

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

***GALLERIA MELLONELLA* COMO MODELO DE INFECÇÃO PARA O ESTUDO DA
PATOGENICIDADE DE *ESCHERICHIA COLI* PATOGÊNICA AVIÁRIA (APEC)**

Tese de Doutorado

Elisar Camilotti

PORTO ALEGRE

2022

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

***GALLERIA MELLONELLA* COMO MODELO DE INFECÇÃO PARA O ESTUDO DA
PATOGENICIDADE DE *ESCHERICHIA COLI* PATOGÊNICA AVIÁRIA (APEC)**

Autor: Elisar Camilotti

**Tese apresentada como requisito parcial para a
obtenção do grau de Doutor em Ciências
Veterinárias na área de Medicina Veterinária
Preventiva, especialidade Sanidade Avícola**

Orientador: Dr. Carlos Tadeu Pippi Salle

PORTO ALEGRE

2022

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

CIP - Catalogação na Publicação

Camilotti, Elisar
Galleria mellonella como modelo de infecção para o estudo da patogenicidade de Escherichia Coli patogênica aviária (APEC) / Elisar Camilotti. -- 2022.
112 f.
Orientador: Carlos Tadeu Pippi Salle.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2022.

1. Escherichia coli patogênica aviária (APEC). 2. Galleria mellonella. 3. Índice de patogenicidade. 4. Colibacilose aviária. I. Salle, Carlos Tadeu Pippi, orient. II. Título.

Elisar Camilotti

Galleria mellonella como modelo de infecção para o estudo da patogenicidade de *Escherichia coli* patogênica aviária (APEC)

Aprovado em 23 SET 2022

APROVADO POR:

Prof. Dr. Carlos Tadeu Pippi Salle

Orientador e Presidente da Comissão

Dra. Daniela Tonini da Rocha

Membro da Comissão

Prof. Dr. Hamilton Luiz de Souza Moraes

Membro da Comissão

Dr. Benito Guimarães de Brito

Membro da Comissão

DEDICATÓRIA

À minha esposa, Aline Procredi, pelo apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Juscelino e Justina e aos meus irmãos Eliseu e Gustavo, agradeço pela força, apoio e incentivo nos momentos difíceis e por compreenderem a minha ausência enquanto eu me dedicava à realização deste trabalho. Vocês são minha base sólida e meu porto seguro.

À minha esposa Aline, por todo amor, carinho, respeito e compreensão. Você sempre foi muito especial e fundamental em todos os momentos da minha trajetória acadêmica e pessoal. Por tudo o que construímos juntos, obrigado!

Ao Prof. Tadeu, pela confiança, amizade, incentivo e dedicação incansável em transmitir seus conhecimentos. Para mim és um exemplo de profissional. Não existem palavras o suficiente para agradecer a oportunidade de fazer doutorado no CDPA. Obrigado por todos os seus conselhos, me fizeram crescer pessoal e profissionalmente.

Ao Prof. Hamilton, pelo apoio, dedicação ao ensino, amizade, respeito, comprometimento e incentivo. Obrigado por toda a contribuição na minha formação.

À Profa. Dra. Viviane Sandra Alves, do Laboratório de Entomologia e Controle Microbiano, da Universidade Estadual do Norte do Paraná (UENP), que gentilmente cedeu algumas cartelas com ovos de *Galleria mellonella* para iniciarmos a criação das larvas no CDPA.

Ao Eder Barbosa Oliveira, da empresa Mercoaves, que forneceu os pintinhos utilizados nos experimentos.

Aos funcionários, colegas de pós-graduação e estagiários, pela amizade, convivência, ajuda e atenção. Levarei comigo a lembrança de todos.

Aos colegas do CDPA, em especial ao Thales, Karen, Gabriela, Oscar e Thaína, pela parceria, apoio, amizade e confiança. O auxílio de vocês foi fundamental na execução dos experimentos deste trabalho.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo ensino público, gratuito e de qualidade e à coordenação, demais professores, funcionários e colegas do Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, pela troca de experiências e conhecimentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo financiamento do projeto de pesquisa e pela bolsa de estudo.

A todos aqueles que aqui não citei, mas que de uma maneira ou de outra contribuíram para minha formação durante o período de permanência no CDPA.

RESUMO

A colibacilose é causada por um grupo de bactérias denominado *Escherichia coli* patogênica aviária (APEC). Dependendo da virulência das cepas, da condição de saúde do hospedeiro e da presença e tipo de fatores predisponentes, a infecção se manifesta como uma septicemia inicial, seguida por morte súbita ou inflamação localizada em múltiplos órgãos. Técnicas moleculares identificaram alguns genes-chave de virulência APEC, mas estes não ocorrem universalmente nos isolados. A diversidade fenotípica e genotípica sugere a presença de múltiplos mecanismos mediando a patogenicidade. Pesquisas sobre a patogênese ainda requerem o uso de animais em modelos de infecção para reproduzir a doença. Devido a questões de custos, conflitos éticos e tempo de execução, recentemente tem sido proposto o uso do inseto *Galleria mellonella* como hospedeiro em ensaios *in vivo*. Estudos já demonstraram haver correlação entre o modelo *Galleria* e modelos bem estabelecidos de vertebrados. Dentro deste contexto, procurou-se determinar a viabilidade e a reprodutibilidade do uso de larvas de *G. mellonella* na caracterização da patogenicidade de isolados APEC. Para isso, variáveis de resposta do inseto foram aferidas e correlacionadas (coeficiente de correlação de Spearman, ρ) com o índice de patogenicidade (IP, 0-10) das APEC determinado em aves (pintos de um dia de idade). Inoculações preliminares serviram para padronização do peso ideal das larvas (260-320mg), tempo total de observação pós-inoculação (72h) e dose letal para 50% das larvas (DL₅₀, média de 10⁵ UFC/larva). Três ensaios de infecção independentes foram realizados ($n= 40$ amostras APEC). As larvas inoculadas (10 larvas/cepa) foram monitoradas a cada 12 horas, revelando os dados dos seguintes parâmetros: taxa de mortalidade (%), DL₅₀, curvas de sobrevivência, melanização *in vitro* (hemolinfa) e visual (sem/mínima, média e máxima), densidade celular (hemócitos/mL), lesão celular (enzima lactato desidrogenase, LDH) e escore de doença larval (0-10). Os experimentos de inoculação demonstraram que as larvas de *G. mellonella* foram susceptíveis à infecção por APEC, sendo a mortalidade dose-dependente. Além da baixa correlação com o IP, as variáveis densidade celular e LDH não apresentaram poder de discriminação de virulência entre cepas. A melanização *in vitro* demonstrou correlação forte (ρ de 0,731) com o IP, porém a análise utilizou dados de apenas 15 isolados APEC. As variáveis DL₅₀, taxa de mortalidade e melanização visual (corpo da larva) apresentaram associação fraca (ρ de -0,422, 0,450 e 0,456, respectivamente) com o IP. O parâmetro que melhor caracterizou a patogenicidade das cepas APEC foi o escore de doença larval, possivelmente por somar os efeitos de quatro variáveis (mortalidade, melanização, formação de casulo e atividade). A correlação com o IP foi moderada (ρ de 0,558), mas estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$). As curvas de sobrevivência se revelaram úteis na análise comparativa entre os perfis de mortalidade provocados pelas cepas APEC de baixa (IP $\leq 1,99$), intermediária (IP 2 a 4,99) e alta patogenicidade (IP ≥ 5). Os dados gerados no presente trabalho sustentam a indicação do modelo de infecção com larvas de *G. mellonella* como uma metodologia válida para a determinação da patogenicidade de isolados APEC. O modelo se mostrou assertivo na caracterização de cepas com virulência bem definida (apatogênicas e de alta patogenicidade).

Palavras-chave: APEC, galinha, patogenicidade, *G. mellonella*, escore de doença larval.

ABSTRACT

Avian colibacillosis is caused by a group of bacteria called avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). The infection generally manifests as an initial septicemia that is followed by sudden death or localized inflammation in multiple organs; however, this is highly dependent on the virulence of the strain, host status, and presence and type of predisposing factors. Molecular techniques have been used to identify some key APEC virulence genes, but these do not occur universally in all isolates. The phenotypic and genotypic diversity suggests the presence of multiple mechanisms that mediate pathogenicity. Pathogenesis research still requires the use of animals in infection models to replicate the disease condition. Owing to cost issues, ethical considerations and execution time, the use of the insect *Galleria mellonella* as a host in *in vivo* assays has recently been proposed. Studies have already demonstrated a correlation between the *Galleria* model and well-established vertebrate models. Thereby, the present study aimed to determine the viability and reproducibility of using *G. mellonella* larvae to characterize the pathogenicity of APEC isolates. For this, insect response variables were measured and correlated (Spearman's correlation coefficient, ρ) with the pathogenicity index (PI, 0–10) of APEC determined in day-old chicks. Preliminary inoculations were used to standardize the ideal weight of the larvae (260–320 mg), total post-inoculation observation time (72 h), and the lethal dose for 50% of the larvae (LD₅₀, 10⁵ CFU/larva). Three independent infection assays were performed (n=40 APEC samples). The inoculated larvae (10 larvae/strain) were monitored every 12 h, revealing the data for the following parameters: mortality rate (%), LD₅₀, survival curves, *in vitro* (hemolymph) and visual melanization (no/minimum, medium, and maximum), cell density (hemocytes/mL), cell injury (lactate dehydrogenase enzyme, LDH), and larval disease score (0–10). Inoculation experiments demonstrated that *G. mellonella* larvae were susceptible to APEC infection, with mortality being dose-dependent. In addition to the low correlation with PI, the cell density and LDH variables did not show virulence discrimination power between strains. *In vitro* melanization showed a strong correlation ($\rho=0.731$) with IP; however, data from only 15 APEC isolates were used for the analysis. The variables LD₅₀, mortality rate, and visual melanization (larva body) showed a weak association ($\rho=-0.422$, 0.450, and 0.456, respectively) with PI. The parameter that best characterized the pathogenicity of APEC strains was the larval disease score, possibly owing to the additive effects of four variables (mortality, melanization, cocoon formation, and activity). The correlation with PI was moderate ($\rho=0.558$), but statistically significant ($p\leq 0.05$). Survival curves proved to be useful in the comparative analysis between the mortality profiles caused by slightly (PI ≤ 1.99), intermediately (PI 2–4.99), and highly pathogenic (PI ≥ 5) APEC strains. The data generated in the present work support the suggestion that the infection model with *G. mellonella* larvae is a valid methodology for the determination of the pathogenicity of APEC isolates. The model proved to be definitive in the characterization of strains with well-defined virulence (apathogenic and highly pathogenic).

Keywords: APEC, chicken, pathogenicity, *Galleria mellonella*, larval disease score.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Associação observada entre a patogenicidade <i>in vivo</i> (escala de 0 a 10), determinada em pintos de um dia de idade, de 460 cepas APEC e os quatro grupos filogenéticos (A, B1, B2, D) pesquisados. Os dados expressam a distribuição das cepas e a média dos índices de patogenicidade (IP) em cada grupo.....	24
Figura 2 -	Estágios de desenvolvimento do inseto <i>Galleria mellonella</i>	29
Figura 3 -	Características macroscópicas de machos e fêmeas do inseto <i>Galleria mellonella</i>	29
Figura 4 -	Índice de patogenicidade das cepas APEC observados nas inoculações experimentais com pintos de um dia de idade.....	53
Figura 5 -	Índice de patogenicidade de cepas APEC e a classificação em grupos filogenéticos.....	55
Figura 6 -	Número de larvas mortas, após inoculação com solução estéril, em cada uma das cinco categorias de peso.....	57
Figura 7 -	Perfil de mortalidade observado em larvas de <i>G. mellonella</i> inoculadas com suspensões de cepas APEC em diferentes concentrações.....	59
Figura 8 -	Curvas de sobrevivência construídas a partir dos dados de mortalidade de larvas encontrados após as inoculações com cepas APEC ($n=15$).....	62
Figura 9 -	Correlação encontrada entre os valores individuais de DL_{50} das cepas APEC e a patogenicidade determinada nas inoculações em pintos de um dia de idade.....	65
Figura 10 -	Comparação de médias das DL_{50} entre os grupos de patogenicidade das cepas APEC.....	66
Figura 11 -	Níveis de melanização <i>in vitro</i> da hemolinfa de larvas de <i>G. mellonella</i> desafiadas com cepas APEC, de diferentes graus de patogenicidade, obtidos às 4, 12 e 24h pós-inoculação.....	69
Figura 12 -	Parâmetro visual para intensidade de melanização em larvas de <i>G. mellonella</i>	71
Figura 13 -	Dados de melanização das larvas quando avaliadas pelo método visual e com valor <i>in vitro</i> correspondente (espectrofotometria).....	72
Figura 14 -	Avaliação visual da melanização de larvas de <i>G. mellonella</i> 24h após inoculação com isolados APEC e a associação com o IP.....	73

LISTA DE FIGURAS

Continuação...

Figura 15 -	Comparação de médias dos dados de melanização visual entre os grupos de patogenicidade APEC.....	74
Figura 16 -	Densidade celular (concentração de hemócitos) na hemolinfa de larvas de <i>G. mellonella</i> às 4, 12 e 24h pós-desafio com isolados APEC.....	78
Figura 17 -	Curvas de sobrevivência das larvas de <i>G. mellonella</i> após desafio com cepas APEC de baixa patogenicidade (n=15).....	82
Figura 18 -	Curvas de sobrevivência das larvas de <i>G. mellonella</i> após desafio com cepas APEC de patogenicidade intermediária (n=10).....	82
Figura 19 -	Curvas de sobrevivência das larvas de <i>G. mellonella</i> após desafio com cepas APEC de alta patogenicidade alta (n=15).....	83
Figura 20 -	Curvas de sobrevivência das larvas de <i>G. mellonella</i> elaboradas com base nas taxas de mortalidade médias, após desafio com cepas APEC (n=40).....	83
Figura 21 -	Índice de patogenicidade das cepas APEC e a relação com o escore de doença larval de <i>G. mellonella</i> às 24h pós-inoculação.....	87
Figura 22 -	Análise comparativa entre os valores de escore de doença larval de acordo com o grupo de patogenicidade das cepas APEC.....	87

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Alguns dos componentes das respostas imunes celular e humoral do inseto <i>G. mellonella</i>	34
Quadro 2 -	Parâmetros que compõem o escore de doença larval.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Índice de patogenicidade das cepas APEC determinado após inoculação em pintos de um dia de idade.....	53
Tabela 2 -	Associação entre a patogenicidade <i>in vivo</i> (pintos de um dia) e a classificação em grupos filogenéticos.....	55
Tabela 3 -	Perfil de mortalidade de larvas de <i>G. mellonella</i> observado após inoculações com diferentes concentrações de células das cepas APEC.....	59
Tabela 4 -	Valor da DL ₅₀ das cepas APEC calculada a partir de diferentes períodos de observação, horas pós-inoculação.....	61
Tabela 5 -	DL ₅₀ das cepas APEC (<i>n</i> =40) calculada a partir dos dados de mortalidade computados dentro do período de avaliação de 72h pós-inoculação.....	64
Tabela 6 -	Análise comparativa da patogenicidade das cepas APEC a partir da estratificação dos valores de DL ₅₀ individuais.....	67
Tabela 7 -	Dados de melanização das larvas desafiadas com cepas APEC, obtidos por meio da avaliação <i>in vitro</i> da hemolinfa coletada às 4, 12 e 24h pós-inoculação.....	70
Tabela 8 -	Análise comparativa entre os valores de melanização encontrados nas larvas desafiadas com cepas APEC, de acordo com o grupo de patogenicidade.....	70
Tabela 9 -	Quantificação da enzima lactato desidrogenase (LDH) na hemolinfa de larvas desafiadas com cepas APEC.....	76
Tabela 10 -	Análise da densidade celular (total de hemócitos/mL) da hemolinfa de larvas desafiadas com cepas APEC de patogenicidade variável.....	79
Tabela 11 -	Análise comparativa da patogenicidade das cepas APEC a partir das taxas de mortalidade, observadas às 12 e 72h pós-inoculação das larvas de <i>G. mellonella</i>	84
Tabela 12 -	Grupos de patogenicidade e escore de doença larval 24h pós-inoculação das cepas APEC.....	88
Tabela 13 -	Nível e tipo de associação encontrada entre as variáveis de resposta do modelo de <i>G. mellonella</i> e o IP de APEC.....	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
APEC	<i>Escherichia coli</i> Patogênica Aviária
BHI	<i>Brain Heart Infusion Broth</i>
CDPA	Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária
DL ₅₀	Dose letal para 50%
OD	Densidade óptica
EAEC	<i>Escherichia coli</i> Enteroagregativa
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EHEC	<i>Escherichia coli</i> Enterohemorrágica
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EMB	Eosin Methylene Blue ágar
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
ERIC-PCR	PCR de Consenso Intergênico Repetitivo Enterobacteriano
ExPEC	<i>Escherichia coli</i> patogênica extraintestinal
HCl	Ácido clorídrico
IP	Índice de Patogenicidade
IPS	Tampão anticoagulante estéril
LDH	Enzima lactato desidrogenase
<i>n</i>	Número de amostras
NMEC	<i>E. coli</i> causadora de meningite em neonatos
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial hidrogênico
PO	Enzima fenoloxidase
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
SPF	<i>Specific Pathogen Free</i>
SPS	Síndrome salpingoperitonite
TRIS	Tris (hidroximetil) aminometano
UFC	Unidade formadora de colônia
UPEC	<i>Escherichia coli</i> Uropatogênica

