio vaginal, membranas placentárias, epitélio do trato respiratório e a barreira endotelial hematoencefálica (BURCHAM et al., 2019; KIM et al., 2017; KIM; SHUSTA; DORAN, 2019; VORNHAGEN et al., 2018).

O uso disseminado da profilaxia antibiótica intraparto levou a uma redução na incidência de infecção de início precoce em 80%, para aproximadamente 0,25 por 1.000 recémnascidos, mas não influenciou a incidência de infecção de início tardio, atualmente estimada em 0,28 por 1.000 recém-nascidos. A infecção de início precoce, que geralmente se apresenta como sepse, pneumonia ou meningite, é comumente causada pelos tipos capsulares Ia, Ib, II, III e V e resulta da transmissão vertical da mãe. A infecção de início tardio também se apresenta como sepse e meningite, mas ao contrário da infecção de início precoce, apresenta uma proporção significativa de casos com celulite, osteomielite ou artrite séptica. A infecção de início tardio é causada principalmente pelos tipos capsulares III, Ia e V (ZIMMERMANN; GWEE; CURTIS, 2017).

O tratamento indicado para infecções causadas pelo *S. agalactiae* continua sendo com antibióticos, sendo a penicilina e a ampicilina os de primeira escolha. Em casos mais graves

recomenda-se a utilização de um aminoglicosídeo, geralmente a gentamicina. Clindamicina e eritromicina são antibióticos também recomendados em casos de pacientes alérgicos à penicilina (CDC, 2010; LOPARDO et al., 2003; VILLAR; JUGO, 2013). Um aumento nas taxas de resistência a estes antibióticos está sendo detectado em diversas regiões do mundo, incluindo Europa, Ásia e Américas do Norte e do Sul (DUTRA et al., 2014).

Atualmente, as infecções causadas por *Streptococcus* spp., principalmente *S. agalactiae* e *Streptococcus iniae*, são as mais comuns e causam enormes prejuízos econômicos também à criação da tilápia. Sua prevalência e gravidade dependem de múltiplos fatores ambientais, incluindo temperaturas elevadas da água, aumento dos níveis de amônia e baixos níveis de oxigênio dissolvido. A disseminação ocorre devido às precárias condições de cultivo e manejo, além da elevada densidade populacional de tilápia nos tanques, o que provoca injúrias e lesões nos animais facilitando a transmissão (GUANGJIN, et al., 2016).

Contudo, sabe-se que a pele da tilápia possui microbiota não infecciosa, grandes quantidades de colágeno tipo I e estrutura morfológica semelhante à da pele humana, sendo sugerida como um potencial xenoenxerto para o manejo de queimaduras (LIMA-JUNIOR et al., 2019).

Distribuição dos isolados de S. agalactiae

Polissacarídeos capsulares (PC) são reconhecidos como tendo um papel fundamental dentre os fatores de virulência e são um alvo importante para o desenvolvimento de estratégias de vacinas. Os PC de *S. agalactiae* possuem diferenças químicas e antigênicas que são capazes de subdividir essa espécie em dez tipos capsulares distintos denominados Ia, Ib, II-IX (SLOTVED et al., 2007). Dos 10 tipos capsulares diferentes descritos para *S. agalactiae*, os tipos Ia, Ib, II, III e V são mais comumente associados à doença e respondem pela maioria dos casos no mundo (BURCHAM et al., 2019; EDMOND et al., 2012).

A função desse PC é ajudar a evitar os mecanismos de defesa do hospedeiro, interferindo na depuração fagocítica. Esse PC consiste em várias unidades repetidas de monossacarídeos, como glicose, galactose ou N-acetilglicosamina, ligadas ao N-acetil-neuramínico, conhecido como ácido siálico (PUERTAS-PRIETO et al., 2017). Sugere-se que essa estrutura altamente conservada denominada α -D-NeupNAc (2 \rightarrow 3)- β -D-Galp é fundamental para a função antifagocítica de todos os polissacarídeos capsulares em S. agalactiae. (CIESLEWICZ et al., 2005)

A tipagem capsular tem sido um dos pilares da epidemiologia descritiva do *S. agalactiae*. Nove tipos capsulares foram descritos (Ia, Ib e II a IX) e todos os genes requeridos para a síntese da cápsula polissacarídica em *S. agalactiae* são encontrados no operon *cps* (ALHHAZMI; PANDEY; TYRRELL, 2017). As amostras do tipo capsular III são de particular importância, pois são responsáveis pela maioria das infecções, incluindo meningite em neonatos em todo o mundo (PÉRICHON et al., 2017).

A distribuição epidemiológica dos tipos capsulares de *S. agalactiae* pode variar de acordo com uma série de aspectos tais como a região geográfica, o perfil da população estudada e a fonte do isolado bacteriano (DOGAN et al., 2005).

Cinco tipos capsulares (Ia, Ib, II, III e V) são frequentemente isolados na América do Norte, e em alguns países europeus (ALHHAZMI et al., 2017). Os isolados do tipo capsular III são associados à meningite neonatal (ALVES et al., 2015) e o tipo capsular V o mais comum em adultos não-grávidos (BLUMBERG et al., 1996). Estudo realizado na Argentina demonstrou uma distribuição similar entre adultos, com exceção do tipo capsular II, que foi o mais frequente entre jovens adultos (LOPARDO et al., 2003).

No Brasil a ocorrência dos tipos capsulares Ia, Ib, II, III e V tem sido descritos em estudos com isolados das regiões sul e sudeste do país (DUTRA et al., 2014). Cerca de 68,2% dos isolados brasileiros são predominantemente provenientes do trato vaginal de mulheres grávidas. Em Curitiba, o tipo capsular IV foi identificado em 13,1% das amostras coletadas de infecções invasivas graves, enquanto os tipos capsulares Ib (34,9%) e Ia (25,6%) foram predominantes em grávidas infectadas pelo vírus HIV e em pacientes com câncer (DUTRA et al., 2014; PALMEIRO et al., 2010; SOUZA et al., 2013).

Alhhazmi et al. (2017) apontam estudos que observam a emergência e circulação do tipo capsular IV, um tipo capsular anteriormente incomum, como importante causa em infecções neonatais e adultas (AMIN; ABDULRAZZAQ; UDUMAN, 2002; FLORINDO et al., 2014; TEATERO et al., 2014; TEATERO et al., 2015)

Apesar desses dados, estudos de distribuição e prevalência dos tipos capsulares são escassos, sendo o diagnóstico e o tratamento dos pacientes acometidos por *S. agalactiae* ainda um desafio. Com políticas de prevenção estabelecidas e implantadas, outros países já apresentam redução da incidência da doença invasiva por *S. agalactiae* (COSTA et al., 2008; SOARES et al., 2013).

Associações entre sequência-tipo (ST) e tipos capsulares foram reportadas na literatura. Embora as ferramentas de subtipagem tenham identificado linhagens filogenéticas específicas de *S. agalactiae* importantes na doença neonatal, pouco se sabe sobre a diversidade genética dessas linhagens ou sobre os papéis que a recombinação e a seleção desempenham na geração de genótipos emergentes (RAMASWANY et al., 2006; SPRINGMAN et al., 2009).

Segundo Jones et al. (2003), o *S. agalactiae* foi classificado em STs com base em um perfil alélico de sete *loci* diferentes - *adhP*, *atr*, *glcK*, *glnA*, *pheS*, *sdhA*, *tkt*- onde a maioria dos isolados humanos são pertencentes aos ST-1, ST-17, ST-19 ou ST-23. Além disso, observaram também uma correlação entre o tipo capsular III e ST-17 (JONES et al., 2003; TAZI et al., 2010), e entre o tipo capsular Ib e ST-12. Foi encontrado o tipo capsular V em todos os STs, exceto no ST-17 (RAMASWAMY et al., 2006).

Estudos anteriores observaram a presença variável de tipos capsulares no ST-1; variação dos tipos capsulares Ib e II no ST-10; predominância do tipo capsular III no ST-17 e ST-19 e, por último, predominância do tipo capsular Ia no ST-23 (BISHARAT et al., 2004; DAVIES et al., 2004; LUAN et al., 2005).

Springman et al. (2009) observaram através da análise de sequências multilocus (MLST) de diferentes isolados de *S. agalactiae* (linhagens invasoras, colonizadoras e bovinas) uma rede de troca gênica entre sete complexos clonais, sugerindo que a recombinação é parcialmente responsável pela diversidade observada entre os genótipos. Sabe-se que complexo clonal 17 (CC-17) está associado à doença neonatal, e tais perfis podem ser usados como marcadores para a detecção rápida de amostras com maior propensão a causar doenças neonatais e podem ser considerados alvos úteis de vacina.

Fatores de virulência

Assim como diversas bactérias patogênicas, o *S. agalactiae* codifica uma série de fatores de virulência que são críticos na definição de sua capacidade de causar doenças (RAJAGOPAL, 2009). A virulência do *S. agalactiae* é complexa e multifatorial, onde uma série de fatores determinantes estão envolvidos na adesão e invasão das células hospedeiras, assim como na evasão do sistema imune. Componentes de superfície, incluindo a cápsula polissacarídica e proteínas de ligação aos componentes da matriz extracelular, além de enzimas (como a C5

peptidase) e toxinas/citolisinas têm sido associadas com a virulência desse microrganismo (MAISEY; DORAN; NIZET, 2009).

Landwehr-Kenzel e Henneke (2014) descreveram que para o desenvolvimento de sepse pelo *S. agalactiae* a partir do intestino, a bactéria deve realizar três etapas consecutivas: colonização do cólon e potencialmente do intestino delgado, translocação através do epitélio intestinal e evasão imunológica que impede a depuração do *S. agalactiae* na corrente sanguínea (Quadro 1).

Durante a infecção sistêmica, o *S. agalactiae* emprega uma série de estratégias para evitar seu reconhecimento pelo sistema imune do hospedeiro. Dois importantes fatores medeiam à adesão do patógeno à matriz extracelular: proteínas ligantes ao fibrinogênio (Fbs) e proteínas ligantes à laminina (Lmb) (LANDWEHR-KENZEL; HENNEKE, 2014). Enquanto a proteína ligante ao fibrinogênio A (FbsA) promove a aderência, a proteína ligante ao fibrinogênio B (FbsB) medeia a invasão do *S. agalactiae* às células hospedeiras (JACOBSSON, 2003; SCHUBERT et al., 2002). Spellerberg et al. (1999) demonstraram que a associação bacteriana à matriz extracelular via Lmb parece ser importante para a translocação do *S. agalactiae* pelo epitélio intestinal e pela barreira hemato-encefálica (LANDWEHR-KENZEL; HENNEKE, 2014).

Mecanismo Fator de virulência	Colonização	Aderência	Invasão	Evasão imune	Neuro- tropismo
Proteína A de ligação ao Fibrinogênio (FbsA)	+	+			
Proteína B de ligação ao Fibrinogênio (FbsB)			+		
Proteína de ligação à Laminina (Lmb)			+		+
Proteína de aderência à superfície (BsaB)	+	+	<mark>(</mark> +)		
Proteína Alfa C (ACP)	+	+	+	+	
Proteína rica em repetição de serina (Srr)	+	+	+		
Pili	+	+	+	+	+
Adesina Hipervirulenta de <i>S. agalactiae</i> (HvgA)	+	+	+	(+)	+
Hemolisina-β/Citolisina (β-H/C)	+	+	+	+	+
Polissacarídeo Capsular (CPS)				+	
Peptidase C5a (ScpB)				+	
Proteína de adesão imunogênica (BibA)				+	
Fator H				+	
Antígeno-β ligante de IgA				+	
D-Alanilação				+	
Superóxido dismutase (SodA)				+	

Quadro 1 – Fatores de virulência do *S. agalactiae* e seu papel na transição da colonização para a doença invasiva

Fonte: LANDWEHR-KENZEL, 2014.

Um outro fator de virulência importante é a β -hemolisina/citolisina, uma toxina formadora de poros responsável pelas características fenotípicas beta-hemolíticas de *S. agalactiae* nas placas de ágar sangue (FACKLAM et al., 1974). A hemolisina é expressa pela maioria das amostras de *S. agalactiae* e foi descrita pela primeira vez por Todd (1934). A expressão da β -hemolisina/citolisina está correlacionada com a severidade da doença em modelos murinos de administração intranasal e intravenosa, consistente com sua capacidade de produzir injúria tanto nos glóbulos vermelhos quanto nas células epiteliais pulmonares e endoteliais (CARLIN; LEWIS; VARKI; NIZET, 2007). Estudos também demonstraram o papel da β -hemolosina/citolisina durante a aderência no epitélio pulmonar e na indução da expressão da citocina quimioatrativa interleucina 8 (IL-8) (DORAN et al., 2002).

Da mesma forma, o fator CAMP é uma proteína secretada com propriedades capazes de formar poros, sendo descrita como importante molécula durante a patogênese do *S. agalactiae* (LANG; PALMER, 2003; RAJAGOPAL, 2009). Estudos em modelos *in vivo* têm evidenciado a importância do fator CAMP para a virulência do microrganismo, onde foi demonstrado que a co-administração do fator CAMP com uma dose sub-letal de *S. agalactiae* foi capaz de induzir sepse e morte em camundongos (LANG; PALMER, 2003). Além disso, foi observado que o fator CAMP foi capaz de oligomerizar e formar poros discretos nas membranas das células alvo (LANG; PALMER, 2003; LANG et al., 2007).

Estudos relataram a presença de pequenos apêndices na superfície de *S. agalactiae* denominados pili (DRAMSI et al., 2006; LAUER et al., 2005). Os pili são capazes de mediar a resistência aos peptídeos catiônicos antimicrobianos (PCA) e também facilitar a aderência de *S. agalactiae* em células do hospedeiro (DRAMSI et al., 2006, MAISEY; DORAN; NIZET, 2009). Apesar de o mecanismo pelo qual os pili permitem que o *S. agalactiae* resista aos peptídeos catiônicos antimicrobianos não ser compreendido, amostras de *S. agalactiae* que apresentavam deficiência na proteína acessória PI-1 demonstraram diminuição na virulência e aumento na suscetibilidade à fagocitose e PCA (MAISEY et al., 2007; MAISEY; DORAN; NIZET, 2009).

Os genes que codificam os pili em *S. agalactiae* estão agrupados em 3 ilhas genômicas - a ilha Pili 1 (PI-1), ilha Pili 2-a (PI-2a) e ilha Pili 2-b (PI-2b) – localizadas em 2 loci separados, flanqueado por repetições e genes conservados. A ilha PI-1 consiste em um segmento de DNA de 16 kDa. As ilhas PI-2a e PI-2b, localizadas no segundo locus, consistem em segmentos de DNA de 11 kb. As 3 ilhas compartilham a presença de 3 genes que codificam componentes de cada pilus, 2 proteínas acessórias – AP1 e AP2 – e de genes que codificam as enzimas sortase,

responsável pela polimerização do pilus (DRAMSI et al., 2006; KREIKEMEYER et al., 2011; ROSINI et al, 2006).

Além dos genes do pilus, a ilha PI-1 contém genes que codificam um regulador transcricional do tipo *AraC* e uma proteína de choque térmico Hsp33. A ilha PI-2a contém uma região de leitura aberta adicional que codifica um regulador transcricional do tipo *RogB*, que não está presente na ilha PI-2b (KREIKEMEYER et al., 2011).

Os pili têm sido relatados como mediadores na aderência em células epiteliais humanas (DRAMSI et al., 2006, KONTO-GHIORGHI et al., 2009; ROSINI et al., 2006), na aderência e invasão de células endoteliais microvasculares cerebrais (MAISEY et al., 2007) e na promoção da migração transepitelial (PEZZICOLI et al., 2008). Outros estudos comprovam o envolvimento dos pilina aderência e invasão de *S. agalactiae* em células eucarióticas A549. Amostras mutantes deficientes em pili pertencentes aos tipos capsulares Ia, III e VII exibiram uma redução significativa na aderência, e no caso da amostra do tipo capsular VII uma redução também na invasão (SHARMA et al., 2013).

Juntamente com essas toxinas formadoras de poros capazes de facilitar a sobrevivência de *S. agalactiae* no hospedeiro, é necessário que a bactéria seja capaz de subverter as defesas inatas do hospedeiro. Dessa forma, *S. agalactiae* codifica fatores que evitam o reconhecimento pelas células eucarióticas ou que conferem resistência aos mecanismos de defesa do hospedeiro (ABBAS; LITCHMAN; PILLAI, 2015).

A C5a peptidase de *S. agalactiae* (ScpB) é uma serino protease que facilita o patógeno na evasão do sistema imune hospedeiro. ScpB, codificado pelo gene *scpB*, é capaz de clivar e inativar o componente C5a do sistema complemento humano. Como C5a é fundamental no recrutamento dos neutrófilos ao sítio da infecção, a clivagem feita por ScpB impede o recrutamento dos neutrófilos. ScpB também pode promover a ligação de *S. agalactiae* às células epiteliais humanas e à fibronectina (HULL; TAMURA; CASTNER, 2008; OKUMURA; NIZET, 2014).

A hialuronidase funciona como importante fator de propagação (LIN et al., 1994), sendo uma proteína de 110 kDa que promove a degradação do ácido hialurônico, principal componente do tecido conjuntivo e do sistema nervoso. É encontrado em altas concentrações na placenta, no líquido amniótico e no pulmão, sendo também secretada pela bactéria e codificada pelo gen *hyl*B (GASE et al., 1998; LI; JEDRZEJAS, 2001; RAJAGOPAL, 2009). A hialuronidase facilita a propagação do *S. agalactiae* pelos tecidos do hospedeiro por clivar a ligação glicosídica entre os resíduos de N-acetil-β-D-glicosamina e ácido D-glicurônico do ácido hialurônico (PRITCHARD et al., 1994). Amostras de *S. agalactiae* isoladas de sangue

apresentaram altos níveis desta enzima, demonstrando que estas amostras podem ser mais invasivas (KJEMS; PERCH; HENRICHSEN, 1980; PRITCHARD et al., 1994).

Doran (2016) descreveu estratégias do S. agalactiae para ultrapassar a barreira hematoencefálica e causar a meningite, classificando em três fases a progressão da doença: sobrevivência na corrente sanguínea e desenvolvimento da bacteremia, invasão e ruptura da barreira hemato-encefálica e multiplicação do S. agalactiae nos espaços subaracnóideo e ventricular que contêm o líquido cefalorraquidiano, induzindo inflamação com alterações fisiopatológicas associadas, levando ao desenvolvimento de dano neural (Figura 1).