LISTA DE SÍMBOLOS

h	Hora
mm	Milímetro
°C	Grau Celsius
%	Percentual
H ₂ S	Sulfeto de hidrogênio
mg	Miligrama
g	Gramma
μL	Microlitro
mM	Milimolar
nm	Nanômetro
M	Molar
min	Minuto
Log	Logarítmo na base 10
cm	Centímetro
mL	Mililitro
HCl	Ácido clorídrico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	OBJETIVOS.....	17
2.1	Objetivo geral.....	17
2.2	Objetivos específicos.....	17
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
3.1	Colibacilose aviária.....	18
3.1.1	Diagnóstico.....	19
3.1.2	Medidas de controle, prevenção e tratamento.....	20
3.2	Caracterização do patotipo APEC.....	22
3.3	Modelos animais para estudo da patogenicidade de APEC.....	25
3.3.1	Insetos como hospedeiros em modelos de infecção: o caso da traça <i>Galleria mellonella</i>	27
3.3.1.1	Estudos sobre a patogenicidade de <i>E. coli</i> em <i>G. mellonella</i>	37
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	40
4.1	Local do estudo.....	40
4.2	Cepas de APEC.....	40
4.2.1	Reativação e confirmação da pureza das amostras bacterianas.....	40
4.3	Criação e seleção das larvas de <i>G. mellonella</i>.....	40
4.4	Cultivo e preparo das suspensões bacterianas (inóculos).....	42
4.5	Determinação do índice de patogenicidade das cepas APEC em modelo com aves.....	42
4.5.1	Aquisição, alojamento e manutenção dos animais experimentais.....	43
4.5.2	Procedimento de inoculação das aves.....	44
4.5.3	Cálculo do índice de patogenicidade.....	44
4.6	Associação entre os índices de patogenicidade e os grupos filogenéticos.....	45
4.7	Padronização das variáveis peso (mg) e tempo de observação pós-inoculação (h).....	46
4.7.1	Padronização do peso mínimo das larvas.....	46
4.7.2	Período de observação das larvas pós-inoculação.....	46
4.8	Variáveis de resposta do inseto hospedeiro à infecção com APEC.....	47
4.8.1	Determinação da dose letal 50% (DL ₅₀).....	47
4.8.2	Coleta da hemolinfa.....	48

4.8.3	Melanização.....	48
4.8.4	Teste de citotoxicidade	49
4.8.5	Análise da densidade celular (contagem total de hemócitos).....	49
4.8.6	Cálculo da taxa de mortalidade e construção das curvas de sobrevivência.....	50
4.8.7	Determinação do escore de doença larval.....	50
4.9	Análises estatísticas dos dados.....	51
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	53
5.1	Índice de patogenicidade das cepas APEC no modelo com aves.....	53
5.2	Associação entre o IP e os grupos filogenéticos.....	54
5.3	Peso ideal das larvas de <i>G. mellonella</i> para ensaios de inoculação.....	56
5.4	Susceptibilidade das larvas a estirpes APEC e período de observação pós-inoculação.....	58
5.5	Caracterização da patogenicidade de isolados APEC em ensaios de infecção <i>in vivo</i> com larvas de <i>G. mellonella</i>.....	64
5.5.1	DL ₅₀ das cepas APEC.....	64
5.5.2	Melanização.....	68
5.5.2.1	Melanização <i>in vitro</i> vs <i>in vivo</i>	71
5.5.2.2	Associação entre a resposta de melanização e o IP dos isolados APEC.....	73
5.5.3	Lesão celular (citotoxicidade).....	75
5.5.4	Densidade celular da hemolinfa.....	78
5.5.5	Curva de sobrevivência e taxa de mortalidade.....	81
5.5.6	Escore de doença larval.....	86
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	92
7	CONCLUSÕES.....	96
	REFERÊNCIAS.....	98
	APÊNDICE A - Identificação, origem e grupo filogenético das amostras APEC.....	108
	APÊNDICE B – Curvas de sobrevivência das larvas de <i>G. mellonella</i> após desafio com cepas APEC (<i>n</i>=40).....	110
	ANEXO A - Carta de Aprovação do Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA-UFRGS).....	111

1 INTRODUÇÃO

A colibacilose é uma doença infecciosa das aves causada por *Escherichia coli*, sendo considerada uma das principais causas de morbidade e mortalidade, seja como agente primário ou secundário - por sua associação com diversas enfermidades. *Escherichia coli* patogênica aviária (APEC) é um dos patótipos que constituem o grupo de *E. coli* patogênica extraintestinal (ExPEC), tendo o intestino das aves como seu reservatório. Dentre os diversos quadros anatomopatológicos que se pode observar em aves acometidas pela enfermidade, destacam-se: aerossaculite, hepatite, infecção do saco vitelino, onfalite, celulite, coligranuloma, ooforite, salpingite, peritonite, pericardite e septicemia.

A colibacilose afeta aves de todas as idades e é responsável por grandes perdas econômicas na indústria avícola, devido aos custos com queda de desempenho produtivo, mortalidade, condenação parcial ou total de carcaças e tratamentos. É causada por uma ampla gama de estirpes de *E. coli*, com destaque para os sorogrupos O1, O2 e O78. Essa diversidade antigênica tem limitado o efeito de medidas de prevenção e controle e reduzido a eficiência de vacinas frente a desafios heterólogos.

Embora nos últimos anos a APEC tenha sido aceita como um patógeno primário, a compreensão dos seus mecanismos de patogênese tem se mantido relativamente limitada. Estudos clássicos visando compreender os fatores associados e, por fim, determinar a patogenicidade de isolados dessa bactéria têm se baseado em testes laboratoriais fenotípicos (perfil bioquímico, perfil de resistência microbiana, formação de biofilme, sorotipificação e fagotipagem) e, principalmente, moleculares (genes de virulência e grupos filogenéticos). Os trabalhos publicados ainda não demonstraram haver um perfil fenotípico ou molecular que permita a clara e definitiva distinção entre isolados *E. coli* comensais (apatogênicos) e patogênicos. Cepas APEC de alta patogenicidade não estão estritamente associadas a nenhum gene de virulência ou grupo filogenético específico, e vice-versa. A ausência de padrões de características fenotípicas e moleculares da APEC está diretamente associada à diversidade genética, à variação no potencial de expressão de genes, à plasticidade do genoma da bactéria e à susceptibilidade momentânea do hospedeiro. Sendo assim, é preciso explorar associações mais consistentes entre métodos de determinação e as variações de patogenicidade dos isolados APEC. Dentro deste contexto, modelos de infecção *in vivo* passam a ser uma escolha mais lógica, pois possibilitam confrontar o potencial de virulência de cada estirpe *E. coli* e os fatores condicionantes do hospedeiro.

A inoculação da *E. coli* em pintos de um dia de idade, com posterior observação da mortalidade e presença de lesões, pode ser considerada a metodologia padrão-ouro em estudos de patogenicidade, justamente por reproduzir a doença na espécie animal alvo (SOUZA *et al.*, 2016). Por outro lado, há opiniões contrárias ao uso desse modelo, por envolver conflitos éticos e por considerar um método caro e pouco prático. Dentro desta perspectiva, métodos *in vivo* alternativos para estudo da patogênese têm surgido ao longo da última década.

Em centros de estudo aplicados à saúde humana já é comum o uso de insetos em pesquisas experimentais, com destaque mais recente para o uso da traça maior da cera, *G. mellonella*. Este inseto possui características que o torna particularmente útil: baixo custo, possibilidade de criação em larga escala, facilidade de manuseio, relativamente grandes em tamanho (20mm) e manutenção a 37 °C, sendo este um atributo importante em pesquisas com agentes patogênicos. Além disso, a semelhança, em termos gerais, entre o sistema imune inato do inseto e dos animais vertebrados têm feito deste inseto uma escolha popular em avaliações da virulência de bactérias e da eficácia de agentes antimicrobianos. Algumas bactérias de interesse à saúde pública já foram avaliadas neste modelo, como *Klebsiella pneumoniae*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Typhimurium*, entre outras. Vários patótipos de *E. coli*, sendo o APEC uma das exceções, já foram estudados em modelo com *G. mellonella* e os resultados obtidos demonstraram que a traça é susceptível à infecção por este gênero bacteriano e que o modelo com o inseto apresenta . Além disso, correlações significativas entre os modelos de infecção em mamíferos e *G. mellonella* já foram demonstrados em diversos trabalhos científicos.

Os dados encontrados na literatura abriram a perspectiva de que ensaios *in vivo* de patogenicidade, utilizando o inseto hospedeiro, se bem padronizados, podem se tornar relativamente rápidos, de fácil execução e interpretação. Dessa forma, o estudo proposto teve como objetivo investigar a patogenicidade de isolados APEC em modelo de infecção com larvas de *G. mellonella*, comparando os resultados obtidos com aqueles observados paralelamente em modelo com aves (pintos de um dia de idade).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Verificar se a patogenicidade de isolados APEC caracterizada em modelo de infecção *in vivo* com larvas da traça grande da cera, *Galleria mellonella*, tem associação com a observada em modelo com aves (pintos de um dia de idade).

2.2 Objetivos específicos

Analisar se a larva da *G. mellonella* é susceptível à infecção por APEC.

Estabelecer protocolo padrão para os ensaios de inoculação, a partir da definição do peso ideal das larvas, tempo de observação pós-inoculação e dose infectante.

Investigar quais variáveis de resposta qualitativas e quantitativas do inseto hospedeiro oferecem maior poder de discriminação da virulência entre os isolados APEC.

Aferir o tipo e o grau de correlação existente entre o índice de patogenicidade (IP, 0-10) de cepas APEC, determinado em aves e considerado padrão-ouro para efeito de comparação, e a patogenicidade observada no modelo com larvas de *G. mellonella*, aferida por meio de diferentes variáveis de resposta do inseto à infecção induzida.

Verificar se o modelo com *G. mellonella* apresenta maior capacidade de caracterizar a patogenicidade de amostras APEC quando comparado à análise dos grupos filogenéticos (A, B1, B2 e D).

Padronizar um método *in vivo* de determinação do potencial patogênico de APEC baseado na infecção de larvas de *G. mellonella*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Colibacilose aviária

Escherichia coli faz parte da microfauna natural do intestino das aves, sendo também encontrada no trato respiratório superior (faringe e traqueia), pele e penas. A maioria das cepas de *E. coli* é apatogênica, havendo um número limitado de estirpes implicadas em infecções de campo (GUABIRABA; SCHOULER, 2015). As cepas ditas virulentas e que possuem a capacidade de causar doenças nas aves constituem o patotipo denominado "APEC" - *E. coli* patogênica aviária (EWERS *et al.*, 2009).

Nas criações em grande escala, as cepas de APEC causam uma ampla gama de infecções localizadas e sistêmicas comumente chamadas de colibacilose aviária. A enfermidade é endêmica e, por isso, caracteriza-se como uma das principais causas de mortalidade e morbidade, associada a perdas econômicas no setor em todo o mundo. Estas ocorrem a partir de menores taxas de eclosão, menor produção de ovos, aumento da mortalidade, menor taxa de ganho de peso, condenação total ou parcial de carcaças no abate e outros custos associados ao tratamento e profilaxia da enfermidade (NOLAN *et al.*, 2013).

Mesmo não havendo dúvidas sobre o grande impacto econômico da colibacilose aviária, é difícil encontrar dados quantitativos reais sobre o custo econômico dessa doença para a indústria avícola. Oliveira *et al.* (2016) ao pesquisarem as principais causas de condenação ao abate de aves em matadouros frigoríficos registrados no Serviço de Inspeção Federal, entre 2006 e 2011, verificaram que lesões de celulite, artrite e aerossaculite representaram 1,04% (aproximadamente, 278 milhões de aves) do total de condenações no período, as quais, pode-se inferir, estão direta ou indiretamente relacionadas a ocorrência da colibacilose nos lotes acometidos. Outros estudos estimaram que 36-43% das carcaças de frango condenadas no processamento apresentam lesões consistentes a infecções por *E. coli* (HASAN *et al.*, 2011; YOGARATNAM, 1995).

A APEC pode infectar todos os tipos de aves, em todas as idades, em qualquer sistema de produção (GUABIRABA; SCHOULER, 2015). A enfermidade é amplamente prevalente em galinhas de todas as idades (9 a 36%), com taxa de prevalência especialmente alta em aves adultas de postura (RAHMAN *et al.*, 2004). A via da infecção parece originar-se da colonização respiratória e vaginal (LANDMAN; HEUVELINK; VAN ECK, 2013).

As formas mais comuns de infecção localizada ocasionadas por cepas APEC, como agente primário, são infecções do trato reprodutivo, celulite, infecção do saco vitelino e onfalite.

Infecções do trato reprodutivo incluem salpingite, ooforite, peritonite e síndrome salpingoperitonite (SPS), esta muito comum em reprodutoras leves e pesadas. A SPS pode afetar galinhas desde o início da postura até seu pico de produção, com aproximadamente 34 semanas de idade (AZEEM *et al.*, 2017). A onfalite e a infecção do saco vitelino ocorrem por contaminação fecal dos ovos (no momento da passagem pela cloaca ou pelo contato com a cama contaminada) ou *in ovo* durante a formação dos mesmos, quando as galinhas estão com infecção no seu trato reprodutivo. Com a contaminação dos ovos, a doença tende a aparecer já nos primeiros dias após o nascimento dos pintos.

Sem dúvidas a síndrome mais estudada e compreendida é a forma sistêmica de colibacilose, de origem respiratória, que induz a colisepticemia. Essa ocorre em aves submetidas a situações de estresse e que estão imunocomprometidas devido a (1) condições ambientais deterioradas de galpões avícolas, tais como alto nível de poeira e amônia, (2) à infecção micoplasmática, (3) a infecções por metapneumovírus aviário, (4) ao vírus da bronquite infecciosa, (5) ao vírus da doença de Newcastle, incluindo infecções por cepas vacinais, e (6) a deficiências nutricionais. Esses fatores bióticos e abióticos podem levar a uma resposta imune prejudicada e, por vezes, a uma deciliação das células epiteliais traqueais (GUABIRABA; SCHOULER, 2015). Esse defeito nas defesas mecânicas epiteliais favorece a colonização do trato respiratório superior e inferior por cepas de APEC presentes no ambiente, e, por consequência, a instalação da infecção respiratória. A APEC atravessa os epitélios respiratórios e penetra profundamente na mucosa e na submucosa para alcançar a corrente sanguínea, causando a colisepticemia. Aves que sobrevivem ao processo infeccioso podem desenvolver aerosaculite subaguda fibrinopurulenta, pericardite e perihepatite. Embora a aerosaculite seja observada, não está claro se resulta da exposição respiratória primária ou da extensão da poliserosite. Por se tratar de uma bactéria oportunista, sequelas de colisepticemia podem também causar artrite, osteomielite, peritonite e salpingite (DZIVA; STEVENS, 2008). Importante salientar que, até o momento, os mecanismos de virulência da APEC ainda não estão bem definidos.

3.1.1 Diagnóstico

A suspeita de colibacilose se dá com base nas características clínicas e nas lesões macroscópicas típicas. O diagnóstico é obtido pelo isolamento da *E. coli* a partir do sangue e qualquer órgão acometido, principalmente fígado, baço e coração (KABIR, 2010).

Gomis *et al.* (1997) experimentalmente demonstraram que em casos agudos, o isolamento da bactéria é possível de seis horas a três dias após a infecção; nos casos subagudos, o isolamento só é possível até sete dias após a infecção. A contaminação das amostras clínicas a partir dos intestinos é um fator que deve ser considerado, mesmo quando são utilizados materiais de coleta estéreis e procedimentos bacteriológicos adequados. Meios seletivos como os ágaros McConkey e Eosina Azul de Metileno são usados para isolamento da bactéria. A identificação adicional das colônias isoladas é baseada em reações bioquímicas (produção de indol, fermentação de glicose com produção de gás, presença de β -galactosidase, ausência de produção de sulfeto de hidrogênio (H₂S), ausência de urease e incapacidade de usar citrato como fonte de carbono) (DHO-MOULIN; FAIRBROTHER, 1999). A sorotipagem O é um método de tipagem frequentemente usado para caracterização de isolados, enquanto que testes de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) para detecção de anticorpos são poucos utilizados, uma vez que só detectam tipos homólogos de APEC.

Genes associados à virulência e detectados em cepas isoladas de lesões características de colibacilose, também são encontrados em isolados fecais de aves clinicamente saudáveis (KABIR, 2010). Por esse motivo, a análise do perfil genético (presença ou ausência de genes) atualmente tem pouca importância para fins de diagnóstico.

A presença de *E. coli* é tão frequente em quadros de doença que, ao ser citada nos laudos laboratoriais, os médicos veterinários têm dificuldades em avaliar o risco que determinados isolados representam. As cepas são muito heterogêneas, tanto em seu fenótipo quanto em seu genótipo, no que se refere ao seu potencial de virulência. Embora um diagnóstico adequado de colibacilose exija o isolamento e a identificação de *E. coli* nas aves com suspeita clínica da doença, a virulência da estirpe ainda precisa ser confirmada em modelos animais.

3.1.2 Medidas de controle, prevenção e tratamento

A ocorrência de surtos de campo está diretamente associada a uma grande variedade de sorogrupos de *E. coli*, além de cepas multirresistentes a antimicrobianos, e isso tem dificultado a prevenção e o controle da colibacilose.