Figura 1 – Interação do S. agalactiae com a barreira hemato-encefálica

Legenda: (a) A cápsula do S. agalactiae promove a sobrevivência da corrente sanguínea, impedindo a deposição de complemento e, finalmente, a fagocitose. (b) Foi demonstrado que os reguladores de resposta ao S. agalactiae, CovR e CiaR, promovem ainda mais a sobrevivência nas células fagocíticas, o que ajuda na sobrevivência da corrente sanguínea do S. agalactiae. (c) As adesinas Srr, HvgA e SfbA promovem a interação do S. agalactiae com células endoteliais microvasculares do cérebro, algumas associando-se a componentes da matriz extracelular (MEC). (d) Outra adesina chave de S. agalactiae, a proteína PilA na extremidade do pilus, medeia a ligação do colágeno com as integrinas $\alpha 2\beta 1$ na superfície celular endotelial. Isso inicia a captação bacteriana e a ativação imune. (e) A β-hemolisina ativa células endoteliais microvasculares do cérebro, incluindo autofagia que podem contribuir para a eliminação do S. agalactiae, transferindo bactérias intracelulares para o lisossomo, embora o mecanismo exato da transcitose por S. agalactiae seja desconhecido. (f) O fator de transcrição do hospedeiro, Snail1, que é um repressor dos componentes das junções tight, é induzido durante a infecção por S. agalactiae e resulta na perda de juncões tight. Isso contribui para a penetração do S. agalactiae e a permeabilidade da barreira hemato-encefálica durante a progressão da doença. DORAN, 2016.

22

Características gerais de Caenorhabditis elegans

Caenorhabditis elegans é um nematódeo de vida livre com distribuição cosmopolita que vive em regiões temperadas de várias partes do mundo (NICHOLAS, 1975). Este animal pertence ao Reino <u>Animalia</u>, Filo <u>Nematoda</u>, Classe <u>Chromadorea</u>, Ordem <u>Rhabditida</u>, Família <u>Rhabditidae</u> e Gênero <u>Caenorhabditis</u> (ANAGE: The Animal Ageing and Longevity Database, 2017). Seu primeiro isolamento e descrição ocorreu por Emile Maupas (1900), sendo nomeado de *Rhabditis elegans*. Posteriormente, a partir de 1950, muitas espécies pertencentes ao gênero *Rhabditis* foram realocadas para o gênero *Caenorhabditis*, incluindo o *C. elegans*.

C. elegans possui corpo cilíndrico alongado, afilado nas duas extremidades, com pele lisa, sem segmentação e sem anexos. Os adultos crescem até aproximadamente 1 mm de comprimento. Exatamente 959 células compõem *C. elegans* e seus corpos são transparentes; portanto, células individuais são facilmente observadas com um microscópio (EDGLEY, 1999)

Este nematódeo possui dois sexos que ocorrem naturalmente, um masculino e um hermafrodita auto-fertilizante; as fêmeas não ocorrem naturalmente. A maioria dos indivíduos é hermafrodita; os machos geralmente não representam mais de 0,20% da população natural. O número de machos pode ser aumentado aumentando a temperatura no início da maturidade sexual (NICHOLAS, 1975).

Os hermafroditas são protândricos, ou seja, os indivíduos produzem esperma primeiro e depois produzem óvulos (BLAXTER, 1999). Mais comumente, os vermes simplesmente fertilizam seus próprios ovos (BIRD, 1991). No entanto, os machos que existem copulam com hermafroditas, misturando assim o pool genético na população (NICHOLAS, 1975). Os ovos são depositados dentro de duas a três horas após a fertilização e eclodem aproximadamente doze horas depois. Os vermes se tornam adultos em quatro estágios larvais; isso geralmente leva cerca de três dias quando a temperatura varia de 20 a 25 °C (BLAXTER, 1999).

A temperatura desempenha um papel importante no desenvolvimento de *C. elegans*. A vida útil média dos vermes é de duas a três semanas (EDGLEY, 1999). Sabe-se que temperaturas mais altas diminuem a vida útil e temperaturas mais baixas estendem a vida útil, pelo menos até um certo limite (KLASS, 1977). Embora o envelhecimento fisiológico tenha sido descrito em vermes, em particular no nível de diminuição de movimento que pode refletir um declínio nas células musculares, a causa da morte de animais velhos permanece incompreendido (WOLF; AUSTAD, 2010).

C. elegans possui um cérebro simples e um sistema nervoso (MALAKHOV, 1994). Eles têm um comportamento relativamente simples. No entanto, eles são capazes de obter aprendizado rudimentar (EDGLEY, 1999). Os vermes têm sentidos táteis básicos que lhes permitem determinar seu ambiente (LEE; ATKINSON, 1977).

Na maioria das vezes, *C. elegans* usa quimiossensibilidade e um forte senso de olfação para obter informações de seu ambiente; os vermes são muito receptivos a sinais químicos que os guiam aos alimentos, os ajudam a evitar toxinas, encontrar parceiros e evitar predadores (TROEMEL, 1999). Não há, no entanto, necessidade de um forte senso visual, devido ao ambiente escuro em que vivem naturalmente. Contudo, existem evidências de que os vermes respondem minimamente à luz (LEE; ATKINSON, 1977).

O habitat deste animal é terrestre, associado a áreas úmidas e ricas em matéria orgânica, especialmente material vegetal em decomposição (EDGLEY, 1999; LEE; ATKINSON, 1977). Essas áreas são habitats em comum frequentados por humanos como jardins e áreas de compostagem, porém os nematódeos podem ocasionalmente ser encontrados também em frutas e flores podres (ZEČIĆ; DHONDT; BRAECKMAN, 2019). A principal característica desses habitats é que eles são ricos em microrganismos e matéria orgânica em decomposição. Contudo, amostras coletadas na França (FÉLIX; DUVEAU, 2012) e no Norte da Alemanha (PETERSEN et al., 2015) mostraram o *C. elegans* habitando o trato digestivo de lesmas, sugerindo que esses vermes podem utilizar o intestino de outros animais como fonte de alimento na ausência de material vegetal em decomposição no meio ambiente (ZEČIĆ; DHONDT; BRAECKMAN, 2019).

Brenner (1974) introduziu *C. elegans* como um modelo para estudo do desenvolvimento neuronal, por ser um animal menos complexo quando comparado ao modelo *Drosophila melanogaster*. Estudos prévios demonstrando a nutrição, desenvolvimento do nematódeo e ciclo sexual do verme já haviam sido realizados (DOUGHERTY et al., 1959; NIGON, 1949), possibilitando a escolha do nematódeo como modelo animal.

Por décadas, o *C. elegans* tem sido o modelo preferido para estudar a biologia fundamental dos seres metazoários, devido a sua capacidade genética, fácil manutenção, baixo custo e genoma totalmente sequenciado que codifica genes homólogos associados a doenças humanas. Também pode ser considerado um modelo adequado para a genética da nutrição animal e do metabolismo. Sabe-se que muitas necessidades dietéticas e respostas metabólicas são evolutivamente conservadas. No entanto, os nematódeos não compartilham todas as vias enzimáticas com os vertebrados e, portanto, mostram algumas diferenças importantes em relação à sua dieta, como mostra a Figura 2 (ZEČIĆ; DHONDT; BRAECKMAN, 2019).



Figura 2 – Necessidades dietéticas de C. elegans e Homo sapiens

Fonte: ZEČIĆ; DHONDT; BRAECKMAN, 2019.

Em decorrência da evolução dos seres vivos, o resultado da interação hospedeiropatógeno depende dos avanços nos fatores de virulência desses patógenos e, em contrapartida, dos avanços na resposta imune do hospedeiro. Sabe-se, por exemplo, que mamíferos e insetos utilizam uma via de transdução de sinais conservada para ativar genes relacionados à defesa do hospedeiro. Devido a essas respostas aos patógenos em comum observadas entres diferentes seres ao longo da evolução, estratégias bacterianas podem também ter sido conservadas para levar à patogênese dos seres vivos em diferentes modelos de células animais (TAN; MAHAJAN-MIKLOS; AUSUBEL, 1999).

As interações hospedeiro-patógeno no intestino são fundamentais para todos os organismos superiores. *C. elegans* tem sido utilizado como modelo substituto para entender os mecanismos conservados nas interações hospedeiro-patógeno. As semelhanças morfológicas e funcionais do intestino de *C. elegans* com o ser humano permitiram a investigação dos micróbios intestinais e seus efeitos no metabolismo, desenvolvimento, reprodução, comportamento, patogênese, respostas imunes e tempo de vida (KUMAR, 2019).

O intestino do *C. elegans*, relativamente simples, cumpre muitas das funções complexas do trato digestivo dos mamíferos, figado e tecidos adiposos, além de desempenhar um papel na defesa, imunidade e longevidade de patógenos (DIMOV; MADURO, 2019).

A capacidade dos animais de detectar estímulos mecânicos, térmicos e outros estímulos físicos é conservada nos filos e desempenha um papel fundamental na navegação de condições ambientais variáveis e severas. Esses sentidos permitem que os animais acasalem, encontrem comida e evitem o perigo, e dependem das funções dos neurônios especializados para detectar esses estímulos. A transdução desses estímulos nos neurônios sensoriais é mediada por vias de sinalização que convergem nos canais de íons, convertendo assim estímulos físicos em sinais elétricos que se propagam pelo sistema nervoso para desencadear respostas comportamentais apropriadas. Os animais usam diversos receptores e vias de sinalização para sentir e responder de maneira confiável a sinais físicos (GOODMAN; SENGUPTA, 2019).

Fases de desenvolvimento de C. elegans

A embriogênese de *C. elegans* leva aproximadamente 16 horas a 20 °C e todas as fases subseqüentes ilustradas na Figura 3 requerem a mesma temperatura para o desenvolvimento do nematóide. Após a fertilização, é formada uma barreira impermeável no ovo, permitindo que o embrião se desenvolva completamente independente da mãe. No entanto, os embriões são geralmente retidos no hermafrodita até aproximadamente o estágio de 24 células no momento em que são depositados. O embrião hermafrodito eclode com 558 núcleos (alguns núcleos estão em sincícios multinucleares, portanto a contagem de células é mais baixa) e se torna a larva do primeiro estágio (L1) (CORSI; WIGHTMAN; CHALFIE, 2015).

Os animais começam a comer e se desenvolver através de quatro estágios larvais (L1-L4). O estágio L1 tem aproximadamente 16 horas de duração; os outros estágios têm aproximadamente 12 horas de duração. Cada estágio termina com um período de inatividade semelhante ao sono chamado *lethargus*, no qual é feita uma nova cutícula (camada colágena externa). O período de *lethargus* termina com a muda da cutícula antiga (CORSI; WIGHTMAN; CHALFIE, 2015; RAIZEN et al., 2008).

Aproximadamente 12 horas após a muda L4, os hermafroditas adultos começam a produzir descendência por um período de 2 a 3 dias, até que tenham utilizado todos os espermatozoides produzidos por eles mesmos; progênie adicional pode ser gerada se o

hermafrodita sem espermatozoide se acasalar com um macho. Após o período reprodutivo, os hermafroditas podem viver mais algumas semanas antes de morrer de senescência (CORSI; WIGHTMAN; CHALFIE, 2015).

Em resposta a condições ambientais diversas, como baixa abundância de alimentos, alta temperatura, e/ou superpopulação, as larvas L2 de *C. elegans* podem entrar no estágio conhecido como *dauer* (HU, 2007). O fenótipo *dauer* sofre alterações morfológicas e metabólicas que lhes permitem sobreviver a condições ambientais adversas, como constrição radial do corpo e da faringe, além do bloqueio do bombeamento da faringe, fechamento das cavidades orais e formação de uma cutícula especializada com sulcos laterais (RENGARAJAN; HALLEM, 2016; ZHANG et al., 2015).

Assim, os vermes no estágio *dauer* são adaptados a resistir ao estresse metabólico e ambiental podendo sobreviver por meses. Várias vias evolutivamente conservadas regulam a decisão de entrar na fase *dauer*, como as que envolvem guanilil-ciclase, TGF- β , e INS/IGF-1 (insulina/fator de crescimento semelhante à insulina 1 [somatomedina C]) e uma via de sinalização do hormônio esteroide (ZHANG et al, 2015).



Nota: Os animais aumentam de tamanho ao longo dos quatro estágios larvais, mas os sexos individuais não são facilmente distinguidos até o estágio L4. No estágio L4, os hermafroditas têm uma cauda afilada e a vulva em desenvolvimento (ponta de seta branca) pode ser vista como um semicírculo claro no centro do lado ventral. Os machos têm uma cauda mais larga (ponta de flecha preta), mas nenhum leque perceptível neste estágio. Nos adultos, os dois sexos podem ser distinguidos pela circunferência mais larga e cauda afilada do hermafrodita e circunferência mais fina e cauda em forma de leque (ponta de seta preta) do macho. Os ovócitos podem ser fertilizados pelos espermatozoides do hermafrodita ou pelos espermatozoides obtidos dos machos através do acasalamento. As larvas *dauer* são mais finas que todos os outros estágios larvais. As fotografias foram tiradas em placas de Petri (observe os gramados bacterianos em todas, exceto na imagem mais clara). Barra, 0,1 mm.

Fonte: CORSI; WIGHTMAN; CHALFIE, 2015.

Fonte de recursos de C. elegans na natureza

Na natureza, o *C. elegans* se alimenta de diferentes espécies de bactérias incluindo bactérias de solo como *Comomonas* spp., *Pseudomonas medocina* e *Bacillus megaterium* (AVERY; SHTONDA, 2003; FÉLIX; DUVEAU, 2012; MONTALVO-KATZ et al., 2013). Além disso, as bactérias mais comumente encontradas em frutas podres são *Acetobacteriaceae* (*Acetobacter* e *Gluconobacter*) e *Enterobacteriaceae* (*Enterobacter*), podendo também representar uma fonte de alimento para o verme (SAMUEL et al., 2016; ZEČIĆ; DHONDT; BRAECKMAN, 2019).

Extratos intestinais de indivíduos recém isolados de *C. elegans* do meio ambiente contém também alguns seres eucariotos digeridos, principalmente células de leveduras (FÉLIX; DUVEAU, 2012). Existe também a possibilidade de o nematódeo absorver o material vegetal ou animal parcialmente processado encontrado em áreas contendo material em decomposição, o que garantiria a ingestão de nutrientes que as fontes alimentares bacterianas não podem fornecer naturalmente (SCHULENBURG; FÉLIX, 2017; ZEČIĆ; DHONDT; BRAECKMAN, 2019).

Porém, a alimentação de *C. elegans* não resulta somente em benefício nutricional. Alguns microrganismos são patogênicos, capazes de infectar e até matar o nematódeo. O verme desenvolveu muitas maneiras de competir com os efeitos prejudiciais de uma infecção. A ativação de uma resposta imune fisiológica é acompanhada por alto custo em termos de energia. Assim, impedir o encontro com um patógeno pode representar a melhor opção para o verme (BOGAERTS et al., 2010).

Fonte de recursos para C. elegans em laboratório

A linhagem N2, utilizada nos laboratórios que trabalham com o modelo *C. elegans*, é referida como estirpe selvagem e foi isolada de uma amostra de cogumelos em 1951 em Bristol, Inglaterra. Contudo, dada a taxa de mutação do *C. elegans* de 2,7 x 10⁻⁹, a população inevitavelmente adquiriu algumas mutações que se fixaram na população antes da distribuição do nematódeo como modelo animal (DENVER et al., 2009), pois a propagação de *C. elegans*

em laboratório se deu antes do desenvolvimento dos métodos de criopreservação em 1969 (PHO; MACNEIL, 2019).

Em laboratório, observa-se uma padronização em relação à dieta do nematódeo, diferentemente na natureza. O animal é cultivado em placas de ágar semeados com bactérias. A fonte de alimento bacteriano comumente utilizado é a *Escherichia coli* OP50, uma amostra uracil auxotrófica. Esta fonte de alimento foi defendida por Sydney Brenner, pois à medida que o tapete de *E. coli* OP50 cresce, também permite a visualização dos vermes, não prejudicando a visualização dos eventos (BRENNER, 1974; ZEČIĆ; DHONDT; BRAECKMAN, 2019).

Uma vez consumido totalmente a fonte de alimento, os vermes utilizam seu suprimento de gordura. Sem alimento, o desenvolvimento de animais jovens em estágio larval é interrompido. Como resultado de entrar nesta estase, os animais podem sobreviver por pelo menos um mês (geralmente as placas contendo vermes em estarvação podem ser úteis por até 6 meses à 15 °C) e, quando estocados, eles não precisam de alimentação constante. Sempre que são necessários animais em crescimento saudáveis, um pedaço do ágar da placa antiga pode ser transferido para uma nova placa com bactérias. Os animais se mudam para as novas placas e retomam seu desenvolvimento. (CORSI; WIGHTMAN; CHALFIE, 2015).

Alguns laboratórios também utilizam a amostra *E. coli* K12 que tem o perfil de formar um espesso tapete bacteriano que pode suportar uma grande população de *C. elegans* na placa (BROWNING et al., 2013; DEPUYDT et al., 2013); assim como uma amostra derivada da *E. coli* K12 conhecida como HT115, que possui o gene da RNAse III interrompido (KAMATH et al., 2003; RUAN et al., 2004); e a amostra HB101, um híbrido entre as amostras *E. coli* K12 e B (BOYER; ROULLAND-DUSSOIX, 1969), que tem o perfil de formar um tapete bacteriano de baixa viscosidade, pois as células não aderem umas às outras, facilitando a absorção pelos vermes (AVERY; SHTONDA, 2003; DAVIS et al., 1995; ZEČIĆ; DHONDT; BRAECKMAN, 2019).

As amostras de *E. coli* usadas como fonte de alimento em laboratório diferem em seu conteúdo de macronutrientes, especialmente carboidratos (BROOKS; LIANG; WATTS, 2009; MACNEIL; LESLEY, 2013). Uma constatação é que a amostras *E. coli* OP50 contém de três a cinco vezes menos carboidratos em comparação com as amostras HT115 e HB101 (BROOKS; LIANG; WATTS, 2009; ZEČIĆ; DHONDT; BRAECKMAN, 2019).