A APEC tem como reservatório o intestino das aves, o que favorece a disseminação e transmissão do agente pelas fezes dos animais, que invariavelmente estão presentes em toda a instalação de criação e nos equipamentos ali contidos (cama, ninhos, bebedouros, comedouros, cortinas, entre outros). Estima-se que a poeira presente nos aviários de criação abriga até 10⁶ unidades formadoras de colônias de *E. coli* por grama (HARRY, 1964), devido ao fato da

bactéria persistir em ambientes secos. Além disso, roedores também podem atuar como portadores de APEC e, portanto, são uma fonte de contaminação potencial para as aves (NOLAN *et al.*, 2013). Em uma única ave, um grande número de *E. coli* com diferentes graus de patogenicidade pode estar presente.

Como o risco de ocorrência da colibacilose aumenta à medida que se eleva a pressão de infecção, muitas das medidas sanitárias adotadas para amenizar os impactos da enfermidade passam pelo controle das condições ambientais. E as medidas também devem refletir no incubatório, pois se sabe que logo após o nascimento os pintos adquirem uma gama diversificada de *E. coli*, como parte de sua microbiota, originária do ambiente de incubação. E dentro dessa população, pode haver isolados potencialmente patogênicos, levando à ocorrência de quadros de infecção precoce e altas taxas de morbidade e mortalidade.

O primeiro passo é a prevenção da contaminação dos ovos pela fumigação, em até duas horas após a sua postura, e pela remoção de ovos trincados e aqueles com excesso de material fecal aderido à casca (KABIR, 2010). Além disso, é importante a adequada limpeza e desinfecção das incubadoras, evitando-se incubar ovos de diferentes origens (galpões de reprodução). O uso de sistemas de filtração de ar reduz a dissipação da bactéria nos ambientes do incubatório.

No momento do alojamento e durante todo o ciclo produtivo das aves, deve-se atentar à manutenção de adequadas condições ambientais, principalmente no que diz respeito à ventilação, à amônia, à poeira em suspensão, à temperatura, à umidade, à densidade das aves e à qualidade da cama (DHO-MOULIN; FAIRBROTHER, 1999). A utilização de probióticos e produtos de exclusão competitiva podem auxiliar na eliminação de cepas APEC do sistema digestivo das aves (PEREIRA; KNOBL, 2009).

A redução da ocorrência da colibacilose também passa pelo controle efetivo de outros patógenos aviários, destacando-se os vírus respiratórios e imunossupressores, onde a *E. coli* atua como agente oportunista, maximizando o desafio infeccioso às aves acometidas. Programas de vacinação devem ser mantidos para evitar a ocorrência dessas doenças em lotes de reprodutoras, poedeiras comerciais e frangos de corte. Além disso, todos os plantéis de reprodutoras devem ser mantidos livres de *Mycoplasma gallisepticum*, monitorando-se o *status* das criações por meio de provas sorológicas (KABIR, 2010; PEREIRA; KNOBL, 2009).

Embora diversos métodos de controle e prevenção da colibacilose aviária sejam amplamente aplicados, nenhum conjunto de medidas é totalmente eficaz. E isso ocorre devido a grande diversidade genética de isolados APEC. Muitas tentativas foram feitas para desenvolver uma vacina eficaz contra a APEC. Esforços iniciais focaram no uso de bacterinas,

enquanto investigações posteriores buscaram o desenvolvimento de vacinas vivas e de subunidades, com vários relatos de sucesso em condições de laboratório (DHO-MOULIN; FAIRBROTHER, 1999), bem como relatos de ineficácia (PEIGHAMBARI *et al.*, 2002).

Para desenvolver uma vacina “ideal” contra APEC, vários desafios precisam ser superados. Primeiro, a vacina tem que ser capaz de induzir proteção cruzada contra vários sorogrupos APEC. Segundo, a vacina deve possibilitar a sua administração através de um método de imunização em massa, como na água de beber ou ração, *in ovo* ou spray, a fim de potencializar a imunização de milhares de aves alojadas no mesmo galpão. Finalmente, a vacina deve ser administrada a aves em idade jovem, para que possam desenvolver uma resposta imune protetora o mais cedo possível (DHO-MOULIN; FAIRBROTHER, 1999).

Vacinas contendo cepas virulentas mortas ou atenuadas protegem em muitos casos contra a infecção por estirpes homólogas, mas são menos ou pouco eficientes contra cepas heterólogas (SADEYEN *et al.*, 2015). Vacinas vivas e inativadas têm sido utilizadas em algumas regiões do Brasil para minimizar o impacto da salpingite em matrizes pesadas e leves e reduzir a mortalidade inicial em frangos de corte (PEREIRA; KNOBL, 2009). Em estudos anteriores, a vacinação de aves com cepas mutantes atenuadas gerou somente proteção sorotipo-específica e cepa-específica (KWAGA *et al.*, 1994; PEIGHAMBARI *et al.*, 2002; KARIYAWASAM; WILKIE; GYLES, 2004), daí a necessidade de desenvolver vacinas de proteção cruzada. Uma medida adotada por algumas empresas é o uso de bacterinas autógenas, que aparentemente apresentam melhores resultados de proteção (LANDMAN *et al.*, 2014).

O tratamento da colibacilose é estritamente dependente do uso de antibióticos, embora o aumento da ocorrência de isolados de *E. coli* multirresistentes tenha cada vez mais limitado o sucesso da terapia. E mesmo que o tratamento surta efeito, o desempenho produtivo das aves tende a ficar comprometido. De acordo com Pereira e Knobl (2009), os medicamentos mais frequentemente empregados são quinolonas (enrofloxacina e ciprofloxacina) e penicilinas (fosfomicina). São mais comumente administrados por via oral (água ou ração).

3.2 Caracterização do patotipo APEC

A biotipagem e a sorotipagem (métodos fenotípicos) eram provas frequentemente realizadas em conjunto, em décadas passadas, para classificar isolados de *E. coli* recuperados de casos de colibacilose. Na maioria dos centros de diagnóstico e pesquisa avícola, buscava-se a prevalência dos principais sorogrupos de *E. coli* isolados de aves doentes, na tentativa de

encontrar cepas representativas que possibilitassem a investigação de mecanismos de virulência da APEC e, assim, o desenvolvimento e a avaliação de vacinas candidatas.

Com o passar do tempo, vários estudos mostraram que cepas isoladas de aves aparentemente saudáveis compartilhavam semelhanças fenotípicas com cepas APEC (BLANCO *et al.*, 1998). Fortes (2008) verificou o perfil bioquímico de amostras de *Escherichia coli* isoladas de materiais avícolas no Estado do Rio Grande do Sul e o seu grau de associação com o índice de patogenicidade observado a partir da inoculação de pintos de um dia de idade. Foram analisadas 261 cepas de *E. coli*, tendo como origem: cama aviária, lesões de celulite e quadros respiratórios. Os resultados revelaram algumas diferenças na metabolização de determinados substratos por parte de algumas cepas de *E. coli*, no entanto, essa variabilidade não teve qualquer associação com o grau de patogenicidade *in vivo* dos isolados, impossibilitando a definição da patogenicidade da *E. coli* por meio de seu perfil bioquímico individual. À luz desses resultados e de outros estudos, surgiu a necessidade de se buscar outras ferramentas para classificação de isolados APEC, pois não havia uma correlação significativa entre os testes fenotípicos e a patogenicidade das cepas. Surgia, portanto, o entendimento da diversidade de cepas de *E. coli*, até mesmo dentro de um único sorotipo de APEC. De acordo com Landman *et al.* (2014), a palavra que melhor define o grupo APEC é diversidade, pois reflete o grande número de sorotipos de *E. coli* associados à colibacilose aviária.

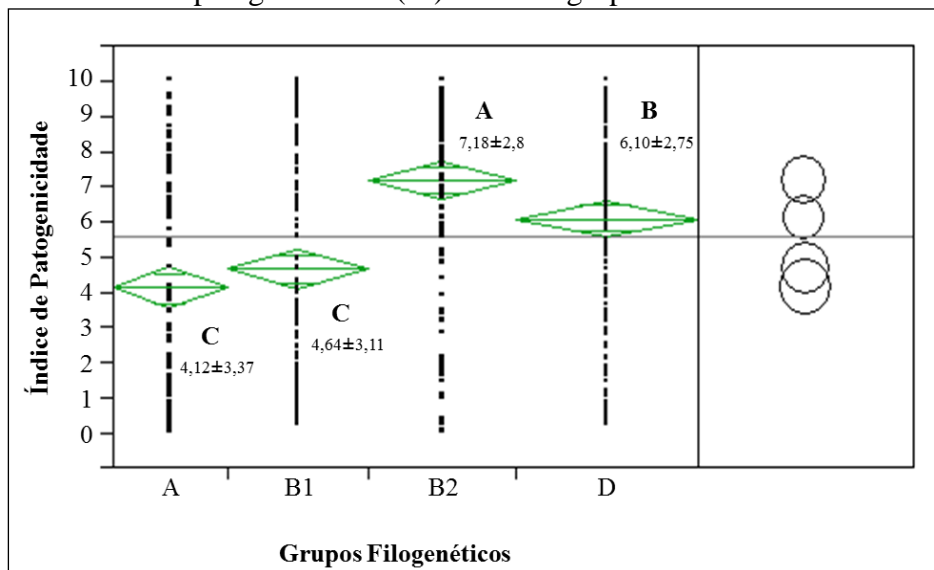
Esforços para entender a base genética da virulência APEC foram facilitados por estudos genômicos comparativos envolvendo cepas de aves doentes com suas contrapartes de aves aparentemente saudáveis, ou cepas adaptadas ao laboratório, e também por meio de técnicas de tipagem molecular. Independente da técnica aplicada, a partir dos estudos moleculares se observou o surgimento de uma variedade de potenciais fatores de virulência. Os achados revelaram um alto grau de diversidade genética entre sorogrupos APEC (MOKADY, GOPHNA; RON, 2005), bem como dentro de um mesmo sorogrupo (WHITE *et al.*, 1993).

Com a descoberta dos fatores de virulência e com a evolução dos testes moleculares, deu-se início a uma série de pesquisas com o objetivo de se encontrar padrões genéticos (genotipagem) de isolados de *E. coli* patogênicos que os diferenciassem de cepas comensais. O trabalho desenvolvido por Tejkowski (2013) retrata bem essa tentativa. Nele o pesquisador buscou correlacionar a presença de 38 genes de virulência de *E. coli* com a patogenicidade das cepas observada em pintos de um dia de idade. Os genes pesquisados são descritos na literatura como responsáveis por promover a adesão, aquisição de ferro, resistência sérica, produção de toxinas, transporte sérico e genes de ilhas de patogenicidade da bactéria. Ao final do estudo, Tejkowski (2013) verificou não haver uma boa correlação entre o grau de patogenicidade das

cepas e a presença de um conjunto definido de genes de virulência. Em resumo, não é somente a partir da presença ou a ausência de um ou mais genes de virulência que se consegue definir a patogenicidade da APEC. De acordo com Delicato *et al.* (2003), diferentes associações de genes de virulência podem refletir a existência de subpatotipos, ou diferentes patotipos, dentro do grupo APEC. Isso leva a hipótese que diferentes mecanismos de virulência podem ser empregados de maneira distinta pelos diferentes subpatotipos.

Rocha *et al.* (2017) buscaram agrupar 460 cepas de *E. coli* aviárias com patogenicidade conhecida em quatro grupos filogenéticos. Os dados evidenciaram ser possível classificar cepas de patogenicidade semelhante em um mesmo grupo, entretanto muitas acabam sendo classificadas em grupo contrário (Figura 1). Isso revela a principal limitação do uso do método genético como ferramenta de diferenciação de isolados de *E. coli* (patogênicos e comensais).

Figura 1 – Associação observada entre a patogenicidade *in vivo* (escala de 0 a 10), determinada em pintos de um dia de idade, de 460 cepas APEC e os quatro grupos filogenéticos (A, B1, B2, D) pesquisados. Os dados expressam a distribuição das cepas e a média dos índices de patogenicidade (IP) em cada grupo.



Fonte: Rocha *et al.* (2017).

Letras diferentes representam diferença significativa ($P < 0,05$).

Outras provas moleculares, como eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), polimorfismo por RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), alguns tipos de Reação em Cadeia da Polimerase (como por exemplo, PCR de Consenso Intergênico Repetitivo Enterobacteriano, ERIC-PCR, utilizado por Moura, Irino e Vidotto (2001)), ribotipagem, captura seletiva de sequências transcritas (SCOTS) (DOZOIS; DAIGLE; CURTISS, 2003), mutagênese marcada por assinatura (STM) (Li *et al.*, 2005), hibridização subtrativa de

supressão (SSH) (SCHOUER, C. *et al.*, 2004) e análise de transcriptoma usando microarrays (Li *et al.*, 2011) há algum tempo têm sido propostas como alternativa para caracterizar isolados APEC, mas nenhuma revelou um genótipo específico que definisse a patogenicidade APEC.

Embora algumas dessas técnicas moleculares tenham contribuído, em termos gerais, para uma melhor compreensão da patogênese da APEC, o conhecimento sobre os determinantes específicos de virulência, e os genes que os controlam, e seu envolvimento no quadro clínico da doença permanece ainda limitado.

O reducionismo tem sido usado por muitos anos como uma ferramenta crítica e poderosa para a identificação de genes-chave responsáveis pela patogênese bacteriana. No entanto, as limitações dessa abordagem no entendimento da patogenicidade das APEC incluem a natureza multifatorial da virulência e a complexa regulação cruzada da expressão gênica. Essas circunstâncias remetem à reflexão sobre os outros fatores preponderantes para a ocorrência da doença, que não só os do agente, que são aqueles associados ao ambiente e ao hospedeiro. Collingwood *et al.* (2014) sugerem considerar a colibacilose aviária como uma doença causada por um arranjo de cepas APEC com genótipos variáveis, que são tão dependentes da suscetibilidade do hospedeiro quanto qualquer fator de virulência possuído pelo patógeno.

A inconsistência dos dados gerados nos estudos fenotípicos e moleculares acabou que por revelar a importância e a dependência de modelos de infecção *in vivo* para alcançar um melhor entendimento da patogenicidade de isolados APEC. Modelos *in vivo* possibilitam reproduzir experimentalmente a doença, mesmo que de forma parcial e em ambiente controlado (laboratórios ou unidades experimentais), com a expressão dos fatores de virulência das estirpes APEC associados ao processo de infecção. De acordo com Mellata *et al.* (2010), a interação hospedeiro-patógeno pode ter um papel significativo na patogênese da bactéria.

3.3 Modelos animais para estudo da patogenicidade de APEC

Dentre as aves, a galinha é a espécie mais afetada pela colibacilose. E isso em grande parte se deve pela atual forma de criação intensiva adotada na avicultura industrial. Sendo o hospedeiro natural da APEC, é lógico apontar a galinha como a espécie animal de escolha nos modelos de infecção *in vivo* quando se deseja investigar a patogênese de isolados APEC.

A literatura sobre a determinação da patogenicidade é extensa e tem sido eloquentemente descrita por diversos pesquisadores. Vários modelos experimentais foram estabelecidos para avaliar a patogenicidade da *E. coli*. Antão e colaboradores (2008) no trabalho intitulado “A galinha como um modelo para infecções extraintestinais causadas pela

Escherichia coli patogênica aviária (APEC)” resumem mais de 20 diferentes modelos de infecção já experimentados. Elegeram o modelo com galinhas leghorn brancas SPF (*Specific Pathogen Free*), de cinco semanas de idade, infectadas por via intratraqueal, como sendo o melhor para o estudo da patogenicidade de isolados ExPEC. O sistema de leitura inclui uma pontuação clínica, alterações patomorfológicas e determinação da carga bacteriana.

Muitos estudos iniciais focaram unicamente na letalidade de um isolado APEC administrado a embriões ou pintos de um dia (FANTINATTI; SILVEIRA; CASTRO, 1994; DHO; LAFONT, 1984; HARRY; HEMSLEY, 1965), e não obtiveram sucesso na reprodução da doença. Estudos mais recentes, como o de SOUZA *et al.* (2016), têm proposto avaliar também a capacidade dos isolados de colonizarem, de causarem lesões e de persistirem no hospedeiro, pré-requisitos essenciais para o estabelecimento da infecção. Dentro dessa linha de estudos, uma abordagem interessante tem sido avaliar a contribuição individual dos fatores de virulência para o desenvolvimento da colibacilose, inoculando cepas de APEC contendo mutações de genes específicos (estratégias de mutagênese). Assim, comparam-se os resultados dos ensaios de patogenicidade entre estirpes do tipo “selvagem” e estirpes mutantes, em que um gene ou função foi artificialmente alterada (PILATTI *et al.*, 2016; WU *et al.*, 2017). Os resultados das pesquisas nessa linha de trabalho são parcialmente esclarecedores no que se refere à importância relativa de cada gene no desenvolvimento do processo infeccioso, porém também requerem modelos de infecção *in vivo* nas avaliações. Existem muitas apresentações da doença colibacilose causada por cepas APEC, possivelmente devido à expressão de múltiplas combinações de determinantes de virulência.

De acordo com Antão *et al.* (2008) todos os estudos com APEC mencionam diferentes ensaios de virulência ou testes de patogenicidade *in vivo* usando um modelo de infecção com galinhas em algum momento ou outro, pois servem para quantificar e qualificar a virulência de uma determinada estirpe de APEC, o que é impossível de se alcançar por meio de qualquer outra prova ou teste fenotípico ou molecular conhecido até o momento.

Embora os modelos com aves sejam essenciais para melhorar nossa compreensão em relação à patogênese da APEC, eles geralmente consomem muito tempo e exigem uma configuração experimental dispendiosa. Além disso, o número de animais utilizados deve ser reduzido ao mínimo para cumprir às normas estabelecidas pelos conselhos de ética. A fim de transpor essas limitações, modelos alternativos *in vivo* de infecção, como o uso de insetos, têm sido considerados e testados ao longo das duas últimas décadas, principalmente em pesquisas relacionadas à medicina humana. Dentro deste contexto, as larvas de *G. mellonella*, traça maior da cera, têm ganhado cada vez mais notoriedade.