A célula da *E. coli* em média é muito rica em nitrogênio, e seu peso seco compreende aproximadamente 55% de proteína, 23% de ácidos nucleicos (20% de RNA e 3% de DNA), 7-9% de lipídeos e 6% de carboidratos, enquanto vitaminas, co-fatores e íons compreendem aproximadamente 4% do peso seco (ALBERTS et al., 2008; BREMER; DENNIS, 2008; ZEČIĆ; DHONDT; BRAECKMAN, 2019).

Estratégias para o uso de C. elegans como modelo animal

O potencial experimental e as semelhanças entre os processos celulares e moleculares presentes em *C. elegans* e outros animais ao longo do tempo evolutivo (metabolismo, estrutura e função das organelas, regulação de genes, biologia de proteínas, etc.) fizeram do *C. elegans* um excelente organismo para estudar a biologia geral dos metazoários (CORSI; WIGHTMAN; CHALFIE, 2015).

Pelo menos 38% dos genes que codificam proteínas de *C. elegans* são preditos ortólogos no genoma humano (SHAYE; GREENWALD, 2011), 60-80% dos genes humanos têm um ortólogo no genoma do *C. elegans* (KALETTA; HENGARTNER, 2006), e 40% dos genes conhecidos por estarem associados a doenças humanas têm ortólogos claros no genoma de *C. elegans* (CULETTO; SATTELLE, 2000). Assim, muitas descobertas em *C. elegans* têm relevância para o estudo da saúde e das doenças humanas (CORSI; WIGHTMAN; CHALFIE, 2015).

O *C. elegans* tem sido usado como um modelo animal em uma variedade de experimentos, incluindo teste de susceptibilidade aos antimicrobianos e experimentos com patógenos humanos, devido às inúmeras vantagens sobre outros modelos animais, como demonstrados na Quadro 2 (CHELLIAH et al., 2018; KURZ; EWBANK, 2000).

Quadro 2 – Comparação entre o modelo murino e nematódeo para o estudo das interações patógeno-hospedeiro

Comparação entre o modelo murino e nematódeo para o estudo das interações patógeno-hospedeiro				
Propriedade	Murino	C. elegans		
Complexidade do organismo	Alto	Baixo		
Custo	Alto	Baixo		
Tamanho	10 cm	1 mm		
Ciclo de vida	8 semanas	3 dias		
Reprodução	Fertilização cruzada	Auto-fertilização		
Variação genética ^a	Moderado à alto	Insignificante		
Genoma sequenciado	2003 (?)	Completo		
Mutagênese	Impossível	Rotina		
Mapa genético	Possível	Rotina		
Geração de linhagens transgênicas	Muitos meses	Muitos dias		
Geração de knockouts funcionais	Muitos meses	Muitos dias ^b		
Clonagem posicional	Difícil	Rotina		
Patógenos conhecidos	Muitos	Poucos		
Imunidade adaptativa	Sim	Não		
Imunidade inata	Sim	Sim		
Relevância biológica	Confirmado	Potencial		

Legenda: ^aentre indivíduos da mesma linhagem; ^bsilenciamento de genes por RNA-*triggered*. Fonte: KURZ; EWBANK, 2000

Observa-se que uma variedade de bactérias possui a capacidade de infectar o *C. elegans.* Utilizam-se normalmente os estágios de desenvolvimento L4 ou adultos jovens para se alimentarem de tapetes bacterianos semeados em meios de cultura específicos, e, assim, acompanhar o início da patogênese até a morte ou alteração fenotípica dos nematódeos (DARBY, 2005).

C. elegans serve, portanto, de modelo para estudar a infecção e a resposta à infecção por vários patógenos bacterianos, microporídeos e vírus que colonizam o sistema digestivo (BALLA; TROEMEL, 2013; DARBY, 2005; DIOGO; BRATANICH, 2014).

Os nematódeos, assim como organismos mais complexos, são capazes de tomar decisões com base na presença e qualidade de alimentos no ambiente (SHTONDA; AVERY, 2006), o que significa que os vermes podem aprender a procurar alimentos que melhor apoiem seu crescimento, assim como evitar alimentos de baixa qualidade, incluindo bactérias patogênicas (SHTONDA; AVERY, 2006; ZEČIĆ; DHONDT; BRAECKMAN, 2019; ZHANG; LU; BARGMANN, 2005).

O olfato é uma modalidade sensorial importante para *C. elegans*, permitindo a detecção de alimentos, patógenos e predadores. Populações proliferativas de *C. elegans* são encontradas principalmente em frutos podres caídos, onde as concentrações de oxigênio (O₂) são baixas. Como outros animais, *C. elegans* responde de maneira flexível a odores e gases, modulando seu comportamento com base em contextos internos e externos. A modulação contextual de comportamentos olfativos permite que os vermes tomem decisões comportamentais apropriadas em seu ambiente atual (RENGARAJAN; HALLEM, 2016).

A ingestão de alimentos por *C. elegans* é mediada pela faringe, um órgão neuromuscular tubular, que filtra o alimento particulado de uma suspensão líquida (AVERY; THOMAS, 1997), o concentra e tritura, e o transporta ao lúmen intestinal (DONCASTER, 1962), onde os nutrientes são absorvidos pelas células intestinais (ZEČIĆ; DHONDT; BRAECKMAN, 2019).

O bombeamento da faringe dos animais depende da disponibilidade e da qualidade dos alimentos; por exemplo, os animais bombeiam mais quando estão com fome e menos quando estão satisfeitos (AVERY; SHTONDA, 2003). Para *C. elegans*, diferenças na quantidade de vitaminas ou outros nutrientes no meio de cultura podem influenciar na expressão gênica, fertilidade, grau de crescimento, resistência ao patógeno, tempo de vida, assim como no grau de apresentação de um fenótipo (PHO; MACNEIL, 2019).

Durante os ensaios, agentes químicos podem ser usados para pausar, sincronizar ou impedir processos específicos com sucesso, porém, podem também conferir efeitos inesperados a contextos genéticos específicos. Para evitar essa variável no experimento, sem causar a esterilidade genética ou química induzida nos nematódeos, os ensaios de longevidade requerem a transferência dos vermes para novas placas a fim de separá-los de seus descendentes. Este processo pode danificar os animais e causar estresse. A avaliação da propagação e longevidade de *C. elegans* em um tapete bacteriano torna-se potencialmente difícil quando os efeitos de nutrientes ou agentes químicos estão sendo testados no meio de cultura (PHO; MACNEIL, 2019).

Muitos fatores ambientais e físico-químicos como temperatura, concentração de oxigênio, salinidade, presença de luz, umidade e a própria dieta, podem afetar diretamente os nematódeos alterando seu fenótipo e comportamento, como ilustrado na Figura 4. Um exemplo é a umidade das placas de ágar. Naturalmente, elas perdem 2% de água por dia à temperatura ambiente (ZHAO et al., 2003), ou seja, a idade das placas pode ser uma fonte de variabilidade quando se realizam ensaios comportamentais, pois os vermes adultos evitam as áreas mais úmidas (RUSSEL et al., 2014; WANG et al., 2016), porém se movimentam menos em áreas mais secas na placa de ágar (PHO; MACNEIL, 2019).



Figura 4 – Fontes de variabilidade no estudo de C. elegans



Mecanismos de defesa de C. elegans contra patógenos

Sabe-se que *C. elegans* pode exibir o comportamento de evitar diferentes tipos de microrganismos patogênicos. Através de quimiorreceptores e mecanorreceptores, eles podem sentir e distinguir diferentes compostos bacterianos à sua volta (PRADEL et al., 2007; ZHANG; LU; BARGMANN, 2005). A elucidação genética subjacente a esse comportamento ainda não está totalmente descrita (BOGAERTS et al., 2010).

Foi visto que, *tol-1*, um homólogo do receptor do tipo Toll em *D. melanogaster*, desempenha um papel importante em *C. elegans*. Linhagens mutantes de *C. elegans* para esse receptor são deficientes em evitar bactérias patogênicas, como *Serratia marcencens* (PUJOL et al., 2001). Além disso, a ativação da via do receptor semelhante à insulina (ILR) suprime essa resposta etológica (HASSHOFF et al., 2007).

Estudos também indicam que há uma regulação neural da imunidade inata, bem como o comportamento de evitar patógenos. Receptores acoplados à proteína G (GPCRs) podem ser parte de um circuito neural, que integra sinais de áreas infectadas ou de patógenos e que subsequentemente convertem esses sinais em uma resposta de defesa apropriada (KAO; LOS; AROIAN, 2008; SCHULENBURG; EWBANK, 2007). Foi demonstrado que animais deficientes em NPR-1, um homólogo do receptor Y neuropeptídeo em mamíferos, mostrou uma diminuição na prevenção contra patógenos e uma diminuição da resposta imune inata (ABALLAY, 2009; REDDY et al., 2009).

Caso a interação com o patógeno seja inevitável, a primeira linha de defesa do animal é a barreira física. Esta consiste em uma cutícula que forma a interface entre o verme e o ambiente, e a faringe que fragmenta toda a ingestão oral de microrganismos. Se o patógeno conseguir ultrapassar essas barreiras, ele será detectado por moléculas de reconhecimento de patógenos (BOGAERTS et al., 2010). A detecção resulta na ativação e interação de sete principais cascatas de sinalização: a proteína quinase ativada por mitógeno p38 (MAPK), o receptor semelhante à insulina (ILR), o receptor Toll-like (TLR), o fator de crescimento transformador- β (TGF- β), a morte celular programada (PCD), a quinase regulada por sinal extracelular (ERK) e uma cinase N-terminal c-Jun (JKN) (BOGAERTS et al., 2010).

Kaplan et al. (2009) sugeriram que o *C. elegans* pode atrair seu alimento bacteriano e provavelmente capaz de regular parcialmente a virulência de patógenos bacterianos inibindo sistemas específicos de quórum sensing.

Efeitos patogênicos em C. elegans

Os nematódeos começaram a se alimentar de bactérias antes do surgimento dos vertebrados, logo, os mecanismos microbianos para afastá-los ou torná-los uma fonte de alimento provém de uma história evolutiva de origem mais antiga do que com hospedeiros mamíferos. Provavelmente, mecanismos microbianos que provocam doenças em humanos são adaptações de vias que evoluíram primeiramente como defesa contra nematódeos. Em vista da dificuldade de realizar-se experimentos em modelos vertebrados, o *C. elegans* tornou-se um modelo animal que pode fornecer informações sobre os mecanismos de virulência microbianos. Os efeitos patogênicos em *C. elegans* podem ser divididos em duas categorias: na primeira, o nematódeo pode ser infectado pelo microrganismo diretamente, onde a presença do patógeno
no interior do verme ou aderido à sua cutícula provoca a morte ou doença; na segunda, os produtos secretados por microrganismos como toxinas provocam os sintomas ou morte, e o nematódeo não necessita estar diretamente em contato com o microrganismo. Existem patógenos, como *Pseudomonas aeruginosa* que para causar a morte do nematódeo tanto colonizam quanto produzem toxinas, sendo a patogênese, por vezes, multifatorial (DARBY, 2005).

Darby (1999) analisou que quando a amostra *P. aeruginosa* PAO1 foi cultivada em meio *Brain Heart Infusion* (BHI), os vermes expostos ao inóculo crescido *overnight* à 37 °C em ágar BHI ficaram paralisados e morreram dentro de 4 horas. Uma toxina ainda não identificada, sob controle de reguladores de quórum-sensing *LasR* e *RhlR*, provocou uma paralisia letal no nematódeo. A mutagênese aleatória de *C. elegans* e a seleção de mutantes resistentes levaram à descoberta de que a proteína EGL-9, de função desconhecida, mas conservada em vertebrados, é importante para a susceptibilidade à paralisia. Significativamente, a maioria dos fatores de virulência importantes na morte rápida ou lenta de *C. elegans* também está implicada na virulência de *P. aeruginosa* em modelos mamíferos, evidenciando a existência de mecanismos comuns de virulência.

Foi analisado que outra amostra *P. aeruginosa* PA14 pode matar o nematódeo de duas maneiras distintas dependendo da quantidade de nutrientes em seu meio de crescimento. Foi visto que, em meio com baixo teor de sal, a *P. aeruginosa* PA14 mata *C. elegans* de maneira lenta através do acúmulo de bactérias nos intestinos dos vermes, e como consequência, os vermes morrem ao longo de um período de 2-3 dias. No entanto, em um meio rico em nutrientes e com alto teor de sal, os vermes são mortos em 2-4 horas pela produção de toxinas difusíveis (KURZ; EWBANK, 2000; TAN; MAHAJAN-MIKLOS; AUSUBEL, 1999).

Através de outros estudos com *P. aeruginosa* PA14, também foi analisado que *C. elegans* exibe aprendizado olfativo associativo: vermes *naive* que nunca ingeriram a bactéria patogênica mostram atração leve ou nenhuma preferência por seu odor, enquanto que os vermes que ingeriram PA14 o evitam (HARRIS et al., 2014). Adicionalmente, foi descoberto que se *C. elegans* for exposto à *P. aeruginosa* PA14 no início do desenvolvimento, ocorre impressão olfativa: os vermes formam uma memória aversiva das bactérias patogênicas que perduram até a idade adulta (JIN; POKALA; BARGMANN, 2016).

Hodgkin et al. (2013) encontraram durante uma investigação na localidade de Capa Verde, dois patógenos corineformes, chamados de Verde1 e Verde2, do gênero *Leucobacter*, que causavam processos patogênicos distintos em *C. elegans*. O patógeno nomeado Verde1 foi capaz de causar a agregação irreversível dos nematódeos pela região anal, levando à formação do fenótipo conhecido como *worm-star*. Os vermes adultos presos nesses agregados ficavam imobilizados e consequentemente morriam, com o concomitante crescimento bacteriano. Alguns vermes no estágio L4, eram capazes de praticar autofagia e dividir seus corpos em duas partes visando fugir do *worm-star* (HODGKIN et al., 2013). O outro patógeno estudado, chamado de Verde2, causava a morte dos vermes após a invasão na região anal, levando à um inchaço e deformação que reduzia a mobilidade e levava o nematódeo à morte, esse fenótipo é conhecido como *Dar* (Deformed anal region) (HODGKIN; CLARK; GRAVATO-NOBRE, 2014).

Foi observado também, que quando os nematódeos foram crescidos em placa contendo o tapete bacteriano da amostra Verde1, os vermes foram capazes de crescer e se reproduzir ainda que lentamente e com movimento prejudicado. Contudo, o fenótipo *Dar*, ou seja, o inchaço na região anal, não foi observado durante a interação. Apesar do fenótipo não se manifestar, a amostra Verde1 provocou uma resposta imune inata que foi revelada pela indução do peptídeo antimicrobiano NLP-29. Esse peptídeo é expresso em níveis altos durante a infecção pelo fungo *Drechmeria coniospora*, bem como danos ao epitélio ou condições hiperosmóticas (HODGKIN; CLARK; GRAVATO-NOBRE, 2014).

Jansen et al. (2002) demonstraram que o patógeno *Streptococcus pyogenes* pode matar o *C. elegans* tanto em meio sólido ou líquido, contudo a causa da morte é devida somente à produção de peróxido de hidrogênio pela bactéria.

Sifri et al. (2003) observaram que *Staphylococcus aureus* consegue matar todos os estágios de desenvolvimento do nematódeo, sendo necessário apenas 8 horas de exposição para começar a observar a morte. Além disso, amostras distintas conseguem matar 50% da população em apenas 1 dia. Com base nesses resultados, Bae et al. (2004) descobriram que uma hemolisina, que é secretada para lisar células de hospedeiros mamíferos, também é importante na patogênese do *C. elegans*.

Bolm et al. (2004) observaram isolados de diferentes espécies de estreptococos para verificar se havia produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) por amostras de *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. equi*, *S. equi* subsp. *zooepidermicus*, *S. pneumoniae*, *S. mitis*, *S. oralis*, e, estreptococos do grupo G (*S. zooepidemicus* e *S. canis*). No entanto, para os isolados *S. agalactiae* 0171, *S. agalactiae* 0176 e *S. agalactiae* MM96000115 utilizados no experimento, não se verificou a produção de peróxido de hidrogênio por nenhuma amostra, não afetando, portanto, a viabilidade de *C. elegans*.

No trabalho referido, apenas a capacidade para produção de peróxido de hidrogênio de poucas amostras de *S. agalactiae* foi avaliada como a única causa da diminuição da viabilidade

dos helmintos, porém, não há dados na literatura sobre mudanças fenotípicas, comportamentais e colonização dos helmintos.

Naji et al. (2018) verificaram que *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis*, mataram *C. elegans* através da produção de peróxido de hidrogênio. Além disso, as amostras de *S. gordonii* testadas foram capazes de colonizar o intestino do verme, em oposição ao estudo de Jansen et al. (2002), que não houve colonização dos helmintos por S. *pyogenes*.

Os estudos acerca de amostras de *Streptococcus spp*. mostraram a produção de peróxido de hidrogênio como principal alvo de investigação da morte do modelo helminto. Não há dados recentes na literatura de amostras de *S. agalactiae* com o modelo *C. elegans*.

1 **OBJETIVOS**

1.1 Geral

O objetivo do presente estudo foi avaliar pela primeira vez, o potencial patogênico de diferentes isolados de *S. agalactiae* no modelo *C. elegans*. Sendo assim, estudos que possam contribuir para o esclarecimento dos mecanismos que o *S. agalactiae* utiliza para o desenvolvimento da patogênese e, consequentemente, para o tratamento e a redução da mortalidade envolvida nas infecções invasivas são relevantes.

1.2 Específicos:

- a) avaliar o potencial patogênico de S. agalactiae no modelo C. elegans;
- b) avaliar quantitativamente e qualitativamente a colonização de *C. elegans* durante a interação com o *S. agalactiae*;
- c) avaliar quantitativamente e qualitativamente o comportamento do *C. elegans* através da quimiotaxia;
- d) avaliar qualitativamente mudanças fenotípicas de *C. elegans* durante a interação com *S. agalactiae*;
- e) avaliar quantitativamente e qualitativamente o efeito de diferentes isolados de *S. agalactiae* no modelo *C. elegans*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras bacterianas e condições de crescimento

Nos experimentos foram utilizadas cinco amostras de *S. agalactiae*: as amostras de *S. agalactiae* GBS90356 selvagem e GBS90356-proteína verde fluorescente (GFP), pertencente ao tipo capsular III e ST-17, isolada de líquor de paciente recém-nascido; as amostras de *S. agalactiae* GBS1428 selvagem e GBS1428-GFP, pertencente ao tipo capsular III e sequência-tipo 17, isolada de paciente oncológico; e a amostra GBS110, pertencente ao tipo capsular II isolada de mastite bovina. As amostras GBS90356-GFP e GBS1428-GFP foram produzidas pela Glenda durante o doutorado-sanduíche nos Estados Unidos.

Os microrganismos foram identificados e tipados de acordo com a metodologia descrita por Poyart et al. (2007). A cultura bacteriana foi armazenada a -70°C em alíquotas de meio líquido *Brain Heart Infusion* (BHI; Difco Laboratories, Le Pont de Claix, France) contendo 20% de glicerol.

Para a realização dos experimentos, as amostras de *S. agalactiae* foram crescidas em placas de Agar Müeller-Hinton contendo 5% de hemácias de carneiro (Plast Labor LTDA, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e, posteriormente em meio BHI para padronização da densidade óptica (DO) de 0,4 unidades de densidade óptica (UDO) em h= 540nm (~1x10⁸ unidades formadoras de colônia por mililitro [UFC/mL]).

Para a realização dos ensaios de fluorescência, as amostras GBS90356-GFP e GBS1428-GFP foram crescidas em placas de *Tryptic Soy Agar* (TSA) contendo eritromicina (5 ug/mL) e, posteriormente em meio *Brain Heart Infusion* (BHI; BBLTM Infusion Broth, Cockeysville, Maryland, EUA) contendo eritromicina (5 ug/mL) para padronização da DO de 0,4 UDO em δ = 540nm.

A amostra *C. ulcerans* 809 foi utilizada como controle positivo. A bactéria foi crescida como descrito por Antunes et al. (2016) em meio líquido BHI para padronização da DO de 1,0 UDO em Λ = 580nm. A amostra *E. coli* OP50 foi crescida em caldo Luria (Kasvi, Laboratorios Conda S.A, Espanha) *overnight* a 37 °C conforme descrito por Brenner (1974) e Byerly et al. (1976).

2.2 Manutenção do C. elegans

A linhagem selvagem *C. elegans* Bristol N2 foi mantida em placas de ágar *Nematode Growth Medium* (NGM) previamente semeadas com *E. coli* OP50 e incubada a 20 °C num período de 4-7 dias até que fosse necessário transferir parte da população para uma nova placa de NGM ou usá-los para realização de experimento dentro desse período.

2.3 Ensaio de sobrevivência de C. elegans em meio sem tetraciclina

Para os ensaios de infecção, 20 μL da suspensão bacteriana das amostras teste (GBS90356, GBS1428 e GBS110) e das amostras controle (*C. ulcerans* 809 e *E. coli* OP50) obtidas a partir de uma cultura *overnight* a 37 °C, foram semeados em placas de NGM suplementado com 0,5% de extrato de levedura (Difco) e 0,5% de glicose anidra (Proquimios, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), conforme descrito por Ashwinkumar et al. (2015) e incubadas a 37 °C/24h. Os nematódeos em estágio larval L4 foram transferidos das placas de manutenção para placas estéreis de NGM suplementado, onde foi adicionado 5 mL de tampão M9 (3 g KH₂PO₄, 6 g Na₂HPO₄, 5 g NaCl,, 1 mL 1M MgSO₄, 1 L H₂O) contendo 25µg/mL de ácido nalidíxico para matar a *E. coli* OP50. Os nematódeos ficaram durante 30 min sob agitação.

Em seguida, os nematódeos foram transferidos para eppendorfs onde foram lavados com tampão M9 puro, centrifugados três vezes durante 30 s a 3000 rpm. Posteriormente, os nematódeos foram transferidos novamente para placas estéreis de NGM suplementado para secarem, e, por fim, 20 vermes foram transferidos para as placas de NGM suplementado contendo o inóculo bacteriano. Os vermes foram observados durante 5 dias consecutivos, e os resultados de vivos, mortos e sumidos foram quantificados. O experimento foi realizado em triplicata.

2.4 Ensaio de sobrevivência de C. elegans em meio com tetraciclina

Este experimento foi realizado conforme descrito por Garsin et al. (2001) que demonstraram a utilização de diferentes antibióticos como tetraciclina, gentamicina e polimixina B, com o intuito de inibir o crescimento da *E. coli* OP50 durante os ensaios, permitindo somente o crescimento das amostras teste. A tetraciclina foi escolhida para este experimento pela resistência observada pelas amostras GBS90356, GBS1428 e *C. ulcerans* 809, com a concomitante inibição do crescimento da *E. coli* OP50, na concentração de 6 μ g/mL. A amostra GBS110 também mostrou sensibilidade para a concentração de 6 μ g/mL, não sendo utilizada nos experimentos envolvendo a utilização de tetraciclina no meio de cultura.

Para os ensaios de infecção, 20 μ L da suspensão bacteriana das amostras teste GBS90356 e GBS1428 e da amostra controle *C. ulcerans* 809 obtidas a partir de uma cultura *overnight* a 37 °C foram semeadas em placas de NGM suplementado contendo 6 μ g/mL de tetraciclina, e incubadas a 37 °C/24 h. Posteriormente, os nematódeos em estágio larval L4 foram transferidos diretamente das placas de manutenção para placas de NGM suplementado contendo o inóculo bacteriano. Os vermes foram observados durante 5 dias consecutivos, e os resultados de vivos, mortos e sumidos foram quantificados.

2.5 Quantificação bacteriana no intestino do C. elegans

Este experimento foi realizado conforme descrito por Kong et al. (2014). Para os ensaios de quantificação de UFC/mL, 20 μ L da suspensão bacteriana das amostras teste GBS90356 e GBS1428 obtidas a partir de uma cultura *overnight* a 37 °C foram semeadas em placas de NGM suplementado contendo 6 μ g/mL de tetraciclina e incubadas a 37 °C/24 h. O uso de tetraciclina no meio foi usado para inibir o crescimento da *E. coli* OP50 durante o ensaio de sobrevivência. Em seguida, os nematódeos em estágio larval L4 foram transferidos diretamente das placas de manutenção para placas de NGM suplementado contendo a amostra teste.

Posteriormente, a cada 24h de interação, cinco nematódeos foram randomicamente transferidos para placas estéreis de NGM suplementado e lavados com M9 puro. Em seguida,

os vermes foram transferidos para eppendorfs para serem macerados em 20 μ L de tampão M9 contendo 1% de Triton X.

Alíquota do lisado (10 μ L) foi utilizada para realizar diluição seriada em eppendorfs com 90 μ L de tampão M9 puro. Após a diluição seriada, 10 μ L de cada diluição foi plaqueada em placas de NGM suplementado contendo 6 μ g/mL de tetraciclina. As colônias foram quantificadas após incubação das placas a 37 °C por 24 h.

2.6 Quimiotaxia

Este experimento foi realizado conforme descrito por Antunes et al. (2016). Para a realização deste ensaio, 20 μ L de duas suspensões bacterianas distintas, obtidas a partir de uma cultura *overnight* a 37 °C, foram semeadas em placas de NGM suplementado em lados opostos e equidistantes do meio e incubadas a 37 °C/24 h.

Um dos inóculos semeados na placa foi apenas de uma amostra teste (GBS90356 ou GBS1428 ou GBS110) enquanto o outro inóculo foi sempre o controle negativo *E. coli* OP50. Os inóculos foram plaqueados em pontos equidistantes da placa para avaliar a preferência pela alimentação pelo helminto em tempos determinados.

Em seguida, 20 vermes foram transferidos das placas de manutenção para as placas contendo a amostra teste (GBS90356, ou GBS1428, ou GBS110) e o controle negativo *E. coli* OP50. Os helmintos foram posicionados no centro da placa em igual distância dos inóculos. A preferência dos vermes por cada inóculo foi registrada nos tempos de 1 h, 2 h e 24 h.

2.7 Microscopia de luz de C. elegans

Este experimento foi realizado conforme descrito por Ashwinkumar et al. (2015). Para a realização deste ensaio, 20 μ L da suspensão bacteriana das amostras teste (GBS90356, GBS1428 e GBS110), controle positivo (*C. ulcerans* 809) e controle negativo (*E. coli* OP50) foram obtidos a partir de uma cultura *overnight* a 37 °C, semeadas em placas de NGM suplementado e incubadas a 37 °C/24 h. Os nematódeos em estágio larval L4 foram transferidos das placas de manutenção para placas estéreis de NGM suplementado, onde foi adicionado 5 mL de tampão M9 contendo 25 µg/mL de ácido nalidíxico para matar a *E. coli* OP50. Os nematódeos ficaram durante 30 min sob agitação.

Em seguida, os nematódeos foram transferidos para eppendorfs onde foram lavados com tampão M9 puro centrifugados três vezes durante 30 s a 3000 rpm. Posteriormente, os nematódeos foram transferidos novamente para placas estéreis de NGM suplementado para secarem, e, por fim, 20 vermes foram transferidos para as placas de NGM suplementado contendo o inóculo da amostra teste. Os vermes foram observados durante 5 dias consecutivos.

A observação da alteração morfológica dos helmintos foi registrada em imagens de microscopia no último dia de interação no tempo de 120 h com as amostras teste (GBS90356, GBS1428 e GBS110) e o controle positivo (*C. ulcerans* 809). Os vermes foram randomicamente selecionados, montados em uma lâmina de vidro onde receberam uma gota de tampão M9 contendo azida sódica (20 mM) para promover sua paralisia. Posteriormente, as alterações morfológicas foram observadas por microscopia de luz (Nikon C-DSD 230).

2.8 Microscopia de fluorescência de C. elegans

Este experimento foi realizado conforme descrito por Antunes et al. (2016) com modificações. Para a realização deste ensaio, 20 μ L da suspensão bacteriana das amostras GBS90356-GFP ou GBS1428-GFP, obtidas a partir de uma cultura *overnight* a 37 °C, foram semeados em placas de NGM suplementado contendo 5 μ g/mL de eritromicina e incubadas a 37 °C/24 h. Em seguida, 20 vermes foram transferidos das placas de manutenção para as placas contendo o inóculo bacteriano GBS90356-GFP ou GBS1428-GFP.

Após 24 h de interação com as amostras GBS90356-GFP ou GBS1428-GFP, os vermes foram transferidos de volta para as placas de manutenção contendo *E. coli* OP50 por mais 24 h para permitir a limpeza do intestino, de debris celulares e do excesso de bactérias aderidas externamente.

Em seguida, os vermes foram transferidos para placas estéreis de NGM suplementado e lavados com tampão M9 puro, e, então, foram randomicamente selecionados, montados em uma lâmina de vidro onde receberam uma gota de tampão M9 contendo azida sódica (20 mM) para promover sua paralisia. Posteriormente, a colonização do intestino do verme foi observada utilizando microscopia de fluorescência (Leica DMR).

2.9 Microscopia de luz de C. elegans formando worm-star

Este experimento foi realizado conforme descrito por Antunes et al. (2016) com modificações. Primeiramente, uma placa de manutenção não sincronizada no período de 4-7 dias foi utilizada no experimento. A placa de manutenção foi lavada com 5 mL de M9 puro, o lavado foi centrifugado em eppendorfs três vezes durante 30 s a 3000 rpm. O sobrenadante foi descartado e os vermes foram homogeneizados em tubo falcon de 50 mL. Em seguida, 100 μ L (~ 70 vermes) foram distribuídos por poço na placa de cultura de células de 24 poços (Kasvi), onde previamente foram adicionados 500 μ L de tampão M9 contendo 6 μ g/mL de tetraciclina. Alíquotas das amostras GBS90356 ou GBS1428 foram obtidas a partir de uma cultura *overnight* a 37 °C e colocadas em cada poço em diferentes concentrações: 50 μ L (~ 5 × 10⁶ UFC/mL), 100 μ L (~ 1 × 10⁷ UFC/mL), 150 μ L (~ 1,5 × 10⁷ UFC/mL) ou 200 μ L (~ 2 × 10⁷ UFC/mL) e incubadas por 72 h a 20 °C.

Em seguida, os vermes foram randomicamente selecionados, montados em uma lâmina de vidro onde receberam uma gota de tampão M9 contendo azida sódica (20 mM) para promover sua paralisia. Posteriormente, foram observados utilizando microscopia de luz (Nikon C-DSD 230).

2.10 Microscopia de fluorescência de C. elegans formando worm-star

Este experimento foi realizado conforme descrito por Antunes et al. (2016) com modificações. Primeiramente, uma placa de manutenção não sincronizada no período de 4-7 dias foi utilizada no experimento. A placa de manutenção foi lavada com 5 mL de M9 puro, o lavado foi centrifugado em eppendorfs três vezes durante 30 s a 3000 rpm. O sobrenadante foi descartado e os vermes foram homogeneizados em tubo falcon de 50 mL.

Em seguida, 100 µL foram distribuídos por poço na placa de cultura de células de 24 poços (Kasvi), onde previamente foram adicionados 500 µL de tampão M9 contendo 6 µg/mL de tetraciclina. Alíquotas das amostras GBS90356-GFP ou GBS1428-GFP foram obtidas a partir de uma cultura *overnight* a 37 °C e colocadas em cada poço em diferentes volumes: 50 µL (~ 5×10^6 UFC/mL), 100 µL (~ 1×10^7 UFC/mL), 150 µL (~ 1.5×10^7 UFC/mL) ou 200 µL (~ 2×10^7 UFC/mL). A placa de 24 poços foi deixada na incubadora a 20 °C por 72 h.

Em seguida, os vermes foram randomicamente selecionados, montados em uma lâmina de vidro onde receberam uma gota de tampão M9 contendo azida sódica (20 mM) para promover sua paralisia. Posteriormente, a colonização do intestino do verme foi observada utilizando microscopia de fluorescência (Leica DMR).

2.11 Quantificação e análise estatística

Os resultados foram analisados e tratados estatisticamente (análises paramétricas e não paramétricas) através de programa estatístico Prisma (GraphpadPrism versão 4.0) e diferenças foram consideradas significativas quando P < 0,05. Cada ensaio foi realizado em triplicata em, pelo menos, três experimentos independentes. Foram utilizados, além da estatística descritiva padrão (cálculos de média, mediana, máximo e mínimo, desvio padrão e erro padrão), Mantel-Cox e Gehan-Breslow-Wilcoxon (ensaios de sobrevivência de *C. elegans* frente às amostras de *S. agalactiae* e avaliação da influência de antimicrobianos sobre estas interações); os testes de Tukey (ANOVA) e/ou teste T de *Student* não pareado (ensaios de colonização e quimiotaxia) e/ou de acordo com os ensaios analisados.

3 RESULTADOS

3.1 Ensaio de sobrevivência de *C. elegans* em meio sem tetraciclina

Dentre os *S. agalactiae* analisados, a amostra clínica GBS90356 isolada de líquor de neonato apresentou maior toxidade para o modelo helminto (P=0,0008), seguida da amostra animal GBS110 isolada de mastite subclínica bovina (P=0,0108) e da amostra GBS1428 isolada de paciente oncológico (P=0,0108), conforme demonstrado na Figura 5.



Figura 5 – Ensaio de sobrevivência de C. elegans em meio sem tetraciclina

Nota: Porcentagem de sobrevivência dos vermes durante interação com as amostras controle (*C. ulcerans* 809 e *E. coli* OP50) e com as amostras teste (GBS90356, GBS1428 e GBS110). Análise estatística: Mantel-Cox e Gehan-Breslow-Wilcoxon.
Fonte: O autor, 2020.

3.2

Para a amostra clínica *C. ulcerans* 809, a interação não foi afetada pela na presença de tetraciclina por até 5 dias de interação (*P*=0,4930), conforme demonstrado na Figura 6.

Ensaio de sobrevivência de C. elegans em meio com tetraciclina

Figura 6 – Comparação do efeito do antimicrobiano tetraciclina no experimento de sobrevivência utilizando a amostra clínica *C. ulcerans* 809



Nota: Porcentagem de sobrevivência dos vermes durante interação com a amostra *C. ulcerans* 809 (meio sem tetraciclina) e *C. ulcerans* 809 ATB (meio com tetraciclina). Análise estatística: Mantel-Cox e Gehan-Breslow-Wilcoxon.

Fonte: O autor, 2020.

Interessantemente, no caso das amostras clínicas GBS90356, isolada de líquor de neonato (P=0,0168) e GBS1428 isolada de paciente oncológico (P=0,0036), a presença do antimicrobiano culminou com o aumento da mortalidade dos helmintos, conforme demonstram as Figuras 7 e 8, respectivamente.

Figura 7 – Comparação do efeito do antimicrobiano tetraciclina no experimento de sobrevivência utilizando a amostra clínica GBS90356



Nota: Porcentagem de sobrevivência dos vermes durante interação com a amostra GBS90356 (meio sem tetraciclina) e GBS90356 ATB (meio com tetraciclina). Análise estatística: Mantel-Cox e Gehan-Breslow-Wilcoxon.

Fonte: O autor, 2020.

Figura 8 – Comparação do efeito do antimicrobiano tetraciclina no experimento de sobrevivência utilizando a amostra clínica GBS1428



Nota: Porcentagem de sobrevivência dos vermes durante interação com a amostra GBS1428 (meio sem tetraciclina) e GBS1428 ATB (meio com tetraciclina). Análise estatística: Mantel-Cox e Gehan-Breslow-Wilcoxon.

Fonte: O autor, 2020.

3.3 Quantificação bacteriana no intestino do *C. elegans*

Os ensaios de colonização revelaram que as amostras GBS90356 e GBS1428 foram capazes de se ligar em intensidades diversas ao trato digestivo de *C. elegans*, conforme demonstrado na Figura 9 e Figura 10, respectivamente.

Para a amostra GBS90356 foi observado um aumento do número de bactérias aderidas ao trato intestinal do modelo helminto após o tempo de 72 h (P=0,0032 **) e estabilização na quantidade de bactérias após o tempo de 96 h (P=0,1499, Figura 9).





Legenda: ***P*=0,0032.

Nota: Quantificação da amostra GBS90356 aderida no trato intestinal de *C. elegans*. Análise estatística: testes de Tukey (ANOVA) e/ou teste T de Student não pareado.
 Fonte: O autor, 2020.

Para a amostra GBS1428 foi observado um aumento na quantidade de bactérias em 48 h (P<0,0001 ***), seguido de redução no número de bactérias entre 48 e 96 h (P<0,001 **). Após 96 h houve um discreto aumento do número de bactérias aderidas no trato intestinal do modelo helminto (P<0,0001 ***, Figura 10).