3.3.1 Insetos como hospedeiros em modelos de infecção: o caso da traça *Galleria mellonella*

Os primeiros trabalhos utilizando larvas de *G. mellonella*, como modelo de infecção bacteriana, foram publicados ainda no final da década de 1950 e início da década de 1960. Artigos científicos publicados nesse período avaliaram a possibilidade de imunização das larvas de *G. mellonella* contra a bactéria gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa* (CHADWICK & VILK, 1969; STEPHENS, 1959; STEPHENS, 1963).

As larvas de *G. mellonella* - traça maior da cera, têm sido usadas como modelos de infecção para o estudo de diversos patógenos importantes para a saúde humana e para verificar a eficácia de terapias antibacterianas e antifúngicas (CHAMPION, WAGLEY; TITBALL, 2016; TSAY; LOH; PROFT, 2016). O uso nas pesquisas tem se justificado pela correspondência (correlação positiva) da virulência dos patógenos entre a determinada no modelo com *Galleria* e aquela encontrada em modelos com mamíferos (BROWNE; HEELAN; KAVANAGH, 2013; CHAMPION; WAGLEY; TITBALL, 2016; JUNQUEIRA, 2012; LIONAKIS, 2011; MIKULAK *et al.*, 2018; RAMARÃO, NIELSEN-LEROUX, LERECLUS, 2012; SALZET, 2001; TSAY; LOH; PROFT, 2016). Em comparação com outros hospedeiros não vertebrados, como, por exemplo, nematódeos, os insetos têm um sistema relativamente avançado de defesas antimicrobianas e, portanto, são mais propensos a produzir informações relevantes em processos de infecção reproduzidos experimentalmente (RAMARÃO; NIELSEN-LEROUX; LERECLUS, 2012).

Na natureza o inseto *G. mellonella* habita colmeias. Suas larvas se alimentam de cera, mel e pólen de abelha. Em alta infestação causam um fenômeno chamado galeriose, danos à criação de abelhas pela destruição dos favos de cria e poluição das colmeias com suas fezes, que servem de substrato para o desenvolvimento fúngico. Alteram o equilíbrio térmico na colmeia, afetando negativamente o desenvolvimento das colônias de abelhas. Assim, são insetos tratados como pragas apícolas (MIKULAK *et al.*, 2018; WOJDA *et al.*, 2020).

G. mellonella é um inseto holometábolo típico, ou seja, passa por quatro fases de desenvolvimento em seu ciclo de vida, a saber: ovo, larva, pupa e adulto (Figura 2). Cada traça fêmea é capaz de depositar, ao longo de sua vida, até 1500 ovos. O ciclo de desenvolvimento de *G. mellonella* está intimamente relacionado com a temperatura ambiente, sendo que em condições ideais esse tempo é de, aproximadamente, 6-7 semanas, enquanto que em condições menos favoráveis pode perdurar por até seis meses (ELLIS; GRAHAM; MORTENSEN, 2013).

Para criá-las, é necessário colocar as mariposas adultas em um recipiente com tampa e papéis para deposição dos ovos. As fêmeas depositam os ovos em grupos de 50 a 150 após alguns dias do acasalamento. Os ovos são de cor branca a rosa claro e levam entre 5 e 8 dias (24-27°C) para se desenvolverem até se tornarem larvas (ELLIS; GRAHAM; MORTENSEN, 2013). Ao eclodirem, as larvas podem ser alimentadas com pólen e cera de abelha, ou uma dieta artificial, que pode ser composta por mel líquido, glicerina, açúcar mascavo e uma mistura de farinhas, como farinha de trigo, milho, soja, gérmen de trigo, levedo de cerveja e leite em pó desnatado, em diferentes proporções (JORJÃO *et al.*, 2018b; RAMARÃO; NIELSEN-LEROUX; LERECLUS, 2012).

As larvas são branco-creme e medem de 1 a 23mm. Esta fase larval compreende um período de 6–7 semanas a 28–32°C. Durante esse período, as larvas passam por 8 a 10 estágios de muda e tecem fios de seda em todos os estágios, mas apenas o último ínstar gera um casulo (ELLIS; GRAHAM; MORTENSEN, 2013). As larvas alimentam-se e crescem até atingirem o último estágio, no qual ainda apresentam alguma motilidade e param de se alimentar para construir o casulo de seda e passar à fase de pupa (marrom-avermelhadas escuras). De pupa à mariposa (inseto adulto) leva de 1 a 8 semanas, e o inseto não come durante todo esse tempo (RAMARÃO; NIELSEN-LEROUX; LERECLUS, 2012).

Os machos adultos medem de 10 a 15mm e possuem cor bege e marcas escuras, enquanto as fêmeas adultas medem em torno de 20mm e são mais escuras que os machos, possuindo cor levemente marrom ou cinza (ELLIS; GRAHAM; MORTENSEN, 2013). As mariposas fêmeas apresentam probóscide bifurcada e palpos labiais projetados para frente (aparência de bico, pontiagudo), enquanto que nos machos os palpos labiais são arredondados (Figura 3) (KWADHA *et al.*, 2017).

Em modelos de infecção, o invertebrado *G. mellonella* é utilizado no último estágio larval, quando param de se alimentar e pesam entre 200 e 350mg (JORJÃO *et al.*, 2018b; SALAMITOU *et al.*, 2000; MICHAUX *et al.*, 2012). Como o inseto requer alojamento simples para manutenção em laboratório, possibilita criações em grande escala (MIKULAK *et al.*, 2018).

Figura 2 – Estágios de desenvolvimento do inseto *Galleria mellonella*.



Legenda: ovos (1), larva (2 a 6), pré-pupa (7), pupa (8) e adulto (9).
Fonte: Jorjão *et al.* (2018b).

Figura 3 – Características macroscópicas de machos e fêmeas do inseto *Galleria mellonella*.



Legenda: macho (A) e fêmea (B).
Fonte: Jorjão *et al.* (2018b).

Larvas de *G. mellonella*, em contraste com muitos outros modelos animais alternativos (larvas de peixe-zebra, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*), podem crescer em uma ampla faixa de temperatura (18-37°C) (BROWNE; HEELAN; KAVANAGH, 2013; CYTRYNSKA; ZDYBICKA-BARABAS; JAKUBOWICZ, 2007). Importante destacar que 37°C é a temperatura corporal observada em mamíferos, e se aproxima daquela encontrada em aves (40-42°C). Isso é essencial, uma vez que os patógenos estão adaptados à temperatura fisiológica do hospedeiro, o que geralmente é necessário para a expressão de seus fatores de virulência (fatores temperatura-dependente) (TSAI; LOH; PROFT, 2016). A definição da temperatura utilizada em ensaios de inoculação é um fator importante a ser considerado, pois Peleg *et al.* (2009b) relataram que a morte de larvas de *G. mellonella* por *A. baumannii* (ATCC 17978) foi dependente da temperatura de incubação após a inoculação, em que a taxa de morte foi mais lenta a 30°C que a 37°C. Os autores sugerem que *A. baumannii* tem características de virulência sensíveis à temperatura ou que as lagartas de *G. mellonella* são menos suscetíveis à infecção em temperatura mais baixa. Resultados semelhantes foram relatados por Jonsson *et al.*

(2016). Os autores investigaram se as temperaturas de incubação das larvas alteravam a taxa de morte induzida cepa EAEC (*Escherichia coli* Enteroagregativa) 042, sabidamente patogênica para *G. mellonella*. As temperaturas testadas foram de 22°C e 37°C e as mortes foram contabilizadas até o final do 4º dia pós-inoculação das larvas (dose de 10⁴ UFC/larva). A partir dos experimentos, os pesquisadores concluíram que a redução da temperatura de incubação atenuou a morte das larvas, pois, no dia um 40% das larvas ainda estavam vivas à temperatura ambiente, enquanto que a 37°C todas as larvas já estavam mortas ($P < 0,05$). Jonsson *et al.* (2016) sugeriram que o isolado 042 possuía características de virulência sensíveis à temperatura, especulando ainda que isso estivesse relacionado a uma expressão mais baixa do regulador chave dos fatores de virulência de EAEC, AggR, que demonstrou ser expresso de forma ideal em 37°C (MORIN *et al.*, 2010). O efeito da temperatura de incubação das larvas sobre a taxa de morte das larvas de *G. mellonella* também foi observado em pesquisas com *Cryptococcus neoformans* (MYLONAKIS *et al.*, 2005).

O modelo de infecção por *G. mellonella* é passível de tratamento com antibióticos e, assim, a eficácia de agentes antimicrobianos pode ser avaliada (PELEG *et al.*, 2009b). Williamson *et al.* (2014) determinaram o efeito da administração do agente antimicrobiano ciprofloxacino sobre a taxa de sobrevivência de larvas de *G. mellonella* infectadas com isolados clínicos de ExPEC, previamente caracterizados como suscetíveis ou resistentes ao ciprofloxacino *in vitro*. Descobriram que, entre as larvas inoculadas com isolados suscetíveis ao ciprofloxacino, o grupo tratado com o antibiótico melhorou significativamente a sobrevivência em 4 dias em comparação com o grupo não tratado (90% vs. 35%; $P < 0,001$). Em contraste, quando as larvas foram inoculadas com um isolado resistente à molécula, o ciprofloxacino não melhorou a sobrevivência larval, não havendo diferença significativa entre os grupos tratado e não tratado ($P = 0,97$).

Outra vantagem do modelo é o grande tamanho das larvas em comparação com outros insetos (por exemplo, *D. melanogaster*). As larvas de *G. mellonella* atingem de 12 a 25mm de comprimento, o que facilita a manipulação em procedimentos de inoculação (RAMARÃO; NIELSEN-LEROUX; LERECLUS, 2012). Seu tamanho também permite a coleta de um grande volume de amostras, tais como: hemolinfa, corpo de gordura e outros tecidos internos (MIKULAK *et al.*, 2018).

A cavidade do corpo da larva, ou hemocele, contém hemolinfa, que desempenha uma função análoga ao sangue em mamíferos, pois transporta nutrientes, produtos residuais e moléculas sinalizadoras, embora não desempenhe papel na respiração. As larvas podem ser infectadas com patógenos através de diferentes vias: oral, subcutânea e intra-hemocélica

(SALAMITOU *et al.*, 2000; MICHAUX *et al.*, 2012). A última é a técnica mais eficaz e mais comumente usada, pois injeta-se uma suspensão de células microbianas diretamente na hemocele (volumes de 10 a 20 μ L), através de uma das prolegs do último par, localizado na região posterior e ventral do abdômen da larva (TSAY; LOH; PROFT, 2016).

A *G. mellonella* apresenta respostas imunes celulares e humorais que guardam semelhanças consideráveis com as respostas inflamatórias do sistema imune inato dos mamíferos. A larva contém muitas proteínas efetoras e de reconhecimento imunológico que são funcionalmente comparáveis às encontradas em mamíferos (BERGIN *et al.*, 2003; KAVANAGH; REEVES, 2004; VILCINSKAS, 2011). Após o reconhecimento do patógeno, as defesas imunes de insetos e mamíferos dependem da fagocitose, produção de espécies reativas de oxigênio, expressão de peptídeos antimicrobianos e cascatas de coagulação para combater patógenos invasivos (BROWN *et al.*, 2009; KAVANAGH; REEVES, 2004; VILCINSKAS, 2011).

A primeira linha de defesa da *G. mellonella* é a cutícula, barreira física composta por quitina, que além do tegumento reveste órgãos internos de origem ectodérmica – traqueia, intestino anterior e posterior (KAVANAGH; REEVES, 2004; WOJDA *et al.*, 2020). Quando essas barreiras são quebradas, os mecanismos de defesa são ativados. O inseto não possui uma resposta imune adaptativa, mas possui um sistema imunológico inato baseado em fatores de reconhecimento, que os protegem de forma efetiva e rápida quando ocorre uma infecção. Este sistema inclui componentes celulares e humorais que são ativados no momento da invasão de patógenos ou moléculas estranhas ao organismo (HOFFMANN; 1995). Após a ativação, o corpo gordo, os hemócitos e a epiderme contribuem para a síntese rápida e transitoriamente aprimorada de peptídeos e proteínas antimicrobianos que são secretados na hemolinfa (KAVANAGH; REEVES, 2004; WOJDA *et al.*, 2020).

O sistema imune mediado por células (resposta celular) está associado a diversos hemócitos (células similares aos fagócitos presentes nos mamíferos) que reconhecem as ameaças e respondem de três maneiras distintas: fagocitose, formação de nódulos (nodulação ou coagulação) e encapsulação celular (SHAURUB, 2012). Existem pelo menos oito tipos de hemócitos encontrados em *G. mellonella*: pró-hemócitos, plasmatócitos, granulócitos (células granulares), coagulócitos, células de cristal, esferulócitos, oenocitóides e trombocitóides (PANDEY; TIWARI, 2012). Os hemócitos são encontrados circulando livremente na hemolinfa ou aderidos a órgãos internos, como o corpo gordo ou o trato digestivo do inseto (KAVANAGH; REEVES, 2004). A densidade dos hemócitos na hemolinfa varia durante a vida

do inseto e também em resposta à introdução de patógenos (BERGIN; BRENNAN; KAVANAGH, 2003).

Os pró-hemócitos são pequenas células circulares com núcleo grande e citoplasma basofílico que podem se diferenciar em vários tipos de células. Os plasmócitos são os hemócitos mais comuns, têm formato de folha e seu citoplasma contém enzimas lisossômicas. São geralmente maiores que os granulócitos e estão envolvidos na formação das cápsulas (LAVINE; STRAND, 2002). Os granulócitos têm um núcleo pequeno e muitos grânulos no citoplasma. Os plasmócitos e os granulócitos estão envolvidos na maioria das defesas celulares. Os esferulócitos exibem uma variedade de formas diferentes, com numerosas pequenas inclusões esféricas. Os oenocitóides são células grandes, bi-nucleadas e não-fosfocíticas. Os coagulócitos participam do processo de coagulação. Os hemócitos podem reconhecer material estranho e também distinguir o próprio do não-próprio durante a resposta imune celular (ÍZZETOĞLU, 2012; LAVINE; STRAND, 2002).

A fagocitose mediada pelos plasmatócitos, células fagocíticas nos insetos, assim como os neutrófilos de mamíferos, depende do reconhecimento do alvo como estranho, que ativa a sinalização a jusante e respostas efetoras (KAVANAGH; REEVES, 2004). Alguns patógenos são reconhecidos por moléculas de reconhecimento de padrões humorais que se ligam a um alvo que aumenta seu reconhecimento por outros receptores na superfície dos hemócitos. Alternativamente, os patógenos podem ser reconhecidos diretamente pelos receptores de superfície de hemócitos, por exemplo, calrecticulina ou apolipoproteína-III (apoL-III). Uma vez reconhecidos os ligantes, ocorre uma cascata intracelular, resultando na internalização do patógeno na célula. O processo fagocítico geralmente não é destrutivo para os hemócitos, diferentemente da melanização, coagulação e encapsulamento, que são eventos terminais na vida útil do hemócito (OLIVER *et al.*, 2011). Com o patógeno internalizado, lectinas e lisozima atuam simultaneamente. Enquanto as lectinas se ligam aos açúcares na superfície celular bacteriana, a lisozima quebra a camada de peptidoglicano. A fagocitose é o principal mecanismo de defesa proporcionado pelos hemócitos contra pequenos invasores, como as bactérias (KAVANAGH; REEVES, 2004).

A nodulação ocorre quando vários hemócitos se ligam a grupos de bactérias. Essa reação de defesa celular à infecção permite que um grande número de bactérias seja eliminado da hemolinfa. Os hemócitos começam a se unir, causando a formação de uma bainha sobreposta em torno do patógeno (LAVINE; STRAND, 2002). A nodulação é concluída com a ativação da via pro-fenoloxidase (Pro-PO), esta regulada por moléculas de sinalização denominadas eicosanóides, e a melanização dos nódulos maduros. A melanina depositada restringe a

disseminação do patógeno e reduz a viabilidade celular microbiana. Com os nódulos formados, inicia-se a atividade fagocitária dos hemócitos para remover e destruir as bactérias sequestradas (RATCLIFFE; ROWLEY, 1979; GILLESPIE; KANOST; TRENCZEK, 1997). Os nódulos melanóticos (melanização – coagulação da hemolinfa) formam placas escuras que podem ser visualizadas através da cutícula da larva do inseto. A melanização geralmente acompanha o processo de coagulação da hemolinfa, tornando o coágulo mais duro, e previne o efluxo da hemolinfa até que a epiderme seja restaurada (LI *et al.*, 2002).

O encapsulamento celular, por sua vez, ocorre em resposta à entrada na hemolinfa de grandes estruturas, como protozoários, nematóides e ovos ou larvas de vespas parasitas (STRAND; PECH, 1995). O processo no inseto *G. mellonella* é liderado pelo reconhecimento de um corpo estranho por células granulares que, ao entrar em contato, sofrem degranulação e lisam o material, além de promover a adesão de plasmócitos (PECH; STRAND, 1996). A ligação de múltiplas camadas de plasmátócitos se forma ao redor do corpo estranho, resultando em uma cápsula lisa de células sobrepostas (SHAURUB, 2012; ZDYBICKA-BARABAS *et al.*, 2014; KANGASSALO *et al.*, 2018).