Figura 10 – Quantificação da amostra clínica GBS1428 no trato intestinal de C. elegans

Legenda: ***P*<0,001 e ****P*=0,0001.

Nota: Quantificação da amostra GBS1428 aderida no trato intestinal de *C. elegans*. Análise estatística: testes de Tukey (ANOVA) e/ou teste T de Student não pareado.
 Fonte: O autor, 2020.

3.4 Microscopia de luz de *C. elegans*

Após cinco dias de interação com as amostras GBS110 (Figura 11), GBS90356 (Figura 12), GBS1428 (Figura 13) e *C. ulcerans* 809 (Figura 14), os vermes apresentaram o fenótipo <u>**D**</u>eformation <u>anal region</u> (*Dar*) () e os vermes que interagiram com as amostras GBS90356 e *C. ulcerans* 809 apresentaram dilatação da vulva, conforme as Figuras 12 e 14, respectivamente.

- Figura 11 Visualização da alteração de fenótipo após 120 h de interação com a amostra GBS110

- Legenda: Visualização do fenótipo *Deformation anal region (Dar*, seta branca) em diferentes vermes (A, B, C e D) após 120 h de interação com a amostra GBS110 em meio sólido.
- Nota: Aumento de 4x.
- Fonte: O autor, 2020.

- A D С
- Figura 12 Visualização da alteração de fenótipo após 120 h de interação com a amostra GBS90356

Legenda: Visualização do fenótipo Deformation anal region (Dar, seta branca) em diferentes vermes (A, B, C e
D) após 120 h de interação com a amostra GBS90356 em meio sólido e dilatação da vulva (asterisco).Nota:Aumento de 4x.

Fonte: O autor, 2020.





Legenda: Visualização do fenótipo *Deformation anal region (Dar*; setas brancas) em diferentes vermes (A, B, C e D) após 120 h de interação com a amostra GBS1428.

Aumento de 4x (A, C) e 10x (B, D). O autor, 2020. Nota:

Fonte:



Figura 14 - Visualização do fenótipo Dar após 120 h de interação com a amostra C. ulcerans 809

Legenda: Visualização do fenótipo Deformation anal region (Dar, setas brancas) em diferentes vermes (A, B, C e D) após 120 h de interação com a amostra C. ulcerans 809 e dilatação da vulva (asterisco). Aumento de 4x (A) e 10x (B, C, D). Nota: O autor, 2020.

Fonte:

3.5 Microscopia de fluorescência de *C. elegans* em meio sólido

Por microscopia de fluorescência foi observado a colonização em todo o intestino do verme e um aumento na intensidade de fluorescência na porção inicial do intestino, como demonstrado na Figura 15 e Figura 16, respectivamente.

Figura 15 – Visualização da colonização do intestino de *C. elegans* após interação com a amostra GBS1428-GFP



Legenda: Visualização do intestino de *C. elegans* em diferentes vermes (A, B, C e D) após interação com a amostra GBS1428-GFP.

Nota: Observa-se a colonização em todo trato intestinal do helminto e um aumento da intensidade de fluorescência em todos os vermes na porção inicial do intestino (círculo), indicando o local mais colonizado por GBS1428-GFP. Aumento de 4x (A, B, C) e 10x (D).

Fonte: O autor, 2020.

Figura 16 - Visualização da colonização do intestino de *C. elegans* após interação com a amostra GBS90356-GFP



Legenda: Visualização do intestino de *C. elegans* em diferentes vermes (A, B, C e D) após interação com a amostra GBS90356-GFP.

- Nota: Observa-se a colonização em todo trato intestinal do helminto e um aumento da intensidade de fluorescência em todos os vermes na porção inicial do intestino (círculo), indicando o local mais colonizado por GBS90356-GFP.Aumento de 4x (A, B) e 10x (C, D).
- Fonte: O autor, 2020.

3.6 Microscopia de luz de *C. elegans* formando *worm-star*

Os nematódeos foram incubados com as amostras GBS90356 (Figura 17) e GBS1428 (Figura 18) por 72 h com diferentes concentrações bacterianas. Foi observada a formação de

worm-star em todos os poços e os helmintos apresentaram *bagging* na maioria dos poços observados, sendo mais frequente nos poços com a amostra GBS1428.

Na Figura 17C e D, é possível observar que a retenção dos ovos no abdômen dos vermes é maior do que nas Figuras 17A e B. Alguns vermes na Figura 17C estão no início do processo de *bagging*, onde os ovos eclodem no interior do verme adulto levando-o à morte.

Na Figura 18A, B, C e D, foi possível observar que os vermes estão no início do processo de *bagging*, onde os ovos eclodem no interior do verme adulto levando-o à morte.



Figura 17 - Visualização do worm-star após 72 h de interação com amostra GBS90356

Fonte: O autor, 2020.

Legenda: (A) *Worm-star* após 72 h com 50 μL (~ 5x10⁶ UFC/mL) de suspensão bacteriana; (B) *Worm-star* após 72 h com 100 μL (~ 1x10⁷ UFC/mL) de suspensão bacteriana; (C) *Worm-star* após 72 h com 150 μL (~ 1,5x10⁷ UFC/mL) de suspensão bacteriana. Presença de vermes adultos com ovos larvados no abdômen indicando o início do processo de *bagging* (círculo); (D) *Worm-star* após 72 h com 200 μL (~ 2x10⁷ UFC/mL) de suspensão bacteriana.

Nota: Aumento de 10x.



Figura 18 - Visualização do worm-star após 72 h de interação com amostra GBS1428

Legenda:(A) *Worm-star* após 72 h com 50 μL (~ 5x10⁶ UFC/mL) de suspensão bacteriana. Presença de vermes adultos com ovos larvados no abdômen indicando o início do processo de *bagging* (círculo); (B) *Worm-star* após 72 h com 100 μL (~ 1x10⁷ UFC/mL) de suspensão bacteriana; (C) *Worm-star* após 72 h com 150 μL (~ 1,5x10⁷ UFC/mL) de suspensão bacteriana. Presença de vermes adultos com ovos larvados no abdômen indicando o início do processo de *bagging* (círculo); (D) *Worm-star* após 72 h com 200 μL (~ 2x10⁷ UFC/mL) de suspensão bacteriana. Presença de vermes adultos com ovos larvados no abdômen indicando o início do processo de *bagging* (círculo); (D) *Worm-star* após 72 h com 200 μL (~ 2x10⁷ UFC/mL) de suspensão bacteriana. Presença de vermes adultos com ovos larvados no abdômen indicando o início do processo de *bagging* (círculo); (D) *Worm-star* após 72 h com 200 μL (~ 2x10⁷ UFC/mL) de suspensão bacteriana. Presença de vermes adultos com ovos larvados no abdômen indicando o início do processo de *bagging*.

Nota: Aumento de 10x.

Fonte: O autor, 2020.

3.7 Microscopia de fluorescência de *C. elegans* formando *worm-star*

Os nematódeos foram incubados com as amostras GBS90356-GFP (Figura 19) ou GBS1428-GFP (Figura 20) por 72 h com diferentes concentrações bacterianas. Foi possível observar a colonização do intestino do helminto, onde a área mais colonizada foi a porção inicial do intestino, devido ao aumento da intensidade da fluorescência nessa região.



Figura 19 - Visualização do worm-star após 72 h de interação com amostra GBS90356-GFP

Legenda: (A) Worm-star após 72 h com 50 μL (~ 5x10⁶ UFC/mL) de suspensão bacteriana. (B) Worm-star após 72 h com 100 μL (~ 1x10⁷ UFC/mL) de suspensão bacteriana.; (C) Worm-star após 72 h com 150 μL (~ 1,5x10⁷ UFC/mL) de suspensão bacteriana.; (D) Worm-star após 72 h com 200 μL (~ 2x10⁷ UFC/mL) de suspensão bacteriana.
 Nota: Aumento de 10x.

- F t O at 2020
- Fonte: O autor, 2020.



Figura 20 - Visualização do worm-star após 72 h de interação com amostra GBS1428-GFP

Legenda: (A) Worm-star após 72 h com 50 μL (~ 5x10⁶ UFC/mL) de suspensão bacteriana. (B) Worm-star após 72 h com 100 μL (~ 1x10⁷ UFC/mL) de suspensão bacteriana.; (C) Worm-star após 72 h com 150 μL (~ 1,5x10⁷ UFC/mL) de suspensão bacteriana.; (D) Worm-star após 72 h com 200 μL (~ 2x10⁷ UFC/mL) de suspensão bacteriana.
 Nota: Aumento de 10x.

Fonte: O autor, 2020.

3.8 Quimiotaxia

Conforme esperado, durante o experimento de quimiotaxia, os helmintos demonstraram preferência pela amostra de *E. coli* OP50, de natureza não virulenta para este modelo. As amostras de *S. agalactiae* testadas apresentaram valores de interação com o modelo diversos ao longo do tempo indicando não haver permanência dos helmintos nestes inóculos, como demonstra a Figura 21.



Figura 21 - Quimiotaxia de C. elegans frente a amostras de S. agalactiae de origens diversas

Fonte: O autor, 2020.

Os valores absolutos e relativos referentes aos resultados dos ensaios de quimiotaxia encontram-se sumarizados na Tabelas 1 e 2.

 Tabela 1 - Valores absolutos da quimiotaxia de C. elegans frente a amostras de S. agalactiae

 de origens diversas

Amostra	OP50			GBS1428				GBS110		GBS90356			
Tempo	1h	2h	24h	1h	2h	24h	1h	2h	24h	1h	2h	24h	
Média	5,85	2,00	10,43	0,33	1,33	0,0	1,00	1,00	0,0	0,33	1,66	0,33	
Desvio													
Padrão	3,43	1,26	3,82	0,57	1,52	0,0	1,73	1,00	0,0	0,57	2,88	0,57	

Nota: Valores absolutos da quimiotaxia de *C. elegans* pelas amostras GBS90356, GBS1428, GBS110 *e E. coli* OP50.

Amostra	OP50			GBS1428				GBS110		GBS90356		
Tempo	1h	2h	24h	1h	2h	24h	1h	2h	24h	1h	2h	24h
Média	29,29	10,00	52,14	1,66	6,66	0,0	5,00	5,00	0,0	1,66	8,33	1,66
Desvio												
Padrão	17,18	6,325	19,12	2,88	7,63	0,0	8,66	5,00	0,0	2,88	14,43	2,88

Tabela 2 -Valores relativos da quimiotaxia de *C. elegans* frente a amostras de *S. agalactiae* de origens diversas

Nota: Valores relativos da quimiotaxia de *C. elegans* pelas amostras GBS90356, GBS1428, GBS110 *e E. coli* OP50.

Fonte: O autor, 2020.

Adicionalmente, corroborando os dados visualizados no experimento de quimiotaxia, durante o experimento de sobrevivência de 120 h, foi possível observar a preferência, ou seja, a quimiotaxia positiva dos vermes pelo inoculo da amostra *E. coli* OP50, e a quimiotaxia negativa pelas amostras GBS1428, GBS110 e GBS90536.

Durante o experimento de sobrevivência de 120 h, também foi possível observar a maioria da população de *C. elegans* no inóculo da amostra *E. coli* OP50, a partir do primeiro tempo de observação de 24 h, em oposição ao que foi visto para as amostras GBS1428, GBS110, e GBS90536, onde a minoria da população se encontrava no inóculo se alimentando da fonte bacteriana.

A preferência ou não do helminto pela alimentação contínua e restrita por cada amostra se manteve até o final do experimento de sobrevivência de 120 h. As Figuras 22, 23 e 24 exemplificam a resposta dos helmintos quando confrontados somente pela amostra *E. coli* OP50, ou GBS1428 ou GBS90536.



Figura 22 – Visualização da interação de *C. elegans* com a amostra *E. coli* OP50 no tempo de 24 h

Nota: Helmintos se alimentando do inóculo da amostra *E. coli* OP50 no tempo de 24 h de interação. Fonte: O autor, 2020.

Figura 23 – Visualização da interação de *C. elegans* com a amostra GBS1428 no tempo de 24h



Nota: Helmintos se alimentando do inóculo da amostra GBS1428 no tempo de 24 h de interação. Fonte: O autor, 2020.



Figura 24 – Visualização da interação de *C. elegans* com a amostra GBS90356 no tempo de 24h

Nota: Helmintos se alimentando do inóculo da amostra GBS90356 no tempo de 24 h de interação. Fonte: O autor, 2020.

4 DISCUSSÃO

O *S. agalactiae* possui inúmeros mecanismos que contribuem para patogenicidade e virulência (FARLEY, 2001). Sua capacidade de sobrevivência e multiplicação no hospedeiro requer a expressão e regulação de múltiplos fatores de virulência que contribuem para a capacidade da bactéria em aderir, invadir e induzir apoptose ou necrose em células hospedeiras (KORIR et al., 2014; LIONE et al., 2014). A caracterização desses fatores é primordial para melhor compreensão da patogenicidade deste microrganismo. Este é o primeiro trabalho que analisa a interação e os efeitos decorrentes de *S. agalactiae* com *C. elegans*.

Mendonça (2018) detectou através de PCR convencional, a presença genes codificantes para ilhas de patogenicidade e fatores de virulência, incluindo: pilinas (PI-2b, PI-1), ligantes de laminina (lmb) e fibrinogênio (fbs-A e fbs-B) na amostra clínica GBS90356, indicando seu elevado potencial de virulência. Além disso, a amostra clínica GBS1428 isolada de paciente oncológico com infecção urinária e produtora da endonuclease Cas9 foi capaz de colonizar e persistir no trato genito-urinário de camundongos, bem como invadir os tecidos cerebrais (SPENCER et al., 2019).

C. elegans vive em um ambiente microbiano complexo e sua sobrevivência depende da capacidade de distinguir entre bactérias nutritivas e espécies bacterianas patogênicas que podem infectar e matar o animal (MEISEL; KIM, 2014). Um componente substancial de sua defesa contra patógenos é comportamental. Dentro de seis horas de exposição a um patógeno bacteriano, *C. elegans* aprende a evitar o odor bacteriano em um comportamento associativo que se assemelha à aversão condicionada ao paladar, uma forma generalizada de aprendizado animal (MELO; RUVKUN, 2012; ZHANG et al., 2015).

Um dos estudos ligando neurônios específicos a respostas imunes em *C. elegans* demonstrou que NPR-1, um receptor neuronal acoplado a proteína-G (GPCR), foi requerido para respostas imunes a uma variedade de patógenos. Linhagens mutantes *npr-1* de *C. elegans* mostraram susceptibilidade aumentada para *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* e *Enterococcus faecalis* (SINGH; ABALLAY, 2019). No mesmo estudo foi visto que a distensão intestinal causada pela ingestão bacteriana ativou um sinal do receptor do tipo NPY em *C. elegans*, envolvendo o NPR-1 e seus ligantes peptídicos do tipo FMRF, levando à aversão bacteriana. A via de sinalização NPR-1 modulou o comportamento dos helmintos a evitarem áreas com maior concentração de CO₂ e diminuição de O₂. Como os tapetes bacterianos têm alta concentração de CO₂ e baixo O₂ devido ao metabolismo bacteriano, a sinalização NPR-1

integra essas informações e ajuda na decisão do comportamento de prevenção bacteriana (SINGH; ABALLAY, 2019).

No presente estudo, o patógeno *S. agalactiae* demonstrou não ser uma fonte preferencial de alimento durante os ensaios de sobrevivência e quimiotaxia. Os vermes demonstraram quimiotaxia negativa em relação as amostras bacterianas testadas. Uma vez nas placas com as amostras testes de *S. agalactiae*, os vermes após se alimentarem tenderam a fugir da placa de interação ou morreram tentando. Quando confrontados com o inóculo da OP50, os vermes preferencialmente escolheram se alimentar da *E. coli*.

As amostras de *S. agalactiae* GBS90356, GBS1428 e GBS110 mostraram ao longo do experimento de sobrevivência que após 24 horas de interação os vermes já demonstraram aversão pela alimentação por *S. agalactiae*, ocorrendo pouca interação com o inóculo e ocupação da zona marginal da placa. Os resultados da quimiotaxia reforçaram esse dado, uma vez que após 24 horas os vermes demonstraram aversão pelo *S. agalactiae* e preferência pela *E. coli* OP50. Até a presente data não foram encontradas publicações de sobrevivência, quimiotaxia e interações de *S. agalactie* com *C. elegans*. Desta forma, nossos resultados foram comparados com publicações de outros gêneros bacterianos.

Nossos resultados de sobrevivência e quimiotaxia corroboram dados publicados com *P. aeruginosa*, onde *C. elegans* foi capaz de evitar a bactéria patogênica através do aprendizado olfativo aversivo. Além disso, esse patógeno foi capaz de causar a morte do modelo helminto por dois mecanismos distintos já identificados: morte lenta devido a colonização intestinal; e morte rápida pela liberação de toxinas, sendo o meio de cultivo dos ensaios determinante para estabelecer a causa da morte dos helmintos. Observou-se ainda que as vias ativadas do hospedeiro em resposta ao patógeno *P. aeruginosa* foram as vias dependentes de PMK-1, ZIP-2 e FSHR-1 (ESTES; SZUMOWSKI; TROEMEL, 2011; MAHAJAN-MIKLOS et al., 1999; POWELL; KIM; AUSUBEL, 2009; XU et al., 2013; ZHANG et al., 2005).

A amostra de *C. ulcerans* 809 utilizada como controle positivo neste trabalho, apresenta alguns genes de virulência como a *spaD* que codifica uma proteína de superfície e o gene *vsp2* que codifica uma serina protease (TROST et al., 2011). Contudo, esse patógeno não demonstrou a virulência observada em trabalhos anteriores. A hipótese para que essa amostra tenha se mostrado atenuada frente ao modelo helminto, no presente estudo, foram as mudanças das condições do meio de cultura para favorecer o crescimento das amostras de *S. agalactiae*, onde houve a necessidade de adição de extrato de levedura e glicose no meio de cultura, além da não utilização do antimicrobiano ácido nalidíxico, comumente utilizado no meio de cultura

no meio de cultura não demonstrou alteração na viabilidade de *C. elegans* frente à amostra *C. ulcerans* 809. A porcentagem de sobrevivência foi similar ao encontrado nos experimentos de sobrevivência sem o antimicrobiano, demonstrando que a atenuação provavelmente não foi decorrente da utilização do antimicrobiano tetraciclina.