As defesas humorais (resposta humoral) são compostas pelas moléculas efetoras solúveis na hemolinfa (Quadro 1), como os peptídeos antimicrobianos, proteínas do tipo complemento, opsoninas, melanina (como já citado), produtos criados por cascatas proteolíticas, além de uma variedade de outras moléculas de defesa, como lectinas (hemaglutininas) e lisozima (BROWNE; HEELAN; KAVANAGH, 2013; TSAY; LOH; PROFT, 2016). Esses componentes humorais estão envolvidos no reconhecimento de patógenos, como descrito acima, ou são diretamente responsáveis pela resposta imune (imobilização e morte). *G. mellonella* produz várias proteínas que servem como opsoninas que reconhecem e se ligam a componentes microbianos conservados semelhantes aos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs - *Pattern Recognition Receptor*) em mamíferos. A opsonina ApoL-III, por exemplo, desempenha diversos papéis como: estimular o aumento da atividade antibacteriana da hemolinfa, aumentar a produção de superóxido pelos hemócitos, aumentar a atividade do peptídeo antimicrobiano cecropina, reconhecer padrões moleculares, como lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) e ácido lipoteicóico (LTA), e de agir sinergicamente com a lisozima da *G. mellonella* aumentando a atividade permeabilizante desta contra bactérias Gram negativas (ZDYBICKA-BARABAS *et al.*, 2013; BROWN *et al.*, 2009). Peptídeos antimicrobianos (AMPs), ou peptídeos de defesa do hospedeiro, são encontrados em todas as fases do ciclo de vida e desempenham um papel importante na imunidade inata, apresentando atividade microbicida de amplo espectro (TSAY; LOH; PROFT, 2016). Uma análise do

repertório de AMP da hemolinfa de *G. mellonella* identificou 18 AMPs conhecidos ou putativos (BROWN *et al.*, 2009). Cecropinas e moricinas pertencem à família de AMPs α -helicoidais anfipáticos, que penetram paredes celulares e formam poros na membrana citoplasmática resultando em vazamento de íons. As defensinas são peptídeos catiônicos ricos em cisteína que atuam formando canais iônicos dependentes de voltagem na membrana citoplasmática resultando em vazamento de íons e, por fim, lise celular. Cecropinas, moricinas e defensinas atuam contra bactérias Gram positivas e negativas (HOFFMANN *et al.*, 1995; TSAY; LOH; PROFT, 2016). Os peptídeos ricos em prolina são pequenos peptídeos entre 2-4 KDa e parecem aumentar a permeabilidade da membrana das bactérias. A gloverina pertence à família de AMPs ricos em glicina que se liga ao LPS em bactérias Gram negativas e inibe a síntese de proteínas vitais da membrana externa, resultando em uma membrana externa permeável (KAWAOKA *et al.*, 2008). Os AMPs de insetos são produzidos principalmente no corpo gorduroso, hemócitos, trato digestivo, glândulas salivares e trato reprodutivo (MAK; CHMIEL; GACEK, 2001).

Quadro 1 - Alguns dos componentes das respostas imunes celular e humoral do inseto *G. mellonella*.

Tipo de resposta	Componentes celulares e humorais	
Celular	Hemócitos	Prohemócitos Plasmatócitos Células granulares Coagulócitos Esferulócitos Oenocitóides
Humoral	Oponinas	Apolipoforina-III (apoL-III) Proteínas de reconhecimento de peptidoglicano (PGRPs) Proteína catiônica 8 (GmCP8) Hemolina
	Peptídeos antimicrobianos (AMPs)	Lisozima Cecropina Peptídeos do tipo moricina Gloverina Galiomicina Galerimicina Galleria defensina Peptídeos ricos em prolina (Gm) 1 e 2 Peptídeos aniônicos (Gm) 1 e 2 Inibidor induzível de serino-protease 2 Peptídeo semelhante à heliocina x-tox Apolipoforicina (Gm)
	Melanização	Via da fenoloxidase (PO)

Fonte: TSAI; LOH; PROFT (2016).

A resposta de melanização, como previamente descrito, é um processo de síntese e deposição de melanina para encapsular patógenos no local da lesão, seguido pela coagulação e opsonização. É análoga à formação de abscesso em infecções de mamíferos (TANG, 2009; TSAY; LOH; PROFT, 2016). A formação de melanina é catalisada pela enzima PO, que é produzida pelos hemócitos como o zimogênio pró-fenoloxidase (ProPO) (SODERHALL; CERENIUS, 1998). A melanização é iniciada após o engajamento de PRRs solúveis com superfícies-alvo. O PO ativado converte monofenóis e fenóis em quininas, que polimerizam não enzimaticamente para formar melanina ao redor de patógenos invasores e pontos de lesão. A enzima PO também pode produzir espécies reativas de oxigênio que danificam as células (SODERHALL; CERENIUS, 1998; TSAY; LOH; PROFT, 2016).

Os insetos não possuem linfócitos, responsáveis pela imunidade adquirida em vertebrados, e, por isso, são tradicionalmente considerados desprovidos de memória imunológica. Essa visão tem sido contestada recentemente, pois estudos documentaram que uma exposição prévia do inseto a determinados antígenos (por exemplo, fungos, bactérias, vírus, protozoários e componentes da parede celular de patógenos) aumentou sua resistência a um desafio posterior, sendo o fenômeno denominado por alguns pesquisadores de primoinunização (GALVEZ; CHAPUISAT, 2014; FALLON; TROY; KAVANAGH, 2011; CONTRERAS-GARDUNO *et al.*, 2016; GILBERT; KARP; UETZ, 2016).

No modelo de infecção com *G. mellonella* experimentalmente pode-se avaliar alguns parâmetros de resposta, como taxa de sobrevivência, que pode ser avaliada por 1 a 10 dias após a infecção, cálculo de uma dose letal (DL_{50}), grau de melanização da hemolinfa, expressão e densidade de hemócitos e de proteínas antimicrobianas circulantes, alteração na capacidade de fagocitose dos hemócitos, produção de lactato desidrogenase - como marcador de dano celular, entre outras variáveis (CHAMPION; WAGLEY; TITBALL, 2016; TSAY; LOH; PROFT, 2016).

Loh *et al.* (2013) propuseram um método alternativo visual para avaliar a condição de saúde das larvas desafiadas, baseado nos parâmetros: atividade (nota de 0 a 3), extensão da produção de seda (formação de casulo, 0 a 1), intensidade de melanização da larva (0 a 4) e sobrevivência (0 a 2). Uma larva saudável, não infectada, contabiliza uma pontuação elevada, entre nove e dez, enquanto uma larva com infecção severa (doente) recebe um valor próximo a zero como pontuação. A média aritmética das notas das larvas pertencentes a um mesmo grupo de inoculação define o índice geral de saúde larval (0 a 10), servindo como parâmetro de avaliação da patogenicidade de amostras bacterianas.

A popularidade do modelo biológico de infecção com larvas *G. mellonella* é ilustrada pelo volume crescente de trabalhos científicos publicados. Comumente, o modelo tem sido empregado com sucesso em vários estudos de virulência de fungos, incluindo *C. neoformans* (GARCÍA-RODAS *et al.*, 2011; GARCIA-SOLACHE *et al.*, 2013; MYLONAKIS *et al.*, 2005), *C. gattii* (FIRACATIVE, C.; DUAN, S.; MEYER, 2014), leveduras *Candida albicans* (BRENNAN *et al.*, 2002; DUNPHY *et al.*, 2003) e *Candida krusei* (SCORZONI *et al.*, 2013) e o fungo filamentosos *Aspergillus fumigatus*. Além disso, o modelo de *G. mellonella* já foi aplicado com sucesso para avaliar a virulência de uma grande variedade de bactérias Gram positivas e Gram negativas, destacando-se: *Klebsiella pneumoniae* (WAND *et al.*, 2013), *Campylobacter jejuni* (ASKOURA; STINTZI, 2017; SENIOR *et al.*, 2011), *Listeria monocytogenes* (JOYCE; GAHAN, 2010; MUKHERJEE *et al.*, 2010), *Staphylococcus aureus* (JORJÃO *et al.*, 2018a), *Bacillus* spp. (RAMARÃO; NIELSEN-LEROUX; LERECLUS, 2012), *Pseudomonas aeruginosa* (JANDER; RAHME; AUSUBEL, 2000; MIYATA *et al.*, 2003), *Salmonella Typhimurium* (BENDER *et al.*, 2013; VIEGAS *et al.*, 2013), *Streptococcus pneumoniae* (EVANS; ROZEN, 2012) e *Enterococcus faecalis* (LA ROSA *et al.*, 2013). Independentemente das espécies bacterianas, os resultados obtidos com larvas de *G. mellonella*, infectadas por injeção direta através da cutícula, correlacionam-se consistentemente com estudos em mamíferos não-humanos: cepas bacterianas que são atenuadas em modelos de mamíferos demonstram menor virulência em *G. mellonella* e cepas que causam infecções humanas graves também são altamente virulentas no modelo em inseto (BRENNAN *et al.*, 2002; CADOT *et al.*, 2010; GAO *et al.*, 2010; JANDER; RAHME; AUSUBEL, 2000; OLSEN *et al.*, 2011; PELEG *et al.*, 2009a; REJASSE *et al.*, 2012; SALAMITOU *et al.*, 2000).

Certamente, também existem desvantagens nesse modelo. Nenhum protocolo padronizado tem sido estabelecido, o que é necessário para uma melhor comparação intra e interespecies, bem como para comparar dados entre ensaios individuais. Os procedimentos aplicados são bastante semelhantes, mas variam no volume de injeção, preparação do agente infeccioso, número de larvas por grupo de amostra ou condições de manutenção das larvas durante a propagação, armazenamento e incubação (alimentação e temperatura) (BINDER, MAURER; LASS-FLORL, 2016). O sistema imune ainda está em fase de caracterização pelos pesquisadores e faltam linhagens padronizadas da *G. mellonella* para serem adquiridas pela comunidade científica (TSAI; LOH; PROFT, 2016). Embora o genoma já tenha sido sequenciado por Lange *et al.* (2018), não há cepas mutantes disponíveis para estudar funcionalmente a resposta imune do hospedeiro (BINDER, MAURER; LASS-FLORL, 2016).

Além disso, não é possível estudar infecções crônicas (longo prazo) e existem determinados microrganismo que não apresentam virulência nas larvas.

3.3.1.1 Estudos sobre a patogenicidade de *E. coli* em *G. mellonella*

Alguns estudos já propuseram ou investigaram a virulência de isolados de *E. coli* no modelo com o inseto, entretanto, sempre com patotipos associados a doenças em humanos.

O primeiro estudo relatando o uso do modelo de infecção por *G. mellonella* para estudar *E. coli* patogênica foi publicado em 2012. Leuko e Raivio demonstraram que as larvas de *G. mellonella* podiam ser mortas por *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) de forma dose-dependente, com um valor de DL_{50} de $2,57 \times 10^3$ UFC às 48h pós-infecção. As suspensões bacterianas foram injetadas na hemocele, mas desapareceram logo em seguida e passaram a ser encontradas em cápsulas melanizadas. As infecções resultaram em um aumento nos AMPs gloverina e cecropina. O inseto apresentou diferentes respostas a infecções com cepas mutantes, concluindo que as mutações induzidas levavam à redução da virulência da bactéria.

Alghoribi *et al.* (2014) examinaram a patogenicidade de 71 isolados de *Escherichia coli* Uropatogênica (UPEC) em larvas de *G. mellonella*, correlacionando os resultados com a presença ou ausência de 29 genes associados à virulência da bactéria. Demonstraram que o modelo de infecção com o inseto é capaz de discriminar cepas de diferentes patogenicidades.

Ao explorar o papel de diferentes fatores de virulência na patogênese da *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC), Morgan, Ortiz e Riordan (2014) verificaram que a mutação por inativação de determinados genes levou a uma atenuação da virulência da bactéria no modelo com larvas de *G. melonella*. Neste trabalho os ensaios de inoculação com o invertebrado mostraram-se extremamente úteis na caracterização da patogenicidade das cepas EHEC artificialmente mutadas.

Williamson *et al.* (2014) procuraram estabelecer a viabilidade do uso das larvas de *G. mellonella* em estudos de virulência de cepas *E. coli* isoladas a partir do sangue de pacientes humanos acometidos. Dada a origem, esses isolados são caracterizados como pertencentes ao grupo ExPEC. No estudo os autores observaram haver correlação entre o número de genes de virulência das cepas testadas e a sobrevivência das larvas, de forma que os isolados ExPEC com maior escore de virulência (mais genes) mataram as larvas significativamente mais rápido que os isolados com menores escores de virulência. Ao final do trabalho relatam que ao ser possível correlacionar a virulência genotípica e fenotípica, o modelo com inseto tem validade para ser aplicado em futuros estudos que investiguem a virulência de isolados ExPEC.

Ciesielczuk *et al.* (2015) utilizaram o modelo de infecção com *G. mellonella* para investigar a patogenicidade de 40 cepas ExPEC, isoladas de humanos com os mais diversos quadros clínicos. Os pesquisadores correlacionaram as variáveis de resposta obtidas nos ensaios de virulência *in vivo* (taxa de mortalidade das larvas, melanização e dano celular – quantificação da lactato desidrogenase, LDH) com as origens e as características de cada cepa (presença, ausência e total/escore de genes de virulência, grupo filogenético, perfil/escore de resistência a antibióticos e sorogrupo). O modelo com o inseto permitiu investigar quais as características fenotípicas e moleculares das cepas que mais se associavam a virulência observada *in vivo*. Embora os escores de fatores de virulência e de resistência a antimicrobianos tenham diferido acentuadamente entre os isolados ExPEC, a análise de regressão linear não demonstrou relação entre eles e os parâmetros de mortalidade, produção de melanina e LDH em *G. mellonella*.

Na mesma linha dos trabalhos anteriores, Jonsson *et al.* (2016) concluíram que isolados EAEC foram capazes de sobreviver, infectar, replicar e matar larvas de *G. mellonella*, com dose e tempo dependente, e que o modelo foi capaz de distinguir claramente entre cepas virulentas do tipo selvagem de EAEC e *E. coli* não patogênicas. Os autores concluem ainda que, por ser barato e confiável, o modelo de infecção com *G. mellonella* possibilita a investigação de diferenças de virulência entre cepas, a identificação de possíveis marcadores da virulência e ainda potenciais novos alvos moleculares para terapia antimicrobiana e desenvolvimento de vacinas.

Chen e Keddie (2021) utilizaram o modelo de infecção com larvas de *G. mellonella* para melhor compreender a virulência e a patogenicidade atribuídas ao patótipo EPEC. Para isso, os pesquisadores monitoraram a mortalidade do inseto, tempo de sobrevivência, tempo de pupação, massa pupal, duração da pupa, fecundidade, taxa de eclosão de ovos (após injeção intra-hemocélica com doses seriadas) e comparou a DL_{50} entre determinados isolados EPEC, incluindo mutantes. Além disso, a virulência de EPEC em *G. mellonella* foi comparada com a com o entomopatógeno *Providencia rettgeri* e a bactéria benigna do solo - *Bacillus clausii*. As respostas imunes da *G. mellonella* à infecção por EPEC foram caracterizadas por exame da hemolinfa, analisando a dinâmica temporal de hemócitos circulantes, partículas melanizadas, nódulos e replicação/depuração de EPEC após as inoculações. Ao final dos experimentos, Chen e Keddie (2021) concluíram que a doença provoca na *G. mellonella* por EPEC foi dose-dependente e se manifestou como aumento da mortalidade, diminuição do tempo de sobrevivência, retardo da pupação, diminuição da massa pupal e aumento da duração da pupa.

Outros pesquisadores também utilizaram o modelo de infecção com larvas de *G. mellonella* com sucesso em avaliações do potencial terapêutico de bacteriófagos contra isolados

de *E. coli* e outros gêneros bacterianos, envolvidos em quadros de doença em humanos (ANTOINE *et al.*, 2021; MANOHAR; NACHIMUTHU; LOPES, 2018).

O potencial uso da *G. mellonella* como hospedeiro modelo reside não apenas em sua capacidade de melhorar a eficiência da pesquisa através da redução de custo e de tempo, invariavelmente associados ao uso de aves em modelos de infecção, mas também na capacidade de aumentar a escala e, portanto, o poder estatístico de experimentos.

Devido a diferenças intrínsecas entre espécies bacterianas, no que se refere a mecanismos de colonização, invasão e patogenicidade, e os diferentes hospedeiros que compõem os modelos animais, fez-se necessário verificar a viabilidade do uso da *G. mellonella* em estudos de patogenicidade de cepas APEC. Até o momento desta publicação nenhum estudo utilizando isolados APEC foi conduzido em modelo com larvas de *Galleria mellonella*, o que reforça o caráter inovador da pesquisa..

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local do Estudo

Todas as etapas deste estudo foram desenvolvidas no Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA), vinculado à Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

4.2 Cepas de APEC

As 40 cepas APEC utilizadas neste estudo foram isoladas e identificadas bioquimicamente a partir de galpões de criação de frangos de corte, pertencentes a três empresas avícolas do Rio Grande do Sul. As origens das amostras, de acordo com Souza *et al.* (2016), são: cama de aviário, lesões de celulite e quadros respiratórios (Apêndice A).

4.2.1 Reativação e confirmação da pureza das amostras bacterianas

Todas as cepas que compõe o grupo amostral encontravam-se preservadas a -80°C em meio de cultura BHI (*Brain-Heart Infusion Broth* – Oxoid; Cambridge, Reino Unido) com 20% de glicerol, junto à bacterioteca do CDPA. A reativação ocorreu através da inoculação de uma alíquota de 10µL do material em caldo BHI e cultivo *overnight* a 37°C. Posteriormente foi procedido o isolamento de colônias APEC em ágar EMB (*Eosine Metilene Blue*– Oxoid; Cambridge, Reino Unido), para confirmação da pureza das cepas. A partir das colônias isoladas em cada ágar, preparou-se uma nova alíquota de estoque, mantida congelada a -18 °C até o momento da utilização das cepas nos ensaios de inoculação.

4.3 Criação e seleção das larvas de *G. mellonella*

A metodologia de criação das larvas de *G. mellonella* seguiu o descrito por Jorjão (2018b), com modificações. Para iniciar o processo de criação, cartelas contendo ovos de *G. mellonella* foram colocadas em frascos plásticos, com tampa perfurada (permitindo a passagem de ar), sobre uma camada de dieta completa (aproximadamente 200g) disposta no fundo do recipiente. Ao eclodirem dos ovos, as larvas se alimentaram da ração para se desenvolver.

Evitou-se o escape das larvas pequenas colocando um pedaço de tecido voal branco entre a tampa e o corpo do frasco de plástico.

Composição da ração (1500g de mistura homogênea):

- 200g de farinha de trigo;
- 200g de farelo de trigo;
- 200g de gérmen de trigo;
- 130g de levedo de cerveja;
- 400g de leite em pó desnatado;
- 130mL de glicerina; e
- 240g de mel.

A dieta completa para as larvas foi composta pela mistura da ração pronta com *pellets* de cera de abelha na proporção de 2:1, quando fornecida para larvas pequenas (até um cm de comprimento), e na proporção 3:1 quando fornecida a larvas maiores. Sobras da dieta completa foram armazenadas a 4°C, por até uma semana. Os ingredientes que compuseram a ração e a cera permaneceram estocados à temperatura ambiente (23°C). A dieta fornecida às larvas era substituída pelo menos uma vez por semana.

Os frascos, com as larvas em criação, ficaram incubados em estufa a $28\pm 2^\circ\text{C}$ e 60% de umidade relativa por, aproximadamente, 20 dias, período necessário para que, nestas condições, a *G. mellonella* atingisse um tamanho que permitisse seu manuseio (aproximadamente um cm de comprimento). Nesse momento, as larvas maiores eram limpas, retirando-se as teias e os casulos formados, e transferidas para um novo recipiente (este com 25cm de comprimento, 12cm de largura e 7,5cm de altura, com perfurações nas tampas). Cada frasco recebeu aproximadamente 250 larvas, onde permaneceram até atingir o estágio final da fase larval, quando chegavam ao peso corporal de aproximadamente 250 a 350mg. Durante este período de desenvolvimento larval final foram realizadas duas limpezas semanais para retirada das teias e reposição de porções da ração completa. Concluída essa fase, as larvas atingiam o máximo de seu desenvolvimento corporal, paravam de se alimentar e iniciavam a fase de formação dos casulos, para evoluir ao estágio de pupa. Desejava-se obter larvas com o mínimo de manchas escuras na cutícula. Larvas com tamanho e coloração adequados (sem manchas escuras na cutícula) eram selecionadas para os ensaios de infecção e permaneciam armazenadas em ambiente escuro a 10-12°C por até cinco dias, antes do uso. Passado este período de armazenamento, as larvas eram descartadas, seguindo critério adotado por Leuko e Raivio (2012).

4.4 Cultivo e preparo das suspensões bacterianas (inóculos)

As suspensões de APEC foram preparadas a partir da alíquota de estoque (item 4.2.1), passando-se 10 μ L desta, por meio de alça bacteriológica estéril, para pelo menos três tubos contendo 10mL de caldo BHI (10 μ L/tudo de BHI). Após cultivo *overnight* a 37 °C, as células bacterianas foram coletadas por centrifugação a 10.000xg (força centrífuga relativa) durante 5 minutos. Procederam-se duas lavagens do *pellet* de células, seguidas por centrifugação, com 9 mL de solução salina estéril (NaCl a 0,85%), sempre desprezando o sobrenadante, para eliminar os fatores de virulência secretados durante o crescimento *in vitro* da bactéria, conforme recomendado por Tsai, Loh e Proft (2016). Após a segunda centrifugação, o *pellet* de células era ressuspensionado em solução salina até atingir a concentração desejada. Esta era padronizada em espectrofotômetro (OD₆₀₀, densidade óptica em comprimento de onda de 600nm) (ALGHORIBI *et al.*, 2014; PELEG *et al.*, 2009b), buscando-se um valor de OD igual a 1, equivalente a aproximadamente 1x10⁹ UFC/mL (unidades formadoras de colônia por mililitro). Os inóculos eram utilizados logo após o seu preparo.

Para confirmar o número, ou a concentração, de células bacterianas nos inóculos utilizados, realizava-se a contagem de UFC/ml a partir de diluições seriadas de cada inóculo de todas as cepas testadas. Cinco alíquotas de 20 μ L de cada diluição eram distribuídas em placas de Petri contendo ágar EMB. As placas seguiam para incubação em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas. Decorrido este tempo eram efetuados a contagem e o cálculo do número de UFC/mL. Esse procedimento de contagem de células era realizado em todos os ensaios para confirmar a concentração dos inóculos.

Seguindo critério estabelecido por Peleg *et al.* (2009a), testes de inoculação em que os inóculos apresentavam diferença na contagem de células maior que 0,5 Log₁₀ (logaritmo na base 10) tinham seus dados desconsiderados, e os respectivos ensaios eram repetidos.

4.5 Determinação do índice de patogenicidade das cepas APEC em modelo com aves

Testes de patogenicidade *in vivo*, dos 40 isolados APEC, em pintos de um dia foram realizados conforme metodologia proposta por Souza *et al.* (2016), com algumas alterações. Todos os procedimentos realizados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), Pró-reitoria de Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Anexo A) - processo 37010.

4.5.1 Aquisição, alojamento e manutenção dos animais experimentais

Para a realização do estudo proposto foram necessários pintos de um dia de idade saudáveis: 40 cepas APEC x 10 pintos/cepa = 400 animais. Como os testes foram realizados em triplicada, e com pelo menos um grupo controle (animais não inoculados) em cada repetição, o total de animais utilizados nos experimentos foi de 1230. Considerando-se o percentual de 5 a 10% de perdas com mortalidade no transporte ou pintos refugos, foram adquiridas aproximadamente 1360 aves. A utilização de 10 animais por grupo, ou cepa APEC, fez-se necessária para a manutenção da confiabilidade dos resultados, à medida que compõem o índice de patogenicidade estabelecido e validado por Souza *et al.* (2016).

Os animais utilizados neste projeto de pesquisa foram adquiridos de uma empresa avícola comercial, a partir de seu incubatório. O transporte rodoviário dos animais até o CDPA foi realizado por veículo em boas condições, em caixas de transporte fornecidas pela própria empresa e adequadas para a espécie, garantindo-se a manutenção da temperatura de conforto dos animais (32°C).

Após recepção no CDPA, os pintos de um dia eram distribuídos aleatoriamente (grupos de 10 animais) em caixas plásticas com as seguintes dimensões: 0,6m de comprimento, 0,40m de largura (área equivalente a 0,24m²) e 30cm de altura. Dessa área, 0,04 m² era destinada ao bebedouro e ao comedouro infantis, atendendo às exigências para a faixa etária (1 a 7 dias de idade). O total de área livre era de 0,2 m². Sendo assim, 10 pintos por caixa atendeu de forma integral o espaço necessário para os animais de cada grupo experimental. Todas as caixas com os animais foram dispostas em duas mesas de aço inoxidável existentes na sala experimental.

A sala do CDPA destinada à experimentação com os animais apresentava excelentes características de limpeza e isolamento. Os parâmetros de temperatura e umidade relativa (UR) do ambiente eram monitorados duas vezes ao dia durante todo o período experimental, fazendo-se o uso de condicionadores de ar ou aquecedores elétricos sempre que necessário.

As aves receberam alimento de qualidade (ração inicial que atendia aos requisitos nutricionais da idade) e água potável *ad libitum* durante todo o período experimental. Maravalha estéril foi utilizada para forrar o fundo das caixas.

4.5.2 Procedimento de inoculação das aves

Cada uma das 40 cepas APEC foi inoculada em 10 pintos de um dia de idade. Preparado conforme descrito no item 4.4, a concentração final do inóculo de cada cepa era de 10^9 UFC/mL. Um dos membros da equipe executora do projeto fazia a inoculação de 100 μ L da suspensão bacteriana por meio de uma seringa agulhada, por via subcutânea, na região do peito, enquanto outro operador fazia a contenção da ave. O grupo denominado controle negativo constituiu-se de 10 pintos inoculados com 100 μ L de solução salina estéril, por meio dos mesmos procedimentos descritos anteriormente.

Todos os pintos inoculados foram observados por sete dias. Animais que vierem a óbito neste período foram necropsiados para observação e contabilização de lesões características de colibacilose: celulite, pericardite, perihepatite, aerossaculite e peritonite. O registro do dia de ocorrência de cada morte foi posteriormente utilizado no cálculo de letalidade de cada cepa APEC. Animais remanescentes ao final do sétimo dia foram eutanaziados e submetidos aos mesmos procedimentos de necropsia.

O método de escolha para eutanásia dos animais foi o deslocamento cervical, que se justifica pelo baixo peso das aves nessa idade (aproximadamente 200g de peso vivo) e pela comprovada habilidade e qualificação da equipe de trabalho responsável pela aplicação do método. Os critérios para escolha do método de eutanásia seguiram as recomendações dispostas na Resolução Normativa nº. 37 do CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal), de 15 de fevereiro de 2018, que estabelece as diretrizes da prática de eutanásia em animais incluídos em atividades de ensino e pesquisa científica.

Todos os resíduos e os materiais contaminantes gerados durante a fase dos ensaios de inoculação foram corretamente destinados para tratamento final. A empresa que fez o recolhimento e o tratamento final dos resíduos possuía autorização dos órgãos ambientais competentes para exercer tal atividade.

4.5.3 Cálculo do índice de patogenicidade

O índice de patogenicidade de cada isolado APEC inoculado foi determinado pela seguinte fórmula: $IP = (TM \times 5) + P + Pe + Ph + A + C$

Onde:

IP = índice de patogenicidade

TM = tempo de morte

P = pericardite

Pe = peritonite

Ph = perihepatite

A = aerossaculite

C = celulite

Animais mortos nas primeiras 24 horas e com isolamento de *E. coli* positivo recebeu pontuação um em todas as variáveis da fórmula, totalizando um índice de patogenicidade máximo, igual a 10. Este valor corresponde a cepas APEC consideradas de alta patogenicidade. Pontuação para as variáveis P, Pe, Ph, A e C: ocorrência da lesão = 1; ausência da lesão = 0.

Posterior às 24 horas da inoculação de cada pinto, a variável tempo de morte (TM) tinha seu valor máximo um subtraído por 0,14, como fator de correção para cada dia de sobrevivida (1 dividido por 7 = 0,14), também denominado Fator de Bonificação de Sobrevivência (FBS). A fórmula para cálculo do IP individual previa ainda a multiplicação por 5 do TM encontrado, a fim de dar um maior peso à variável morte em relação às lesões observadas.

O IP definitivo para cada cepa APEC inoculada foi obtido pela média aritmética dos índices de patogenicidade de cada um dos 10 pintos que compuseram o grupo experimental. O IP variou de 0 a 10 (10 grupos de IP, quando estratificados de maneira decimal), sendo que quanto maior o IP, mais patogênica era a cepa.

O IP de cada cepa APEC foi posteriormente comparado aos resultados encontrados no modelo de infecção com larvas de *G. mellonella*, a fim de se verificar o grau de correlação existente entre eles.

Para fins de comparações múltiplas de média entre os resultados encontrados nas diversas variáveis analisadas, as cepas APEC foram posteriormente agrupadas em três categorias diferentes de IP:

- a) IP 0 a 1,99 = cepas apatogênicas ou de baixa patogenicidade;
- b) IP 2 a 4,99 = patogenicidade intermediária; e
- c) IP 5 a 10 = alta patogenicidade.

4.6 Associação entre os índices de patogenicidade e os grupos filogenéticos

Nesta etapa, os índices de patogenicidade de cada cepa APEC foram associados aos grupos filogenéticos, os quais foram previamente determinados por Rocha *et al.* (2017), através do emprego de protocolo de multiplex-PCR desenvolvido e descrito por Clermont *et al.* (2000).

Os isolados APEC foram classificados em quatro grupos filogenéticos (A, B1, B2 e D), cujo esquema de discriminação é baseado na detecção dos genes *chuA*, *yjaA* e do fragmento de DNA *TspE4.C2*. Pertencem ao grupo A as cepas *chuA* (-), *yjaA* (+/-) e *TSPE4.C2* (-). Os isolados *chuA*(-), *yjaA* (+/-) e *TSPE4.C2* (+) fazem parte do grupo B1, enquanto que os isolados *chuA* (+), *yjaA* (+) e *TSPE4.C2* (+/-) pertencem ao grupo B2. Isolados *chuA* (+), *yjaA* (-) e *TSPE4.C2* (+/-) são do grupo D.

O grupo filogenético de cada uma das 40 cepas APEC está descrito no Apêndice A deste trabalho.

4.7 Padronização das variáveis peso (mg) e tempo de observação pós-inoculação (h)

4.7.1 Padronização do peso mínimo das larvas

Para determinação do peso mínimo, larvas de *G. mellonella* obtidas da criação em laboratório, foram agrupadas em cinco categorias de peso (10 larvas/categoria): (1) 241-250mg, (2) 251-260mg, (3) 261-270mg, (4) 271-280mg e (5) 281-290mg. Todas as larvas selecionadas foram injetadas com 10µL de solução salina estéril 0,85%. A inoculação foi diretamente na hemolinfa da larva, através da última proleg inferior esquerda, com auxílio de seringas de precisão (Hamilton, calibre 26S, capacidade de 10µL). Após as inoculações, as larvas foram colocadas em placa de Petri e incubadas a 37°C, na ausência de luz, em estufas bacteriológicas. O procedimento foi realizado paralelamente por três diferentes inoculadores previamente treinados. Todas as inoculações foram realizadas às cegas (os inoculadores desconheciam as categorias) e em triplicata. A escolha do peso mínimo das larvas para uso nas provas posteriores teve como critério a não ocorrência de mortes, após as inoculações, nas placas da mesma categoria.

4.7.2 Período de observação das larvas pós-inoculação

A fim de se estabelecer o período de tempo necessário à observação das mortes nos ensaios de inoculação das larvas, provas preliminares foram executadas, utilizando-se apenas 15 cepas APEC, escolhidas aleatoriamente. Para isso, diferentes grupos de 10 larvas foram inoculados com quatro concentrações (10^4 , 10^5 , 10^6 e 10^7 unidades formadoras de colônias - UFC/10µL) de cada cepa/inóculo APEC, em três repetições independentes. Os inóculos foram padronizados em espectrofotômetro (OD_{620nm}).

Um grupo controle negativo foi inoculado apenas com solução salina estéril, para acompanhar o estado de saúde das larvas durante todo o período, e para monitorar qualquer efeito letal devido a lesões físicas provocadas pelo ato da inoculação. Outro grupo controle adicional não era manipulado (grupo sem inoculação). Experimentos em que mais de 10% das larvas de um dos grupos controle morriam eram desconsiderados e nova inoculação era realizada. Este critério foi aplicado a todos os ensaios de inoculação das larvas.

A limpeza da agulha e da parte interna da microseringa utilizada nas inoculações era executada a cada 10 injeções ou quando ocorria a troca de inóculo. Para tal, a seringa era lavada sequencialmente em três tubos do tipo Falcon contendo diferentes soluções estéreis: o primeiro com água destilada; o segundo, álcool etílico a 70°GL; e, o terceiro, solução salina. Em cada tubo a agulha era mergulhada e 10 movimentos do êmbolo da seringa para cima e para baixo eram executados.

O período máximo de observação e de contabilização das mortes nestes ensaios foi de 168h (sete dias), em intervalos de 12h.

A definição do tempo de observação (o menor possível) teve como critério a maior correlação com os resultados de DL₅₀ determinados ao final do período de tempo máximo (168h).

4.8 Variáveis de resposta do inseto hospedeiro à infecção com APEC

Variáveis de resposta das larvas de *G. mellonella* frente à infecção com cepas APEC foram investigadas com o objetivo de se encontrar parâmetros que auxiliassem na caracterização da patogenicidade da *E. coli* neste modelo com inseto: DL₅₀, melanização, citotoxicidade (lesão celular), contagem total de hemócitos (densidade celular), curvas de sobrevivência, taxa de mortalidade e escore de doença larval.

Todos os ensaios de inoculação foram realizados em triplicata, utilizando-se larvas de *G. mellonella* a partir de três diferentes ciclos de criação do inseto.

4.8.1 Determinação da dose letal 50% (DL₅₀)

A metodologia para estabelecimento da DL₅₀ seguiu o proposto por Algoribi *et al.* (2014), com algumas modificações. As 40 cepas APEC tiveram sua DL₅₀ determinada. O inóculo inicial de 10⁹ UFC/mL, preparado conforme descrito no item 4.4, sofreu diluições decimais seriadas para se obter doses inoculantes com diferentes concentrações de células

bacterianas (10^2 a 10^7 UFC/10 μ L). Para cada cepa APEC, 10 larvas de *G. mellonella*, com peso corporal previamente padronizado (item 4.7.1), foram inoculadas com 10 μ L de cada diluição do inóculo. Após as inoculações, as larvas foram colocadas em placa de Petri e incubadas a 37°C, na ausência de luz, em estufas bacteriológicas.