Peixoto et al. (2016) relataram uma alta capacidade de colonização e morte de vermes pela amostra *Corynebacterium diphtheriae* BR-INCA5015 isolada de osteomielite em comparação com as amostras homogêneas toxigênicas ATCC 27012 e ATCC 27010T nãotoxigênicas. A produção de toxina não foi necessariamente o único fator de virulência envolvido no processo de morte do helminto, provavelmente há a participação de proteases e adesinas no processo que podem ser moduladas conforme o meio de cultivo utilizado. No mesmo ano, Antunes et al. (2016) mostraram que os helmintos foram capazes de distinguir entre corinebactérias nocivas potencialmente toxigênicas como *C. diphtheriae* e *C. ulcerans* de espécies inofensivas, como *Corynecterium glutamicum* e *E. coli*. Além disso, *C. diphtheriae* e *C. ulcerans* induziram o fenótipo *Dar* associado com mortalidade e infecção dos vermes.

Souza et al. (2019) demonstraram que *C. elegans* possui quimiotaxia em relação a *Corynebacterium striatum* e que as amostras testadas de *C. striatum* foram capazes de colonizar e matar *C. elegans*, sendo confirmado que os isolados clínicos de *C. striatum* testados induziram anormalidades morfológicas – *Dar* e *bagging* – e adicionalmente a formação de *worm-star* em *C. elegans*. Os vermes demonstraram preferência semelhante ao encontrado para a escolha entre *E. coli* OP50 e *C. glutamicum* para as amostras de *C. striatum*, demonstrando que o helminto não conseguiu detectar uma fonte de alimento prejudicial, diferentemente do que foi visto com *S. agalactiae*.

Independente do potencial patogênico de ambas as espécies não-toxigênicas – C. striatum e C. glutamicum – o modelo C. elegans não demonstrou capacidade de evitar fontes alimentares prejudiciais. O worm-star, Dar e bagging sugerem que propriedades distintas, porém gerais, dos membros do gênero, em vez de fatores de virulência específicos, podem ser responsáveis pelos sintomas (SOUZA et al., 2019).

Apesar da virulência observada das amostras de *C. striatum* diante o modelo helminto, os animais não foram capazes de distinguir uma fonte prejudicial de alimento, como as amostras de *C. striatum*, de fontes preferenciais não patogênicas, como *E. coli* ou *C. glutamicum*. Logo, a quimiotaxia nesse caso foi positiva para uma amostra patogênica. Nos experimentos com *S. agalactiae*, o oposto foi observado, uma vez que os animais identificaram essa bactéria como uma fonte prejudicial de alimento e modularam seu comportamento para evitar o contato,

demonstrando quimiotaxia negativa em relação as amostras testadas GBS110, GBS1428 e GBS90356.

Nossos resultados mostraram que a linhagem selvagem de *C. elegans* foi colonizada de forma persistente mesmo após consumir outra fonte de alimento, sugerindo a capacidade do nematódeo de tornar-se um veículo para a disseminação da bactéria pelo ambiente, como já ocorre na natureza com bovinos, humanos, tilápias, dentre outros. Além disso, a alimentação contínua e estrita de *S. agalactiae* causou alterações morfológicas em *C. elegans*.

Sifri et al. (2003) verificaram que a morte dos vermes estava relacionada com a colonização do intestino do nematoide por *S. aureus*. Quando os vermes se alimentavam de *S. aureus*, a locomoção dos nematoides, o bombeamento da faringe e a alimentação pareciam normais nas primeiras 16 a 20 horas. Nos períodos posteriores, 24 a 48 horas, todas essas atividades diminuíram progressivamente até que os vermes ficaram imóveis e morreram. Muitos nematódeos mortos perderam toda a arquitetura celular aparente no tapete bacteriano, o fenótipo foi descrito como *ghost*. Além disso, observou-se que as vias ativadas do hospedeiro em resposta ao patógeno *S. aureus* foram as vias SEK-1 e NSY-1 dependente de p38 MAP-quinase e resposta transcricional mediada por TFEB (JIANG; WANG, 2018). O fenótipo *ghost* descrito não foi visível durante a interação com as amostras de *S. agalactiae* GBS110, GBS1428 e GBS90356.

Em outro trabalho, Bae et al. (2004) confirmaram o estudo anteriormente citado, que a secreção de α -hemolisina por *S. aureus* foi importante para a patogênese em *C. elegans*. Em contraste, Thomsen et al. (2006) observaram que o patógeno *Listeria monocytogenes* aparentemente não produz toxinas que causam a morte de *C. elegans*, sendo o acúmulo de bactérias no intestino do nematoide, exclusivamente, a causa da morte.

Foi visto que *Staphylococcus epidermidis* infectou e matou *C. elegans*, requerendo a expressão dos genes *ica* que codificam um componente polissacarídeo extracelular do biofilme (DARBY, 2005). Outro trabalho também mostrou que os nematoides que morreram durante a alimentação com *Burkholderia pseudomallei* também apareceram como fenótipo *ghost* no tapete bacteriano (O'QUINN; WIEGAND; JEDDELOH, 2001).

O mesmo fenótipo *ghost* foi observado após alimentação por *E. faecalis*. Ocasionalmente, foi observado também o *bagging* quando os vermes se alimentaram de *E. faecalis*. Embora não se saiba porque o *bagging* é predominante quando os vermes se alimentam de patógenos bacterianos, uma possibilidade é que os vermes infectados se tornem muito fracos para por ovos normalmente. No entanto, para *S. aureus*, o *bagging* não foi o único mecanismo de morte, já que os machos e o mutante estéril *fer-1* também foram mortos por *S. aureus* (SIFRI et al., 2003).

Kurz et al. (2003) observaram que o patógeno *Serratia marcescens* também colonizou o intestino de *C. elegans* com LT₅₀, ou seja, o tempo necessário para matar metade da população, de 4 dias, sendo necessário 6 a 7 dias para a morte total da população dos helmintos. Foi visto que as larvas jovens foram resistentes à infecção, mas as larvas L4 e os adultos foram altamente susceptíveis. Além disso, observaram que o sobrenadante da cultura bacteriana não foi suficiente para causar a morte dos helmintos, sugerindo que a morte do modelo requer a infecção bacteriana e que uma toxina difusível não seria suficiente nesse caso. Observou-se ainda que a via ativada do hospedeiro em resposta ao patógeno *Serratia marcescens* foi a via DBL-1/TGF- β (JIANG; WANG, 2018).

Estudos também demonstraram que o patógeno *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* matou *C. elegans* por colonização intestinal (ABALLAY; YORGEY; AUSUBEL, 2000; LABROUSSE et al., 2000), e descobriram o LPS como um fator de virulência para o modelo helminto. Foi visto que os vermes adultos transferidos para placas com *S. enterica* e incubados a 25 °C, o LT₅₀ foi de 5 dias. Contudo, quando os vermes foram expostos a *S. enterica* por apenas 3 horas e depois transferidos para placas de *E. coli* OP50, houve uma morte precoce significativa (ABALLAY; YORGEY; AUSUBEL, 2000; DARBY, 2005; JIANG; WANG, 2018).

Apesar de *S. enterica* ter como aspecto essencial a invasão de células hospedeiras mamíferas, esse patógeno não pareceu invadir células de *C. elegans*. A infecção foi acompanhada por um aumento da morte celular programada na linhagem germinativa (ABALLAY; AUSUBEL, 2001). Observou-se que mutantes defeituosos na síntese de LPS, exibiram níveis reduzidos de morte e falharam ao desencadear a morte celular programada, apesar de se acumularem no lúmen intestinal (ABALLAY et al., 2003; DARBY, 2005; JIANG; WANG, 2018).

Hodgkin, Kuwabara, Comeliussen (2000) observaram que a bactéria *Microbacterium nematophilum* colonizou o reto de *C. elegans* e uma pequena região perianal da cutícula externa, apresentando o fenótipo *Dar*. A infecção não foi letal para a linhagem selvagem de *C. elegans* e os animais conseguiram crescer e se reproduzir em cultura pura de *M. nematophilum*, apesar de ser mais lentamente do que em *E. coli*.

Foi observado que a maioria da população de *C. elegans* consegue sobreviver também às amostras de *S. agalactiae* ao final de 120 horas de interação, conforme o gráfico do experimento de sobrevivência. Contudo, todos os helmintos adultos apresentavam ao final do experimento de sobrevivência o fenótipo *Dar* quando o ensaio de interação ocorreu em meio de cultura sólido. Este fenótipo causa letargia aos animais, dificuldade de locomoção e de deslocamento para novas fontes alimentares.

Como as bactérias influenciam a fecundidade de *C. elegans*, é possível que patógenos bacterianos alterem a capacidade reprodutiva dos parasitas (Souza et al., 2019). O fenômeno da formação de *worm-star* foi inicialmente descrito apenas para a infecção dos nematódeos por *Leucobacter spp.* (HODGKIN et al., 2013)

Alguns vermes adultos nos ensaios de interação com *S. agalactiae* tanto em meio sólido quanto líquido, ocasionalmente, manifestaram *bagging*, o que levou inevitavelmente à morte pela eclosão dos ovos em seu abdômen. A hipótese é de que os vermes preferem não se alimentar das amostras de *S. agalactiae* e, portanto, não adquirem nutrição necessária para se desenvolver e depositar os ovos normalmente, gerando a eclosão das larvas no interior do adulto hermafrodita e morte. Um dado que reforça esta hipótese, foi que nos ensaios em meio líquido, os adultos presos no *worm-star* tinham muitos ovos contidos no abdômen, e alguns adultos iniciando o processo de *bagging*, sugerindo que esse efeito foi um sintoma oriundo da alimentação estrita e contínua de *S. agalactiae*.

Quando o ensaio de interação foi realizado no meio líquido, verificou-se a ocorrência do *worm-star* na presença de diferentes concentrações bacterianas. Além disso, registrou-se a maior agregação de vermes presos ao longo de 72 horas. No tempo de 24 horas de interação em meio líquido com 6 µg/mL de tetraciclina, as amostras GBS90356 e GBS1428 formaram apenas uma estrela nos poços com 150 µL (~ 1.5×10^7 UFC/mL) de suspensão bacteriana. Porém, no tempo de 72 horas de interação, observou-se a formação de estrelas em todos os poços com os vermes ainda vivos tentando escapar. Um dado observado foi que com o aumento da quantidade de UFC bacteriana no meio e consequentemente, com maior concentração de bactérias, a agregação de vermes tornou-se maior ao longo do tempo.

Durante os ensaios para verificar a ocorrência do fenótipo *worm-star* em meio líquido, os vermes não tinham a possibilidade de fuga, uma vez que estavam imersos e contidos em poços. Provavelmente, os vermes hermafroditas não obtiveram o recurso necessário para se desenvolver e depositar os ovos, uma vez que *S. agalactiae* demonstrou não ser uma fonte preferencial de alimento. Os ovos, portanto, eclodiram no interior dos adultos presos no *worm-star*, o que pôde ser visualizado nas imagens de microscopia o fenótipo *bagging*.

A persistência da colonização observada nas imagens de microscopia de fluorescência não refletiu necessariamente um quadro letal aos vermes, nem o impedimento dos helmintos de gerar novos descendentes. As imagens de microscopia demonstraram adultos com ovos no
abdômen e, ao longo do experimento de sobrevivência, foi possível observar a ovoposição dos helmintos. Logo, a geração de descendentes não foi interrompida pela colonização de *S. agalactiae*. Contudo, os helmintos colonizados mostraram alterações comportamentais e morfológicas. Provavelmente, no ambiente *in situ* os nematódeos não se alimentam naturalmente de *S. agalactiae*, possuindo recursos sensoriais para evitar se alimentar desse patógeno.

Garsin et al. (2001) analisaram que *E. faecalis* colonizou *C. elegans* e matou rapidamente metade da população em aproximadamente 4 dias. Além disso, uma alimentação contínua não foi necessária para uma elevada colonização, um pequeno inóculo foi capaz de proliferar no animal. A morte de *C. elegans* foi mais rápida quando a alimentação conteve amostras de *E. faecalis* expressando citolosina. Também foi visto que *E. faecalis* com uma deleção em *fsrB*, parte de um sistema de quórum-*sensing* que responde a alta densidade de cultura, atenuou a morte dos helmintos, mas a colonização persistiu com a mesma eficiência que as amostras selvagens.

Naji et al. (2018) verificaram que *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mitis*, mataram *C. elegans* através da produção de peróxido de hidrogênio. Analisou-se também que o fator de transcrição SKN-1 foi necessário para a sobrevivência dos vermes e forneceu proteção contra o peróxido de hidrogênio produzido por *S. gordonii*. Durante a infecção, foi observado que a ativação do fator de transcrição SKN-1, mediado pela via p38-MAPK foi dependente da produção de peróxido de hidrogênio pelo patógeno. Experimentos de ativação de algumas vias de transdução de sinais como p38 MAP quinase encontra-se em andamento no nosso laboratório.

Ensaios experimentais com *Streptococcus pneumoniae de*monstraram que o microrganismo foi capaz de matar *C. elegans* sem colonizar o verme. O peróxido de hidrogênio produzido pela bactéria foi o suficiente para causar a morte dos vermes. Outros *Streptococcus spp.* que mataram *C. elegans* pelo mesmo mecanismo de produção de H_2O_2 , incluem *Streptococcus pyogenes* e *S. agalactiae* (BOLM et al., DARBY, 2005; GARSIN et al., 2001; 2004). Esta foi a única publicação encontrada entre *S. agalactiae* e *C. elegans*, analisando somente a produção de H_2O_2 .

Contudo, as amostras de GBS90356, GBS1428, e GBS110 estudadas demonstraram que diferentes isolados de *S. agalactiae* foram capazes de causar alterações morfológicas e comportamentais em *C. elegans*, uma vez que foi possível observar três fenótipos de virulência ao longo do experimento: *Dar*, *worm-star* e *bagging*; além da preferência dos vermes pelo

inóculo da *E. coli* OP50 do que *S. agalactiae* quando houve opção de escolha; e a pouca interação após os helmintos se alimentarem das amostras de *S. agalactiae*.

As amostras GBS90356 e GBS1428 induziram os vermes a apresentarem ambos os fenótipos de virulência (*Dar* e o *worm-star*) não havendo a troca de susceptibilidade microbiana visto por Hodgkin et al. (2014), uma vez que foi possível observar as alterações morfológicas no nematódeo tanto em meio sólido, quanto em meio líquido, por ambas as amostras analisadas. Para a amostra GBS110 (mastite subclínica bovina) foi visto somente que os vermes apresentaram o fenótipo *Dar*.

Nosso trabalho demonstrou pela primeira vez ensaios de sobrevivência, quimiotaxia e colonização de *S. agalactiae* com o nematódeo *C. elegans.* Análises mais aprofundadas sobre quais os fatores de virulência (pili, proteínas bspC e Cas9) associados ao aumento da toxicidade, persistência da colonização no intestino do nematódeo e aos fenótipos visualizados como *Dar*, *worm-star* e *bagging*, encontram-se em andamento no laboratório. Desta forma, os resultados demonstraram que a interação celular com *C. elegans* possibilitou o avanço no conhecimento da patogênese do *S. agalactiae*, tornando-se um modelo alternativo *in vivo* para o estudo da infecção bacteriana.

CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados podemos concluir que:

- a) as amostras GBS90356 e GBS1428 foram capazes de colonizar o verme;
- b) a amostra GBS90356 apresentou maior toxicidade no modelo helminto;
- c) as amostras GBS90356, GBS1428 e GBS110 foram capazes de induzir o fenótipo *Dar* no helminto;
- d) as amostras GBS90356 e GBS1428 testadas foram capazes de induzir o worm-star;
- e) as amostras GBS90356, GBS1428 e GBS110 não impediram, porém prejudicaram a geração de descendentes pelos helmintos;
- f) foi possível observar o fenótipo *bagging* após alimentação contínua com as amostras GBS90356, GBS1428 e GBS110;
- g) os vermes apresentaram quimiotaxia negativa para as amostras GBS90356,
 GBS1428 e GBS110;
- h) *C. elegans* apresentou-se como modelo alternativo *in vivo* para o avanço no conhecimento da patogênese do *S. agalactiae*.

REFERÊNCIAS

ABALLAY, A. Neural regulation of immunity: role of NPR-1 in pathogen avoidance and regulation of innate immunity. *Cell Cycle*, v. 8, p. 966-969, 2009.

ABALLAY, A.; AUSUBEL, F. M. Programmed cell death mediated by *ced-3* and *ced-4* protects *Caenorhabditis elegans* from *Salmonella* typhimurium-mediated killing. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 98, p. 2735–2739, 2001.

ABALLAY, A. et al. *Caenorhabditis elegans innate* immune response triggered by *Salmonella enterica* requires intact LPS and is mediated by a MAPK signaling pathway. *Curr. Biol.*, v. 13, p. 47–52, 2003.

ABALLAY, A.; YORGEY, P.; AUSUBEL, F. M. *Salmonella* typhimurium proliferates and establishes a persistent infection in the intestine of *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Biol.*, v. 10, p. 1539-1542, 2000.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. H. I. V. *Imunologia celular e molecular*. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

ALBERTS, B. et al. Molecular biology of the cell. 5. ed. New York: Garland Science, 2008.

ALHHAZMI, A.; PANDEY, A.; TYRRELL, G. J. Identification of Group B *Streptococcus* Capsule Type by use of a Dual Phenotypic/Genotypic Assay. *J. Clin. Microbiol.*, v. 55, n. 9, p. 2637–2650, 2017.

ALVES, F. G. et al. Laboratory parameters of cerebrospinal fluid in individuals with enterovirus meningitis. *Rev. bras. crescimento desenvolv. hum.* [online], v. 25, p. 237-242, 2015.

AMIN, A.; ABDULRAZZAQ, Y. M.; UDUMAN, S. Group B streptococcal serotype distribution of isolates from colonized pregnant women at the time of delivery in United Arab Emirates. *J. Infect.*, v. 45, p. 42–46, 2002.

ANAGE: The Animal Ageing and Longevity Database. *Human Ageing Genomic Resouces*, 2017. Disponível em: < https://genomics.senescence.info/genes/details.php?gene=cep-1&organism=elegans>. Acesso em: 27 fev. 2020.

ASHAVINKUMAR, S. G. et al. covR Mediated Antibiofilm Activity of 3 Furancarboxaldehyde Increases the Virulence of Group A *Streptococcus*. *PLoS One*, v. 10, n. 5, 2015.

AVERY, L.; SHTONDA, B. B. Food transport in the *C. elegans* pharynx. *J. Exp. Biol.*, v. 206, p. 2441–2457, 2003.

AVERY, L.; THOMAS, J. H. *Feeding and defecation*. 2. ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press. p. 679–716, 1997.

BAE, T. et al. *Staphylococcus aureus* virulence genes identified by bursa aurealis mutagenesis and nematode killing. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 101, n. 33, p. 12312-12317, 2004.

BALLA, K. M.; TROEMEL, E. R. *Caenorhabditis elegans* as a model for intracellular pathogen infection. *Cell Microbiol.*, v. 15, n. 8, p. 1313–1322, 2013.

BARRICHELLO, T. et al. Pathophysiology of bacterial infections of the central nervous system and its putative role in the pathogenesis of behaviorlal changes. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, v. 35, p. 81-87, 2013.

BATISTA R. P.; FERREIRA, C. R. *Streptococcus agalactiae* septicemia in a patient with diabetes and hepatic cirrhosis. *Autops. Case Rep.*, v. 5, p. 35-43, 2015.

BIRD, A., J. The Structure of Nematodes. 2nd ed. New York: Academic Press, Inc., 1991.

BISHARAT, N. et al. Hyperinvasive neonatal group B streptococcus has arisen from a bovine ancestor. *J. Clin. Microbiol.*, v. 42, p. 2161–2167, 2004.

BLAXTER, M. The genome project and sequence homology to other species. In: HOPE, I.A. (Ed.). *C. elegans*: a practical approach. Oxford: Oxford University Press, 1999. Cap. 2, p. 17-37.

BLUMBERG, H. M. et al. Invasive group B streptococcal disease: the emergence of serotype V. J. Infect. Dis., v. 173, p. 365-373, 1996.

BODE, L.; JANTSCHER-KRENN, E. Structure-function relationships of human milk oligosaccharides. *Adv. Nutr.*, v. 3, p. 383S-391S, 2012.

BOGAERTS, A. et al. Proteome changes of Caenorhabditis elegans upon a *Staphylococcus aureus* infection. *Biology Direct.*, v. 5, n. 11, 2010.

BOLM, M. et al. Hydrogen Peroxide-Mediated Killing of *Caenorhabditis elegans*: a Common Feature of Different Streptococcal Species. *Infection and Immunity.*, v. 72, n. 2, 2004.

BOYER, H. W.; ROULLAND-DUSSOIX, D. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol. Mol.*, v. 41, n. 3, p. 459–472, 1969.

BREMER, H.; DENNIS, P. Modulation of chemical composition and other parameters of the cell at different exponential growth rates. *EcoSal Plus*, v. 3, n. 1, p. 1553–1569, 2008.

BRENNER, S. The genetics of Caenorhabditis elegans. Genetics, v. 77, n. 1, p. 71-94, 1974.

BROOKS, K. K.; LIANG, B.; WATTS, J. L. The influence of bacterial diet on fat storage in *C. elegans. PLoS One*, v. 4, n. 10, 2009. DOI: 10.1371/journal.pone.0007545.

BROWNING, D. F. et al. Laboratory adapted *Escherichia coli* K-12 becomes a pathogen of *Caenorhabditis elegans* upon restoration of O antigen biosynthesis. *Mol. Microbiol.*, v. 87, n. 5, p. 939–950, 2013.

BURCHAM, L. R. et al. Determinants of Group B streptococcal virulence potential amongst vaginal clinical isolates from pregnant women. *PLoS One*, v. 14, n. 12, 2019. DOI: 10.1371/journal.pone.0226699.

BYERLY, L.; CASSADA, R. C.; RUSSELL, R. L. The life of the nematode *Caenorhabditis elegans*: Wild-type growth and reproduction. *Dev. Bio.*, v. 51, n. 1, p. 23-33, 1976.

ANTUNES, C. A. et al. *Caenorhabditis elegans* star formation and negative chemotaxis induced by infection with corynebacteria. *Microbiology*, v. 162, p. 84-93, 2016.

CARLIN, A. F. et al. Group B streptococcal capsular sialic acids interact with siglecs (immunoglobulin-like lectins) on human leukocytes. *J. Bacteriol.*, v. 189, p. 1231-1237, 2007.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Prevention of perinatal Group B Streptococcal disease: a public heath perspective. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, v. 45, p. 1-24, 1996.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Prevention of Perinatal Group B Streptococcal Disease. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, v. 59, p. 1-23, 2010.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *Group B Strep Infection in Adults*. 2016. Disponível em: https://www.cdc.gov/groupbstrep/about/adults.html. Acesso em: 27 fev. 2020.

CHELLIAH, R. et al. In vitro and in vivo defensive effect of probiotic LAB against *Pseudomonas aeruginosa* using *Caenorhabditis elegans* model. *Virulence*, v. 9, n. 1, p. 1489-1507, 2018.

CIESLEWICZ, M. J. et al. Structural and genetic diversity of group B streptococcus capsular polysaccharides. *Infect. Immun.*, v. 73, n. 5, p. 3096–3103, 2005.

CORSI, A. K.; WIGHTMAN, B.; CHALFIE, M. A transparent windon into biology: A primer on Caenorhabditis elegans. *Genetics*, v. 200, n. 2, p. 387-407, 2015.

COSTA, A. L. et al. Prevalence of colonization by group B *Streptococcus* in pregnant women from a public maternity of Northwest region of Brazil. *Rev Bras Ginecol Obstet*. v.30, p.274-280, 2008.

CULETTO, E.; SATTELLE, D. B. A role for *Caenorhabditis elegans* in understanding the function and interactions of human disease genes. *Hum. Mol. Genet.*, v. 9, p. 869–877, 2000.

DARBY, C. *Interactions with microbial pathogens*. In: WORMBOOK: The *C. elegans* Research Community. 2005. Disponível em: <http://www.wormbook.org/chapters/www_intermicrobpath/intermicrobpath.html>. Acessado em: 27 fev. 2020.

DARBY, C. et al. Lethal paralysis of *Caenorhabditis elegans* by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 96, n. 26, p. 15202-15207, 1999.

DAVIES, H. D. et al. Multilocus sequence typing of serotype III group B streptococcus and correlation with pathogenic potential. *J. Infect. Dis.*, v. 189, p. 1097–1102, 2004.

DAVIS, M. W. et al. Mutations in the *Caenorhabditis elegans* Na,K-ATPase alpha-subunit gene, eat-6, disrupt excitable cell function. *J. Neurosci.*, v. 15, n. 12, p. 8408-8418, 1995.

DENG, L. et al. Characterization of a Two-Component System Transcriptional Regulator, LtdR, That Impacts Group B Streptococcal Colonization and Disease. *Infect. Immun.*, v. 86, n. 7, 2018. DOI: 10.1128/IAI.00822-17.

DENVER, D. R. et al. A genome-wide view of *Caenorhabditis elegans* base-substitution mutation processes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 106, p. 16310-16314, 2009.

DEPUYDT, G. et al. Reduced insulin/insulin-like growth factor-1 signaling and dietary restriction inhibit translation but preserve muscle mass in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Cell Proteomics*. v. 12, n. 12, p. 3624–3639, 2013.

DERMER, P. et al. A history of neonatal group B streptococcus with its related morbidity and mortality rates in the United States. *J. Pediatr. Nurs.*, v. 19, p. 357–363, 2004.

DIMOV, I.; MADURO, M. F. The *C. elegans* intestine: organogenesis, digestion, and physiology. *Cell Tissue Res.*, v. 377, n. 3, p. 383-396, 2019.

DIOGO, J.; BRATANICH, A. The nematode *Caenorhabditis elegans* as a model to study viruses. *Arch. Virol.*, v. 159, p. 2843–2851, 2014.

DOGAN, B. et al. Distribution of Serotypes and Antimicrobial Resistance Genes among Streptococcus agalactiae Isolates from Bovine and Human Hosts. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 43, p. 5899-5906, 2005.

DONCASTER, C. C. Nematode feeding mechanisms. Observations On Rhabditis and Pelodera. *Nematologica*, v. 8, n. 4, p. 313, 1962.

DORAN, K. S.; NIZET, V. Molecular pathogenesis of neonatal group B Streptococcal infection: no longer in its infancy. *Mol. Microbiol.*, v. 54, p. 23-31, 2004.

DORAN, K. S. et al. Group B streptococcal beta-hemolysin/cytolysin promotes invasion of human lung epithelial cells and the release of interleukin-8. *J. Infect. Dis.*, v. 185, p. 196-203, 2002.

DORAN, K. S. et al. Host-pathogen interactions in bacterial meningitis. *Acta Neuropathol.*, v. 131, p. 185-209, 2016.

DOUGHERTY, E. S. et al. Axenic cultivation of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda:Rhabditidae) with supplemented and unsupplemented chemically defined media. *Ann N.Y. Acad. Sci.*, v. 77, p. 176-217, 1959.

DRAMSI, S. et al. Assembly and role of *pili* in Group B Streptococci. *Mol Microbiol*. v.60, p.1401–1413, 2006.

DUTRA, V. G. et al. Streptococcus agalactiae in Brazil: serotype distribution, virulence determinants and antimicrobial susceptibility. *BMC Infectious Diseases*, v. 14, p. 323, 2014.

EDGLEY, M. "Introduction to Caenorhabditis elegans" (On-line). 1999. Disponível em: http://www.biotech.missouri.edu/Dauer-World/Wormintro.html. 1999>. Acesso em: 27 feb. 2020.

EDMOND, K. M. et al. Group B streptococcal disease in infants aged younger than 3 months: systematic review and meta-analysis. *The Lancet*, v. 379, n. 9815, p. 547–556, 2012.

EDWARDS, M. S.; BAKER, C. J. Group B streptococcal infections in elderly adults. *Clin. Infect. Dis.*, v. 41, p. 839-847, 2005.

ERSKINE, R. J. Mastitis control in dairy herds with high prevalence of subclinical mastitis. *Comp. Cont. Educ. Pract. Vet.*, v. 14, p. 969-975, 1992.

ESTES, K.A.; SZUMOWSKI, S. C.; TROEMEL, E. R. Non lytic, actin-based exit of intracellular parasites from *C. elegans* intestinal cells. *PLoS Pathog.*, v. 7, 2011. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002227.

FACKLAM, R. R. et al. Presumptive identification of group A, B, and D streptococci. *Appl. Microbiol.*, v. 27, n. 1, p. 107-113, 1974.

FARLEY, M. M. Group B Streptococcal disease in nonpregnant adults. *Clin. Infect. Dis.*, v. 33, p. 556-561, 2001.

FÉLIX, M-A.; DUVEAU, F. Population dynamics and habitat sharing of natural populations of *Caenorhabditis elegans* and *C. briggsae. BMC Biol.*, v. 10, n. 1, p. 59, 2012.

FLORINDO, C. et al. Epidemiological surveillance of colonising group B Streptococcus epidemiology in the Lisbon and Tagus Valley regions, Portugal (2005 to 2012): emergence of a new epidemic type IV/clonal complex 17 clone. *Euro Surveill*, v. 19, n. 23, 2014. DOI: 10.2807/1560-7917.es2014.19.23.20825.

FRY, R. M. Fatal infections by hemolytic streptococcus group B. *Lancet*, v. 231, p. 199–201, 1938.

GARSIN, D. A. et al. A simple model host for identifying Gram-positive virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 98, n. 19, p. 10892–10897, 2001.

GASE, K. et al. The *Streptococcus agalactiae* hylB gene encoding hyaluronate lyase: completion of the sequence and expression analysis. *Biochim. Biophys. Acta.*, v. 1398, n. 1, p. 86-98, 1998.

GOODMAN, M. B.; SENGUPTA, P. How Caenorhabditis elegans Senses Mechanical Stress, Temperature, and Other Physical Stimuli. *Genetics*, v. 212, n. 1, p. 25-51, 2019.

GUANGJIN, L. et al. Development of *Streptococcus agalactiae* vaccines for tilápia. *Dis. Aquat. Org.*, v. 122, p. 163–170, 2016.

HANCOCK, B. M.; DORAN, K. S. Importance of strain lineages for Group B streptococcal survival. *Virulence*, v. 8, n. 6, p. 646–648, 2017.

HARRIS, G. et al. Dissecting the signaling mechanisms underlying recognition and preference of food odors. *J. Neurosci.*, v. 34, n. 28, p. 9389-9403, 2014.

HASPERHOVEN, G. F. et al. Universal screening versus risk-based protocols for antibiotic prophylaxis during childbirth to prevent early-onset Group B streptococcal disease: a systematic review and meta-analysis. *BJOG*, v. 127, n. 6, p. 680-991, 2020.

HASSHOFF, M. et al. The role of *Caenorhabditis elegans* insulin-like signaling in the behavioral avoidance of pathogenic *Bacillus thuringiensis*. *FASEB J.*, v. 21, p. 1801-1812, 2007.

HEATH, P. T.; JARDINE, L. A. Neonatal infections: Group B *Streptococcus. BMJ Clin. Evid.*, v. 2010, p. 1-7, 2010.

HODGKIN, J.; CLARK, L. C.; GRAVATO-NOBRE, M. J. Worm-stars and half-worms: Novel dangers and novel defense. *Landes Bioscience*, v. 3, 2014. DOI: 10.4161/worm.27939.

HODGKIN, J. et al. Two *Leucobacter* Strains Exert Complementary Virulence on *Caenorhabditis* Including Death by Worm-Star Formation. *Current Biology*, v. 23, p. 2157-2161, 2013.

HODGKIN, J.; KUWABARA, P. E.; COMELIUSSEN, B. A novel bacterial pathogen, *Microbacterium nematophilum*, induces morphological change in the nematode *C. elegans*. v. 10, n. 24, p. 1615-1618, 2000.

HU, P. J. Dauer. The C. elegans Research Community: WormBook, 2007.

HULL, J. R.; TAMURA, G. S.; CASTNER, D. G. Interactions of the streptococcal C5a peptidase with human fibronectin. *Acta Biomater.*, v. 4, n. 3, p. 504-513, 2008.

JACKSON, L. A. et al. Risk factors for group B streptococcal disease in adults. *Ann. Intern. Med.*, v. 123, n. 6, p. 415–420, 1995.

JACOBSSON, K. A novel family of fibrinogen-binding proteins in *Streptococcus agalactiae*. *Vet. Microbiol.*, v. 96, p. 103-113, 2003.

JANSEN, W. T. M. et al. Hydrogen Peroxide-Mediated Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Streptococcus pyogenes*. *Infection and Immunity*, v. 70, n. 9, p. 5202-5207, 2002.

JIANG, H.; WANG, D. The Microbial Zoo in the *C. elegans* Intestine: Bacteria, Fungi and Viruses. *Viruses*, v. 10, n. 2, 2018. DOI: 10.3390/v10020085.

JIN, X.; POKALA, N.; BARGMANN, C. I. Distinct Circuits for the Formation and Retrieval of an Imprinted Olfactory Memory. v. 164, n. 4, p. 632-643, 2016.

JOHRI, A. K. L. C. et al. Group B *Streptococcus*: global incidence and vaccine development. v. 4, p. 932-942, 2006.

JONES, N. et al. Multilocus Sequence Typing System for Group B *Streptococcus*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 41, n. 6, p. 2530-2536, 2003.

KALETTA, T.; HENGARTNER, M. O. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. *Nat. Rev. Drug Discov.*, v. 5, p. 387–398, 2006.

KAMATH, R. S. et al. Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature*, v. 421, n. 6920, p. 231-237, 2003.

KAO, C. Y.; LOS, F. C.; AROIAN, R. V. Nervous about immunity: neuronal signals control innate immune system. *Nat. Immunol.*, v. 9, p. 1329-1330, 2008.

KAPLAN, F. et al. Bacterial attraction and quorum sensing inhibition in *Caenorhabditis* elegans exudates. J. Chem. Ecol., v. 35, n. 8, p. 878-892, 2009.

KEEFE, G. P. *Streptococcus agalactiae* mastitis: a review. *Can. Vet. J.*, v. 38, p. 429-437, 1997.

KIM, B. J. et al. Modeling Group B *Streptococcus* and Blood-Brain Barrier Interaction by Using Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Brain Endothelial Cells. *mSphere*, v. 2, n. 6, 2017. DOI: 10.1128/mSphere.00398-17.

KIM, B. J.; SHUSTA, E. V.; DORAN, K. S. Past and Current Perspectives in Modeling Bacteria and Blood-Brain Barrier Interactions. *Front. Microbiol.*, v. 10, n. 1336, 2019. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01336.

KJEMS, E.; PERCH, B.; HENRICHSEN, J. Serotypes of group B streptococci and their relation to hyaluronidase production and hydrolysis of salicin. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 11, p. 111-113, 1980.

KLASS, M. R. Aging in the nematode Caenorhabditis elegans: major biological and environmental factors influencing life span. *Mech. Ageing Dev.*, v. 6, p. 413-429, 1977.

KONG, C. et al. Discovery of potential anti-infectives against *Staphylococcus aureus* using a *Caenorhabditis elegans* infection model. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 14, n. 4, 2014. DOI:10.1186/1472-6882-14-4.

KONTO-GHIORGHI, Y. et al. Papel duplo para *Pilus* na adesão às células epiteliais e formação de biofilme em *Streptococcus agalactiae*. *PLoS Pathogens*, v. 5, n. 5, p. 1-13, 2009.

KORIR, M.L. et al. Association and virulence gene expression vary among serotype III group B streptococcus isolates following exposure to decidual and lung epithelial cells. *Infect. Immun.*, v. 82, p. 4587-4595, 2014.

KREIKEMEYER, B. et al. Genomic organization, structure, regulation and pathogenic role of pilus constituents in major pathogenic Streptococci and Enterococci. *Int. J. Med. Microbiol.*, v. 301, n. 3, p. 240-251, 2011.

KUMAR, A. et al. *Caenorhabditis elegans*: a model to understand host-microbe interactions. *Cell Mol. Life Sci.*, v. 77, n. 7, p. 1229-1249, 2019.

KURZ, C. L. et al. Virulence factors of the human opportunistic pathogen *Serratia marcescens* identified by in vivo screening. *EMBO J.*, v. 22, p. 1451-1460, 2003.