O número de larvas mortas foi contabilizado a cada 12h após a inoculação, determinando-se, ao final do período definido no item 4.7.2, qual inóculo matava 50% das larvas (DL₅₀). As larvas eram consideradas mortas quando apresentavam forte melanização e nenhum movimento ao toque com pinça metálica. As larvas mortas, assim que identificadas, eram removidas da placa.

4.8.2 Coleta da hemolinfa

A hemolinfa das larvas inoculadas foi coletada conforme método proposto por Jorjão *et al.* (2018a). As larvas foram imobilizadas em placa de Petri refrigerada por cerca de 5min e, em seguida, foram sacrificadas com um bisturi cirúrgico descartável estéril, com corte único na região ventral, entre as últimas *prolegs*, no sentido céfalo-caudal. A hemolinfa foi coletada pressionando as larvas na porção corporal anterior até o aparecimento de uma gota. A hemolinfa era armazenada em tubo *ependorf* pré-refrigerado para análises posteriores.

Para avaliar a densidade de hemócitos, a citotoxicidade e a melanização da hemolinfa, 15 larvas foram inoculadas com 10^4 UFC de cada cepa APEC. A coleta da hemolinfa, para avaliações posteriores, foi realizada nos períodos de 0, 4 e 12h após a inoculação, sacrificando-se cinco larvas em cada momento para compor o grupo amostral (*pool* de cinco larvas). Larvas inoculadas com solução salina serviram como grupo controle para todos os parâmetros a serem avaliados.

4.8.3 Melanização

A prova teve como objetivo verificar a produção de melanina induzida na *G. mellonella* durante a resposta de fase aguda, após a inoculação das suspensões de 15 cepas APEC. Os procedimentos para inoculação das larvas de *G. mellonella* foi realizado conforme descrito no item 4.7.1, mas com algumas alterações.

Para quantificação da melanização *in vitro*, 75 μ L da hemolinfa coletada, conforme item 4.7.3.2, foram colocados em placa de 96 poços e diluídos com 25 μ L de IPS (tampão anticoagulante estéril - 150mM de cloreto de sódio, 5mM de cloreto de potássio, 100mM de

TRIS-HCl, pH 6,9, 10mM de EDTA e 30mM de citrato de sódio) e 0,37% (v/v) de mercaptoetanol, para bloquear a reação de melanização. Após, foi realizada a leitura da OD em espectrofotômetro com comprimento de onda de 450nm, conforme metodologia proposta por Ciesielczuk *et al.* (2015).

Buscou-se ainda verificar a associação existente entre os resultados da variável “melanização” obtidos através do método *in vitro* e do método visual (critérios descritos no Quadro 2). Para isso, 275 larvas desafiadas aleatoriamente tiveram sua melanização definida por ambos métodos de avaliação, a partir da coleta da hemolinfa em intervalos de tempo aleatórios e não definidos. Para induzir a melanização utilizou-se uma cepa APEC que sabidamente tinha a capacidade de gerar tal resposta celular nas larvas, na dose de 10^4 UFC/larva.

4.8.4 Teste de citotoxicidade

O teste visou quantificar a enzima lactato desidrogenase (LDH) na hemolinfa das larvas desafiadas, como um marcador de dano celular provocado pela infecção por cepas APEC.

A citotoxicidade foi determinada pelo Teste de Citotoxicidade não-radioativa CytoTox 96® (Promega, Madison, WI), conforme proposto por Ciesielczuk *et al.* (2015), e seguindo as instruções do fabricante. Para isso, 20µL da hemolinfa coletada (*pool* de cinco larvas), conforme descrito no item 4.7.3.2, foram transferidos para um novo tubo *eppendorf* com 180µL de IPS, este sem mercaptoetanol. Após adequada homogeneização, 50µL da amostra (hemolinfa+IPS) eram transferidos para uma placa de 96 cavidades (50µL/cavidade). Posteriormente foram adicionados iguais volumes da solução substrato (fornecida pelo kit) e a placa era incubada por 30min, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Ao término deste período, a reação era interrompida através da adição de 50µL/cavidade de uma solução de ácido acético 1M (solução de parada fornecida pelo kit). A citotoxicidade era então determinada espectrofotometricamente (OD_{490nm}).

4.8.5 Análise da densidade celular (contagem total de hemócitos)

Após inoculação das larvas com os 15 isolados APEC, 20µL do pool de hemolinfa foram transferidos para tubo *eppendorf* refrigerado contendo 20µL de IPS e 0,37% (v/v) de mercaptoetanol. A contagem total de hemócitos foi realizada em hemocitômetro (Câmara de Neubauer), como sugerido por Wu, Xua e Yia (2016). A densidade celular foi expressa como

o número de células/mL de hemolinfa, sendo a média das três inoculações independentes correspondente a cada cepa APEC.

4.8.6 Cálculo da taxa de mortalidade e construção das curvas de sobrevivência

Investigou-se a virulência de cada uma das 40 cepas APEC contabilizando-se o número de larvas mortas, após a inoculação, a cada intervalo de 12h. O período de tempo total necessário à avaliação das larvas desafiadas foi definido em ensaios preliminares, conforme descrito no item 4.7.2. Nesta fase de avaliação das variáveis de resposta associadas à mortalidade das larvas, a suspensão bacteriana inoculada foi aquela correspondente à DL50 média das 40 cepas APEC, calculada previamente e correspondente à 10^5 UFC/larva.

Os dados de mortalidade permitiram construir as curvas de sobrevivência (método Kaplan–Meier) e determinar as taxas de mortalidade das larvas, ao final do período de observação, associadas a cada uma das cepas APEC testadas.

4.8.7 Determinação do escore de doença larval

Como método alternativo para estimar a patogenicidade das 40 cepas APEC em larvas de *G. mellonella*, utilizou-se os parâmetros propostos por Loh *et al.* (2013) em seu sistema de avaliação da condição de saúde de larvas, com algumas modificações (Quadro 2). O sistema de avaliação das larvas desafiadas, usado neste trabalho, foi chamado de escore de doença larval.

Para a determinação do escore de doença larval (0 a 10), 10 larvas foram inoculadas com cada uma das 40 cepas APEC, em ensaios com três repetições. O tempo transcorrido até a morte foi ponderado no cálculo do índice (quanto menor o tempo, maior a pontuação). Nesse sistema todas as larvas foram avaliadas individualmente, sendo a pontuação média das o valor final do índice. Valores elevados, próximo a 10, significam que as larvas ficaram muito doentes após a inoculação com o isolado APEC.

O período de observação de 72h para avaliação das larvas desafiadas foi definido em ensaios preliminares, conforme descrito no item 4.7.2.

Quadro 2. Parâmetros que compõem o escore de doença larval.

Larvas	Parâmetro	Descrição	Nota
Vivas	<i>Atividade</i> ¹	Nenhuma ou mínima	1
		Média*	0,5
		Máxima*	0
	<i>Formação de casulo</i> ¹	Sem casulo	0,5
		Casulo parcial	0,25
		Casulo completo	0
	<i>Melanização</i> ¹	Máxima (coloração preta ou marrom escuro)	1
		Média (> 3 manchas escuras na larva)	0,5
		Sem ou mínima (≤ 3 manchas escuras na larva)	0
Mortas	<i>Tempo de morte (h)</i>	12	10
		24	7
		36	5
		48	4
		60	3,5
		72	3

1 = parâmetro avaliado em intervalos de 24 horas após a inoculação do grupo de larvas;

4.9 Análises estatísticas dos dados

Os dados encontrados nos testes experimentais foram analisados considerando os três ensaios biológicos combinados (repetições) para cada variável de resposta e, quando necessário para fins de comparação, os resultados obtidos nos grupos controle negativo (larvas inoculadas com solução salina 0,85% estéril).

A DL₅₀ individual dos 40 isolados de APEC utilizados no estudo foi calculada por meio do modelo de regressão Probit, considerando os diferentes períodos de observação de mortes das larvas de *G. mellonella* nos ensaios de inoculação (24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168h).

Os dados de sobrevivência das larvas, após os testes experimentais de infecção, foram plotados usando o método Kaplan–Meier e a comparação das curvas de sobrevivência foi feita usando o teste Log-rank (Mantel-Cox), para comparações múltiplas.

Os dados de algumas variáveis, como a DL₅₀ individual das cepas APEC, a citotoxicidade, a melanização e o escore de doença das larvas, foram correlacionados com o IP *in vivo* das cepas APEC determinado no modelo com aves (pintos de um dia de idade). Para verificar o grau e a direção da correlação/associação entre as variáveis e o IP foi utilizado o

coeficiente de correlação de postos de Spearman, pois o IP foi tratado como variável categórica ordinal. Demais análises de associação consideraram o coeficiente de correlação de Pearson.

Comparações múltiplas de médias das variáveis foram realizadas a fim de se verificar diferenças de comportamento entre as cepas APEC e entre os três grupos de patogenicidade (apatogênicas ou baixa, intermediária e alta patogenicidade). Para isso os testes utilizados foram ANOVA (Análise de Variância), seguida pelo teste de Tukey (diferença mínima significativa). Quando os pré-requisitos para a realização da ANOVA não eram alcançados, realizou-se o teste de Kruskal-Wallis (não-paramétrico).

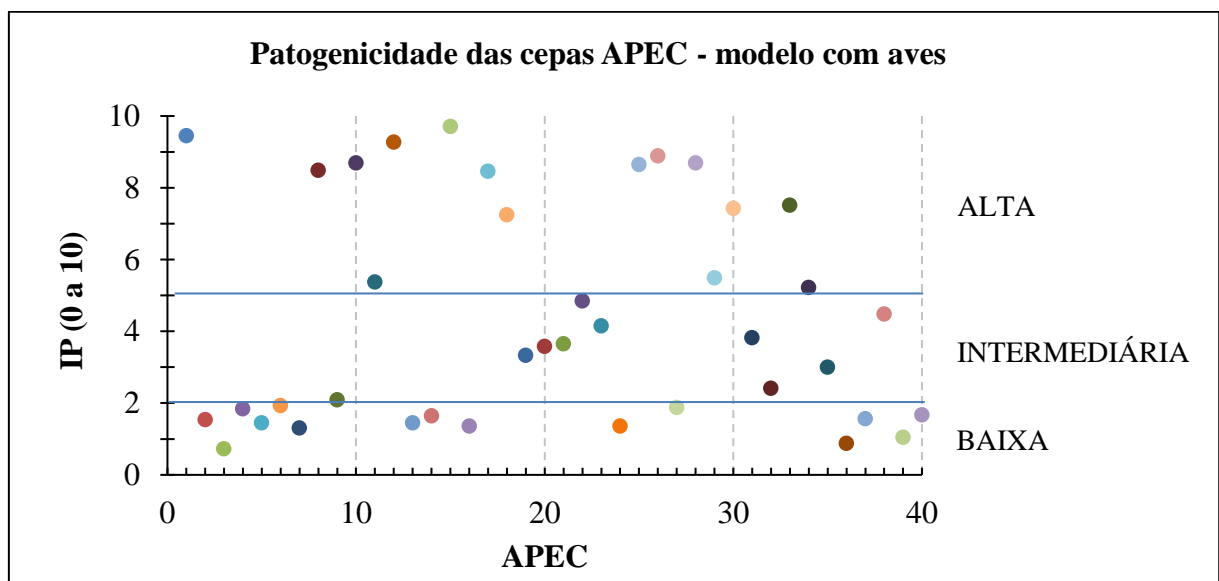
Todas as análises estatísticas foram realizadas por meio dos softwares GraphPad Prism 9 (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA), Predictive Analytics SoftWare (PASW Statistics, versão 18.0.0) e Microsoft Excel (Microsoft Corporation©, versão 2010), para Windows. O nível de significância adotado nos testes foi de 5 % ($p \leq 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Índice de patogenicidade das cepas APEC no modelo com aves

Na Figura 4, pode-se visualizar o IP encontrado nas inoculações experimentais, em pintos de um dia de idade, com as 40 cepas APEC selecionadas para este estudo.

Figura 4 – Índice de patogenicidade das cepas APEC observados nas inoculações experimentais com pintos de um dia de idade.



Legenda: APEC = *Escherichia coli* Patogênica Aviária; IP = Índice de patogenicidade.

A Tabela 1 apresenta a estratificação dos índices obtidos, considerando a classificação da patogenicidade como baixa, intermediária e alta.

Tabela 1 – Índice de patogenicidade das cepas APEC determinado após inoculação em pintos de um dia de idade.

Patogenicidade	N. de cepas	Percentual (%)	IP		
			Mínimo	Médio	Máximo
Baixa (IP ≤ 1,99)	15	37,5	0,73	1,44	1,93
Intermediária (IP 2 a 4,99)	10	25	2,09	3,54	4,84
Alta (IP ≥ 5)	15	37,5	5,22	7,76	9,71

*IP= índice de patogenicidade.

De acordo com Antão *et al.* (2008), para melhor estudar isolados APEC é absolutamente necessário ter um modelo de doença de infecção apropriado. Embora a galinha seja o hospedeiro natural, há diversos fatores que precisam ser levados em consideração ao realizar experimentos *in vivo*. Estes incluem os tipos de aves utilizadas, idade ou categoria, a suscetibilidade das aves, dose e o modelo de infecção. Os resultados finais dos experimentos de infecção, para análise da patogênese, como os realizados neste estudo, estão diretamente associados a esses fatores. Isso significa dizer que um outro modelo de infecção *in vivo* utilizando galinhas e as mesmas cepas APEC pode ter resultados diferentes daqueles encontrados neste trabalho, devido ao efeito de outras variáveis.

A via de inoculação dos pintos de um dia de idade foi a subcutânea e, segundo Antão *et al.* (2008), não é a ideal, pois não simula a principal rota natural da infecção (respiratória). A via subcutânea acaba contornando o trato respiratório superior, e, desta forma, os mecanismos primários de defesa do hospedeiro, incluindo filtração aerodinâmica, depuração mucociliar e fagocitose, não são contabilizados.

Os resultados obtidos com as inoculações de pintos de um dia de idade, com inóculo de dose equivalente à 10^8 UFC/ave, mostraram que algumas cepas de *E. coli* selecionadas para o estudo ($n=15$) podem ser classificadas como comensais, devido ao baixo índice de patogenicidade resultante ($IP \leq 1,99$). Por outro lado, observaram-se cepas de alta patogenicidade, as quais efetivamente conseguiram reproduzir a infecção em aves consideradas saudáveis e imunocompetentes, mostrando que o modelo *in vivo* proposto por Souza *et al.* (2016) é adequado para o estudo da patogênese de cepas APEC.

5.2 Associação entre o IP e os grupos filogenéticos

Na Tabela 2, pode-se observar a distribuição das cepas APEC nos grupos filogenéticos e patogênicos. Os resultados demonstram que 80% (12/15) das cepas APEC de baixa patogenicidade ($IP \leq 1,99$) foram classificadas nos grupos A e B1, considerados comensais, enquanto que 73,3% (11/15) das de alta patogenicidade estiveram associadas aos grupos B2 e D (patogênicos). Cepas de patogenicidade intermediária ficaram distribuídas de maneira semelhante dentro dos quatro grupos filogenéticos.

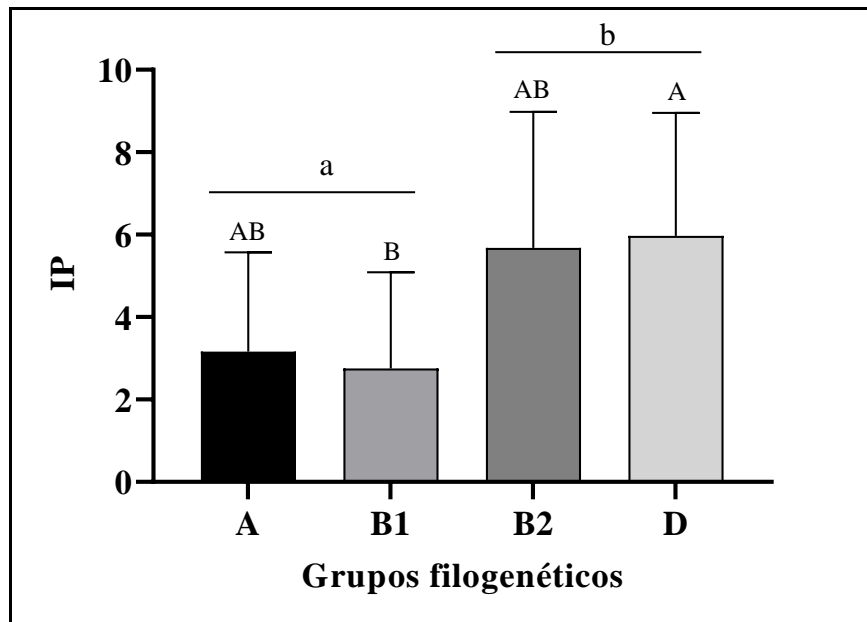
Tabela 2 – Associação entre a patogenicidade *in vivo* (pintos de um dia) e a classificação em grupos filogenéticos.

Grupo filogenético	Cepas APEC (patogenicidade)		
	Baixa	Intermediária	Alta
A	4/9 (44,5%)	3/9 (33,3%)	2/9 (22,2%)
B1	8/11 (72,7%)	1/11 (9,1%)	2/11 (18,2%)
B2	2/9 (22,2%)	2/9 (22,2%)	5/9 (55,6%)
D	1/11 (9,1%)	4/11 (36,4%)	6/11 (54,5%)

Legenda: baixa = IP \leq 1,99 ($n=15$); intermediária = IP 2 a 4,99 ($n=10$); alta = IP 5 a 10 ($n=15$).