KURZ, C. L.; EWBANK, J. J. Caenorhabditis elegans for the study of host-pathogen interactions. *Trends in Microbiology*. v. 8, n. 3, p. 142-144, 2000.

KWATRA, G. et al. Prevalence of maternal colonisation with group B streptococcus: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.*, v. 16, n, 9, p. 1076–1084, 2016.

LABROUSSE, A. et al. *Caenorhabditis elegans* is a model host for *Salmonella* typhimurium. *Curr. Biol.*, v. 10, p. 1543–1545, 2000.

LANCEFIELD, R. C. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *J. Exp. Med.*, v. 57, p. 571-595, 1933.

LANCEFIELD, R. C.; HARE, R. The serological differentiation of pathogenic and non-pathogenic strains of hemolytic Streptococci from parturient women. *J. Exp. Med.*, v. 61, p. 335-349, 1935.

LANDWEHR-KENZEL, S.; HENNEKE, P. Interaction of *Streptococcus agalactiae* and cellular innate immunity in colonization and disease. *Frontier in Immunology*, v. 5, n. 519, 2014. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00519.

LANG, S.; PALMER, M. Characterization of *Streptococcus agalactiae* CAMP factor as a pore-forming toxin. *J. Biol. Chem.*, v. 278, p. 38167–38173, 2003.

LANG, S. et al. *Streptococcus agalactiae* CAMP factor binds to GPI-anchored proteins. *Med. Microbiol. Immunol.*, v. 196, p. 1–10, 2007.

LAUER, P. et al. Genome analysis reveals *pili* in Group B *Streptococcus*. *Science*, v. 309, p. 105, 2005.

LAW, M. R. et al. The prevention of neonatal group B streptococcal disease: a report by a working group of the Medical Screening Society. *J. Med. Screen.*, v. 12, p. 60-68, 2005.

LEE, D.; H. ATKINSON. *Physiology of Nematodes*. 2nd ed. New York: Columbia University Press, 1977.

LEVENT, F. et al. Early outcomes of group B streptococcal meningitis in the 21st century. *Pedriatr. Infect. Dis. J.*, v. 29, p. 1009-1012, 2010.

LI, S.; JEDRZEJAS, M. J. Hyaluronan Binding and Degradation by Streptococcus agalactiae Hyaluronate Lyase. *Journal of Biological Chemistry*, v. 276, p. 41407-41416, 2001.

LIMA-JUNIOR, E. M. et al. Innovative treatment using tilapia skin as a xenograft for partial thickness burns after a gunpowder explosion. *J. Surg. Case Rep.*, v. 6, 2019. DOI: 10.1093/jscr/rjz181.

LIN, A. E. et al. Human milk oligosaccharides inhibit growth of group B *Streptococcus. J. Biol. Chem.*, v. 292, n. 27, p. 11243–11249, 2017.

LIN, Y. et al. A hyaluronidase activity of the sperm plasma membrane protein PH-20 enables sperm to penetrate the cumulus cell layer surrounding the egg. *J. Cell Biol.*, v. 125, p. 1157-1163, 1994.

LIONE, V. DE O. et al. Interferon-γ inhibits group B Streptococcus survival within human endothelial cells. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 109, p. 940-943, 2014.

LOPARDO, H. A. et al. Argentinian *Streptococcus* Study group. Six-month multicenter study on invasive infections due to group B streptococci in Argentina. *J. Clinic. Microb.*, v. 41, p. 4688-4695, 2003.

LUAN, S. L. et al. Multilocus sequence typing of Swedish invasive group B *Streptococcus* isolates indicates a neonatally associated genetic lineage and capsule switching. *J. Clin. Microbiol.*, v. 43, p. 3727-3733, 2005.

MACNEIL, LESLEY. T. et al. Diet-induced developmental acceleration independent of TOR and insulinin *C. elegans. Cell*, v. 153, n. 1, p. 240–252, 2013.

MAHAJAN-MIKLOS, S. et al. Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa-Caenorhabditis elegans* pathogenesis model. *Cell*, v. 96, p. 47-56, 1999.

MAISEY, H. C.; DORAN, K. S.; NIZET, V. Recent advances in understanding the molecular basis of Group B Streptococcus virulence. *Expert. Rev. Mol. Med.*, v. 10, p. 1-18, 2009.

MAISEY, H. C. et al. Group B streptococcal *pilus* proteins contribute to adherence to and invasion of brain microvascular endothelial cells. *J. Bacteriol.*, v. 189, p. 1464–1467, 2007.

MALAKHOV, V. *Nematodes*: Structure, Development, Classification, and Phylogeny. Washington: Smithsonian Institution Press, 1994.

MEISEL, J. D. et al. Chemosensation of Bacterial Secondary Metabolites Modulates Neuroendocrine Signaling and Behavior of *C. elegans. Cell*, v. 159, n. 2, p. 267–280, 2014.

MELO, J. A.; Ruvkun, G. Inactivation of conserved genes induces microbial aversion, drug detoxification, and innate immunity in *C. elegans. Cell*, v. 149, n. 2, p. 452–466, 2012.

MENDONÇA, J. C. *Estudo das infecções por Streptococcus agalactiae em modelo murino de diabetes induzida*. 2018. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

MONTALVO-KATZ, S. et al. Association with soil bacteria enhances p38-dependent infection resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Infect. Immun.*, v. 81, n. 2, p.514, 2013.

MORINIS, J. et al. Horizontal transmission of Group B *Streptococcus* in a neonatal intensive care unit. *Paediatr. Child Health*, v. 16, n. 6, p. 48-50, 2011.

NAJI, A. et al. The activation of the oxidative stress response transcription factor SKN-1 in *Caenorhabditis elegans* by mitis group streptococci. *PLoS One*, v. 13, n. 8, 2018. DOI: 10.1371/journal.pone.0202233.

NICHOLAS, W. *The biology of free-living nematodes*. Oxford, England: Clarendon Press, 1975.

NIGON, V. Les modalités de la réprodution et le déterminisme de sexe chez quelques Nématodes libres. *Ann. Sci. Nat. Zool*, v. 11, p. 1-132, 1949.

O'QUINN, A. L.; WIEGAND, E. M.; JEDDELOH, J. A. *Burkholderia pseudomallei* kills the nematode *Caenorhabditis elegans* using an endotoxin mediated paralysis. *Cell. Microbiol.*, v. 3, p. 381–393, 2001.

OKUMURA, C, Y.; NIZET, V. Subterfuge and sabotage: evasion of host innate defenses by invasive gram-positive bacterial pathogens. *Annu. Ver. Microbiol.*, v. 68, p. 439-458, 2014.

OSRIN, D.; VERGANO, S.; COSTELLO, A. Serious bacterial infections in newborn infants in developing countries. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, v. 17, p. 217-224, 2004.

PALMEIRO, J. K. et al. Phenotypic and genotypic characterization of group B streptococcal isolates in southern Brazil. *J. Clin. Microbiol.*, v. 12, p. 4397-4403, 2010.

PARKS, T.; BARRETT, L.; JONES, N. Invasive streptococcal disease: a review for clinicians. *British Medical Bulletin*. v. 115, p. 77-89, 2015.

PEIXOTO, R. S. et al. Pathogenic properties of a Corynebacterium diphtheriae strain isolated from a case of osteomyelitis. *J. Med. Microbiol.*, v. 65, n. 11, p. 1311-1321, 2016.

PÉRICHON, B. et al. Regulation of PI-2b pilus expression in Hypervirulent *Streptococcus agalactiae* ST-17 BM110. *PLoS One*, v. 12, n. 1, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0169840.

PEZZICOLI, A. et al. Pilus backbone contributes to group B *Streptococcus* paracellular translocation through epithelial cells. *J. Infect. Dis.*, v. 198, p. 890-898, 2008.

PHO, K. B.; MACNEIL, L. T. Biology is the root of variability: cautionary tales in *Caenorhabditis elegans* biology. *Biochemical Society Transactions*, v. 47, p. 887-896, 2019.

POWELL, J. R.; KIM, D. H.; AUSUBEL, F. M. The G protein-coupled receptor FSHR-1 is required for the *Caenorhabditis elegans* innate immune response. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 106, p. 2782–2787, 2009.

POYART, C. et al. Multiplex PCR Assay for Rapid and Accurate Capsular Typing of Group B Streptococci. *J. Clin. Microbiol.*, v. 45, p. 1985–1988, 2007.

PRADEL, E. et al. Detection and avoidance of a natural product from the pathogenic bacterium *Serratia marcescens* by *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 104, p. 2295-2300, 2007.

PRITCHARD, D. G. et al. Characterization of the group B streptococcal hyaluronate lyase. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 315, p. 431-437, 1994.

PUERTAS-PRIETO, A. et al. *Streptococus agalactiae*: prevention and vaccine development. *Rev. Esp. Quimioter.*, v. 30, n. 5, p. 312-318, 2017.

PUJOL, N. et al. Reverse genetic analysis of components of the Toll signaling pathway in *Caenorhabditis elegans. Curr. Biol.*, v. 11, p. 809-821, 2001.

RAIZEN, D. M. et al., Lethargus is a *Caenorhabditis elegans* sleeplike state. *Nature*, v. 451, p. 569–572, 2008.

RAJAGOPAL, L. Understanding the regulation of Group B Streptococcal virulence factors. *Future Microbiol.*, v. 4, p. 201-221, 2009.

RAMASWAMY, S. V. et al. Molecular characterization of nontypeable group B streptococcus. *J. Clin. Microbiol.*, v. 44, p. 2398-2403, 2006.

REDDY, K. C. et al. A polymorphism in npr-1 is a behavioral determinant of pathogen susceptibility in *C. elegans. Science*, v. 323, p. 382-384, 2009.

RENEÁU, J. K.; PACKARD, V. S. Monitoring mastitis, milk quality and economic losses in dairy fields. *Dayri Food Environ. Sanitation*, v.11, p.4-11, 1991.

RENGARAJAN, S.; HALLEM, E. A. Olfactory circuits and behaviors of nematodes. *Curr. Opin. Neurobiol.*, v. 41, p. 136-148, 2016.

ROSINI R, MARGARIT I. Biofilm formation by *Streptococcus agalactiae*: influence of environmental conditions and implicated virulence factors. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 5, p. 85-96, 2015.

ROSINI, R. et al. Identification of novel genomic islands coding for antigenic *pilus*-like structures in *Streptococcus agalactiae*. *Mol. Microbiol.*, v. 61, p. 126-141, 2006.

RUAN, J-F. et al. Toward improving *Caenorhabditis elegans* phenome mapping with an ORFeome-based RNAi library. *Genome Res.*, v. 14, n. 10B, p. 2162–2168, 2004.

RUSSELL, J. et al. Humidity sensation requires both mechanosensory and thermosensory pathways in *Caenorhabditis elegans. Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 111, p. 8269–8274, 2014.

SAMUEL, B. S. et al. *Caenorhabditis elegans* responses to bacteria from its natural habitats. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 113, n. 27, p. 3941–3949, 2016.

SCHRAG, S. J. et al. Group B streptococcal disease in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis. *N. Engl. J. Med.*, v. 342, p. 15–20, 2000.

SCHUBERT, A. et al. A fibrinogen receptor from group B *Streptococcus* interacts with fibrinogen by repetitive units with novel ligand binding sites. *Mol. Microbiol.*, v. 46, p. 557-569, 2002.

SCHUCHAT, A. Epidemiology of group B Streptococcal disease in the United States: shifting paradigms. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 11, p. 497-513, 1997.

SCHULENBURG, H.; EWBANK, J. J. The genetics of pathogen avoidance in *Caenorhabditis elegans. Mol. Microbiol.*, v. 66, p. 563-570, 2007.

SCHULENBURG, H.; FÉLIX, M-A. The natural biotic environment of *Caenorhabditis* elegans. *Genetics*, v. 206, n. 1, p. 55–86, 2017.

SEALE, A. C. et al. Estimates of the burden of group B streptococcal disease worldwide for pregnant women, stillbirths, and children. *Clin. Infect. Dis.*, v. 65, p. S200–S219, 2017.

SHARMA, C. M. et al. "Neonatal Sepsis": Bacteria & their Susceptibility Pattern towards Antibiotics in Neonatal Intensive Care Unit. J. Clin. Diagn. Res., v. 7, p. 2511-2513, 2013.

SHAYE, D. D.; GREENWALD, I. OrthoList: a compendium of *C. elegans* genes with human orthologs. *PLoS ONE*, v. 6, n. 5, 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0020085.

SHTONDA, B. B.; AVERY, L. Dietary choice behavior in Caenorhabditis elegans. J. Exp. Biol., v. 209, n. 1, p. 89, 2006.

SIFRI, C, D. et al. *Caenorhabditis elegans* as a Model Host for *Staphylococcus aureus* Pathogenesis. *Infection and Immunity*, v. 71, n. 4, p. 2208-2217, 2003.

SINGH, J.; ABALLAY, A. Microbial colonization activates an immune fight-and-flight response via neuroendocrine signaling. *Dev. Cell*, v. 49, n. 1, p. 89-99, 2019.

SLOTVED, H. C. et al. Serotype IX, a proposed new *Streptococcus agalactiae* serotype. *J. Clin. Micobiol.*, v. 45, p. 2929-2936, 2007.

SOARES, T. C. G. et al. Prevalence of Group B *Streptococcus* serotypes III and V in pregnant women of Rio de Janeiro. *Brazil Brazilian Journal of Microbiology*, v. 44, p. 869-872, 2013.

SOUZA, C. et al. Virulence potential of *Corynebacterium striatum* towards *Caenorhabditis* elegans. Antonie van Leeuwenhoek, v. 112, p. 1331–1340, 2019.

SOUZA, V. C. et al. *Antimicrobial susceptibility and genetic diversity of Streptococcus agalactiae recovered from newborns and pregnant women in Brazil.* 2013. Disponível em: https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/7091. Acesso em: 27 fev. 2020.

SPELLERBERG, B. et al. Lmb, a protein with similarities to the Lral adhesion family, mediates attachment of *Streptococcus agalactiae* to human laminin. *Infect. Immun.*, v. 67, p. 871-878, 1999.

SPENCER, B. L. et al. Cas9 Contributes to Group B Streptococcal Colonization and Disease. *Front. Microbiol.*, v. 10, n. 1930 ,2019. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01930.

SPRINGMAN, A. C. et al. Selection, Recombination, and Virulence Gene Diversity among Group B Streptococcal Genotypes. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 191, n. 17, p. 5419-5427, 2009.

TAN, MAN-WAH.; MAHAJAN-MIKLOS, S.; AUSUBEL, F. M. Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Pseudomonas aeruginosa* used to model mammalian bacterial pathogenesis. *Microbiology*, v. 96, p. 715-720, 1999.

TAZI, A. et al. The surface protein HvgA mediates group B *Streptococcus* hypervirulence and meningeal tropism in neonates. *J. Exp. Med.*, v. 207, p. 2313-2322, 2010.

TEATERO, S. et al. Emergence of serotype IV group B streptococcus adult invasive disease in Manitoba and Saskatchewan, Canada, is driven by clonal sequence type 459 strains. *J. Clin. Microbiol.*, v. 53, p. 2919–2926, 2015.

TEATERO, S. et al. Characterization of invasive group B streptococcus from the greater Toronto area, Canada. J. Clin. Microbiol., v. 52, p. 1441–1447, 2014.

THOMSEN, L. E. et al. *Caenorhabditis elegans* is a model host for *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 72, p. 1700–1701, 2006.

TODD, E. A comparative serological study of streptolysins derived from human and animal infections with note on pneumococcal hemolysin, tetanolysin and streptococcal toxin. *J. Pathol. Bacteriol.*, v. 39, p. 299–321, 1934.

TROEMEL, E. Chemosensory signaling in C. elegans. BioEssays, v. 21, p. 1011-1020, 1999.

TROST. E. et al. Comparative analysis of two complete *Corynebacterium ulcerans* genomes and detection of candidate virulence factors. *BMC Genomics*, 2011.

VERANI, J. R.; MCGEE, L.; SCHRAG, S. J. Prevention of perinatal group B streptococcal disease–revised guidelines from CDC. *MMWR Recomm.*, v. 59, p. 1–36, 2010.

VILLAR, H. E.; JUGO, M. B. Emergence of high-level resistance to gentamicin and streptomycin in Streptococcus agalactiae in Buenos Aires, Argentina. *Rev. Esp. Quimiroter.*, v. 26, p. 112-115, 2013.

VORNHAGEN, J. et al. Group B streptococcus exploits vaginal epithelial exfoliation for ascending infection. J. Clin. Invest., v. 128, n. 5, p. 1985–1999, 2018.

WANG, W. et al. cGMP signalling mediates water sensation (hydrosensation) and hydrotaxis in *Caenorhabditis elegans. Sci. Rep.*, v. 6, n. 19779, 2016. DOI: 10.1038/srep19779.

WIBAWAN, I. W.; LÄMMLER, C. Relationship between group B streptococcal serotypes and cell surface hydrophobicity. *Zentralbl Veternarmed B.*, v. 39, p. 376-382, 1992.

WOLF, N. S.; AUSTAD, S. Introduction: Lifespans and Pathologies Present at Death in Laboratory Animals. *The Comparative Biology of Aging, Springer*, p. 1-26, 2010.

XU, A. et al. *Caenorhabditis elegans* MOM-4 is required for the activation of the p38 MAPK signaling pathway in the response to *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Protein Cell*, v. 4, p. 53–61, 2013.

ZEČIĆ, A.; DHONDT, I.; BRAECKMAN, B. P. The nutritional requirements of *Caenorhabditis elegans. Genes & nutrition*, v. 14-15, 2019.

ZHANG, H. et al. Guidelines for monitoring autophagy in *Caenorhabditis elegans*. *Autophagy*, v. 11, n. 1, p. 9-27, 2015.

ZHANG, Y.; LU, H.; BARGMANN, C. I. Pathogenic bacteria induce aversive olfactory learning in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, v. 438, n. 7065, p. 179-184, 2005.

ZHAO, B. et al. Reversal frequency in *Caenorhabditis elegans* represents an integrated response to the state of the animal and its environment. *J. Neurosci.*, v. 23, p. 5319–5328, 2003.

ZIMMERMANN, P.; GWEE, A.; CURTIS, N. The controversial role of breast milk in lateonset GBS disease. *J. Infect.*, v. 74, p. S34-S40, 2017.