Os dados obtidos revelaram um grau moderado de associação entre cepas de baixa patogenicidade e os grupos filogenéticos A e B1 (12/20, 60%), e entre cepas de alta patogenicidade e os grupos filogenéticos B2 e D (11/20, 55%). A análise comparativa das médias de IP resultantes corroborou com esta associação (Figura 5), uma vez que a média de IP dos grupos A e B1 foi significativamente ($p \leq 0,05$) menor que a dos grupos B2 e D.

Figura 5 – Índice de patogenicidade de cepas APEC e a classificação em grupos filogenéticos.



Legenda: IP= índice de patogenicidade das cepas APEC.

Letras distintas (A ou B) caracterizam diferença significativa ($p \leq 0,05$, teste de Tukey) entre os quatro grupos filogenéticos. Letras distintas (a ou b) caracterizam diferença significativa ($p \leq 0,05$, teste de Tukey) entre os dois conjuntos (A+B1 e B2+D).

Os resultados obtidos revelaram uma associação moderada entre os índices de patogenicidade determinados em pintos de um dia de idade e os grupos filogenéticos definidos por Clermont *et al.* (2000). Rocha *et al.* (2017) já haviam encontrado resultados semelhantes, quando isolados APEC do grupo B2 apresentaram um índice de patogenicidade médio de 7,17, seguido pelo grupo D com média de 6,09 e dos isolados dos grupos A e B1, com médias de 4,1 e 4,6, respectivamente. Rocha *et al.* (2017) concluem o estudo sugerindo que a patogenicidade das cepas APEC pode ser definida por meio do protocolo de m-PCR, descrito por Clermont e colaboradores (2000), em três grupos: alta (B2), intermediária (D) e baixa (A e B1). Contudo, é importante destacar que a associação entre os dois métodos (*in vivo* e PCR) foi moderada e, por isso, muitas amostras foram classificadas incorretamente. Cepas com diferentes graus de patogenicidade (baixa, intermediária e alta) apareceram dentro dos quatro grupos filogenéticos.

Com base nos dados obtidos, pode-se afirmar que a metodologia proposta por Clermont *et al.* (2000) é útil quando há o interesse de se conhecer o perfil de patogenicidade de um conjunto de cepas. Por outro lado, análises individuais, ou de poucas cepas APEC, podem ter um resultado totalmente diferente do *in vivo* (IP em pintos).

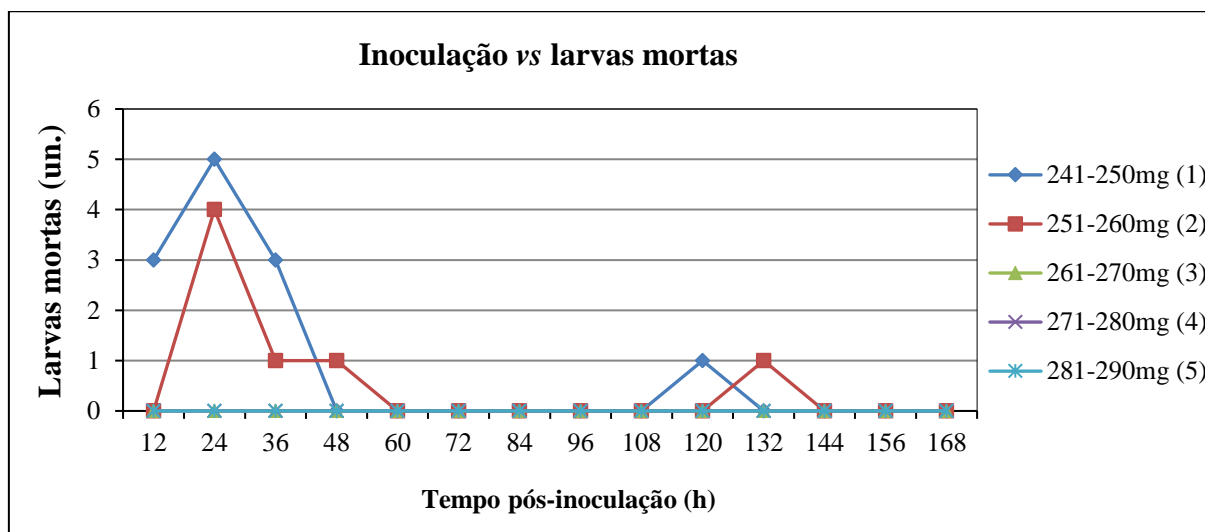
5.3 Peso ideal das larvas de *G. mellonella* para ensaios de inoculação

Embora o modelo de *G. mellonella* já esteja bem desenvolvido para uso em infecções experimentais, observa-se a falta de padronização de alguns critérios nos protocolos, entre eles o peso das larvas do inseto.

Os simples atos de introduzir a agulha da microsseringa através da cutícula ou de conter a larva com os dedos das mãos, durante o procedimento de inoculação, podem provocar lesões físicas severas à larva, levando-a à morte após algumas horas ou dias. Estes fatores de interferência podem ser controlados, ou ao menos minimizados, por meio do uso de larvas com tamanho adequado para tal finalidade.

Conforme pode ser verificado na Figura 6, inoculações experimentais testaram larvas com diferentes pesos, criando-se cinco categorias com base nos pesos mínimo e máximo de 241mg e 290mg, respectivamente. Três pessoas treinadas realizaram as inoculações das larvas.

Figura 6 – Número de larvas mortas, após inoculação com solução estéril, em cada uma das cinco categorias de peso.



$n = 90$ larvas/categoria.

Do total de larvas mortas, 63,15% (12/19) ocorreram na categoria 1 e 36,85% (7/19) na categoria 2. A taxa de mortes associada ao efeito da inoculação (manipulação, introdução da agulha da seringa e injeção do líquido), considerando todas as larvas usadas no experimento, ficou em 4,22% (19/450). Nenhuma larva morreu nas categorias de peso 3, 4 e 5, independentemente de qual dos três inoculadores tenha realizado o procedimento. Do total de mortes observadas, 31,6% (6/19) foram associadas ao inoculador um, 42,1% (8/19) ao inoculador dois e 26,3% (5/19) ao inoculador três. Erros de inoculação dificilmente são detectáveis durante os ensaios, por três motivos: 1, a morte geralmente não é instantânea (no momento da introdução da agulha e injeção do inóculo); 2, as mortes decorrentes do efeito da inoculação aparecem no mesmo período de tempo daquelas provocadas por infecções (suspensões bacterianas); e 3, as variáveis utilizadas para avaliação da saúde das larvas não diferenciam as causas de morte (lesão física acidental ou infecção).

Ao revisar os protocolos experimentais de trabalhos científicos publicados, verifica-se uma grande variabilidade no parâmetro “peso corporal das larvas” adotado nos ensaios de inoculação com isolados de *E. coli*: 280 a 320mg (JORJÃO *et al.*, 2018a); aproximadamente 300mg (CHEN; KEDDIE, 2021); 15 a 25mm de comprimento (ALGHORIBI *et al.*, 2014; MANOHAR; NACHIMUTHU; LOPES, 2018); 200 a 250mg (JONSSON *et al.*, 2016); 100 a 200mg (WILLIAMSON *et al.*, 2014); outros autores não informaram o peso das larvas utilizadas nos estudos (ANTOINE *et al.*, 2021; CIESIELCZUK *et al.*, 2015; LEUKO; RAIVIO, 2012).

Em pesquisas com outros gêneros bacterianos, Mukherjee *et al.* (2010), ao proporem o uso da *G. mellonella* como sistema modelo para o estudo de *Listeria*, utilizaram larvas com peso entre 250 e 350mg. Este mesmo critério de escolha foi adotado por Peleg *et al.* (2009b), em ensaios de inoculação com *Acinetobacter baumannii*. Em investigações sobre a patogenicidade de estirpes de *Acinetobacter baumannii*, Giannouli *et al.* (2013) utilizaram larvas com peso médio de 500 ± 60 mg. Firacative, Duan e Meyer (2014) empregaram larvas com peso corporal de aproximadamente 3g. Essa variação e amplitude observada no peso médio de larvas aplicado em ensaios de infecção, sendo estes todos dose-dependentes, levanta-se a hipótese de haver diferentes linhagens de *G. mellonella* sendo utilizadas pelos centros de pesquisa. Na criação de larvas mantida no CDPA, durante a condução deste estudo, poucos exemplares atingiram o peso de 380mg.

Com base nos resultados alcançados neste trabalho pelos três inoculadores, determinou-se que o peso mínimo das larvas, para uso nos ensaios de inoculação, seria de 260mg. Desta forma, excluiu-se o efeito do ato de inoculação sobre a variável mortalidade. Já o peso máximo definido foi de 320mg, utilizando-se como critérios a referência de outros estudos publicados na literatura científica e a necessidade de se ter pesos mais homogêneos em testes de desafio (dose-resposta). A diferença de 60mg entre o mínimo e o máximo mantém ainda um efeito na ordem de, aproximadamente, 18,8% da variável peso. Além disso, a obtenção de larvas com peso maior que 320mg seria muito difícil, considerando condições normais de criação estabelecidas em laboratório, como o CDPA/UFRGS.

5.4 Susceptibilidade das larvas a estirpes APEC e período de observação pós-inoculação

Para investigar a susceptibilidade da larva e a viabilidade do uso de *G. mellonella* no estudo de patogenicidade de APEC, avaliou-se a capacidade das cepas de causar a morte de larvas. Diversos grupos de larvas previamente selecionadas e com peso entre 260 e 320mg foram inoculadas com suspensões bacterianas de 15 amostras APEC (10 larvas/cepa/inóculo). Todos os ensaios foram realizados com diluições decimais seriadas dos inóculos (10^3 a 10^7 UFC) e em três experimentos independentes. A Tabela 3 e a Figura 7 mostram os resultados obtidos nos ensaios ao longo de sete dias (168h), com avaliações a cada 12h.

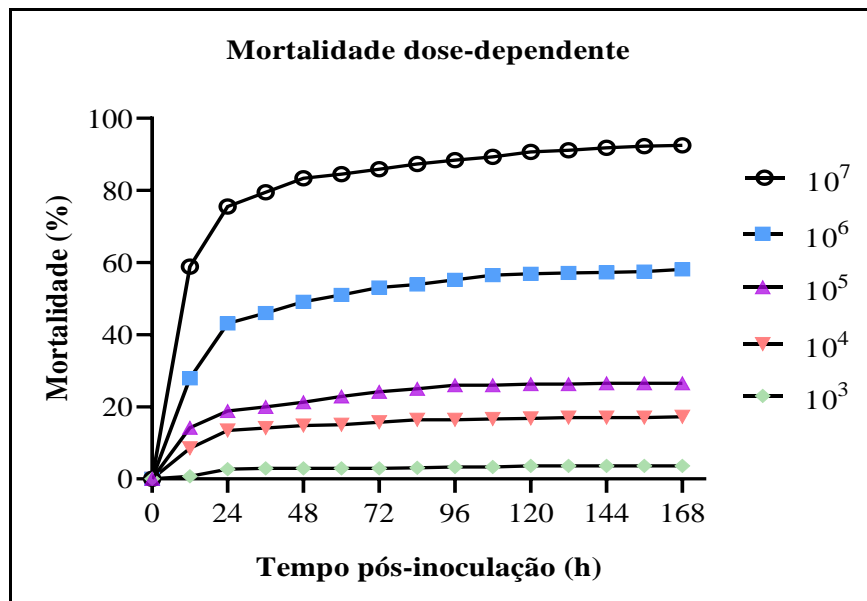
Tabela 3 – Perfil de mortalidade de larvas de *G. mellonella* observado após inoculações com diferentes concentrações de células das cepas APEC.

h	Dose (UFC/larva)					Mortalidade média (%) [*]	
	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	Relativa	Acumulada
	Mortalidade relativa (acumulada) - %						
12	59,8 (59,8)	27,9 (27,9)	14,2 (14,2)	8,5 (8,5)	0,7 (0,7)	21,8	21,8
24	15,7 (75,5)	15,2 (43,1)	4,6 (18,8)	4,9 (13,4)	2,0 (2,7)	8,7	30,5
36	4,1 (79,5)	2,9 (46,0)	1,3 (20,0)	0,7 (14,1)	0,2 (2,9)	1,9	32,4
48	3,9 (83,4)	3,1 (49,1)	1,3 (21,3)	0,7 (14,8)	0,0 (2,9)	1,8	34,2
60	1,1 (84,5)	1,9 (51,0)	1,7 (22,9)	0,2 (15,0)	0,0 (2,9)	1,0	35,2
72	1,4 (85,9)	2,1 (53,1)	1,3 (24,2)	0,7 (15,7)	0,0 (2,9)	1,1	36,3
84	1,4 (87,3)	0,8 (53,9)	0,8 (25,0)	0,7 (16,4)	0,2 (3,1)	0,8	37,1
96	1,1 (88,4)	1,3 (55,2)	1,0 (26,0)	0,0 (16,4)	0,2 (3,3)	0,8	37,9
108	0,9 (89,3)	1,3 (56,5)	0,0 (26,0)	0,2 (16,6)	0,0 (3,3)	0,5	38,4
120	1,4 (90,7)	0,4 (56,9)	0,3 (26,3)	0,2 (16,8)	0,3 (3,6)	0,5	38,9
132	0,5 (91,1)	0,2 (57,1)	0,0 (26,3)	0,2 (17,0)	0,0 (3,6)	0,1	39,0
144	0,7 (91,8)	0,2 (57,3)	0,2 (26,5)	0,0 (17,0)	0,0 (3,6)	0,2	39,2
156	0,5 (92,3)	0,2 (57,5)	0,0 (26,5)	0,0 (17,0)	0,0 (3,6)	0,2	39,4
168	0,2 (92,5)	0,6 (58,1)	0,0 (26,5)	0,2 (17,2)	0,0 (3,6)	0,2	39,6
Total	92,5	58,1	26,5	17,2	3,6	39,6	-

Legenda: h = horas pós-inoculação; UFC = unidades formadoras de colônias.

* Percentual calculado com base no total de larvas mortas a cada 12 horas, considerando a soma das larvas mortas nas cinco doses testadas.

Figura 7 – Perfil de mortalidade observado em larvas de *G. mellonella* inoculadas com suspensões de cepas APEC em diferentes concentrações.



Legenda: a mortalidade foi calculada com os dados dos experimentos de inoculação das larvas de *G. mellonella* com diluições seriadas de 15 isolados APEC, em três ensaios independentes.

Os dados de mortalidade demonstraram que as larvas de *G. mellonella* foram susceptíveis à infecção por APEC. Independente da dose, ou concentração, do inóculo utilizado para desafiar as larvas, ficou caracterizado que a maior parte das mortes ocorreu já nas primeiras 12-24h pós-inoculação, quando se analisam os dados das 15 cepas APEC em conjunto. A mortalidade média acumulada entre o final das 24h e 168h foi de apenas 9,1%, muito semelhante à observada entre 12 e 24h (8,7%), por exemplo. Após 72h, ocorreram apenas 8,3% (3,3/39,6) do total de mortes contabilizadas, sendo quase nulas nas concentrações menores que 10^6 UFC/larva. Os resultados encontrados revelaram ainda que as larvas, embora suscetíveis à infecção pela *E. coli*, conseguiram resistir quando desafiadas com baixas contagens de células bacterianas (doses 10^3 e 10^4 UFC/larva). Além disso, não foram observadas mortes de larvas em inoculações com doses $<10^3$ UFC (dados não publicados). Os dados sugerem que o sistema imune da *G. mellonella* foi capaz de controlar efetivamente APEC em doses baixas.

A taxa de mortalidade de larvas de *G. mellonella* se mostrou dose-dependente, conforme relatado por outros pesquisadores em ensaios com bactérias Gram positivas e negativas (JONSSON *et al.*, 2016; MUKHERJEE *et al.*, 2010; PELEG *et al.*, 2009b). À medida em que se aumentou um log de UFC, na concentração das doses sequenciais, a taxa de mortalidade se elevou, mantendo uma proporção de aproximadamente 1,5 a 2 vezes. Doses com altas concentrações, como o inóculo 10^7 UFC/larva, ou superior, provocaram altas taxas de mortalidade de larvas, independente da patogenicidade da cepa inoculada. Resultados semelhantes já haviam sido relatados por Mukherjee *et al.* (2010), ao observarem que espécies de *Listeria* não patogênicas provocavam uma morte séptica de larvas de *G. mellonella* quando inoculadas com altas concentrações (10^7 UFC/larva). Os pesquisadores sugeriram que isso provavelmente se deve a um limiar sobre o qual os processos que levam à morte larval são induzidos através da ativação esmagadora do sistema imunológico inato. Por outro lado, em doses de 10^6 UFC/larva, espécies de *Listeria* não patogênicas, sem fatores de virulência, provavelmente foram acionadas por receptores celulares que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos bacterianos (PAMPs), como peptidoglicano, levando à ativação do sistema imunológico inato e à eliminação bacteriana. Peleg *et al.* (2009b) também demonstraram que a morte da *G. mellonella* é significativamente dependente do número de células inoculadas. Mais de 75% das larvas foram mortas em até 48h após a infecção com ao menos $3,7 \times 10^5$ UFC/larva de *A. baumannii*, enquanto poucas foram mortas com a dose de $3,7 \times 10^4$ UFC/larva.

Essas hipóteses e os resultados obtidos no presente estudo reforçam a necessidade da confirmação das concentrações das doses inoculadas nos ensaios de desafio, por meio da

contagem de células viáveis em placas, pois concentrações com desvios maiores que 0,5log podem distorcer os dados e gerar conclusões inconsistentes. Além disso, doses elevadas ($\geq 10^7$ UFC/larva) podem reduzir o potencial de discriminação de cepas APEC de patogenicidade variável, quando o critério “mortalidade/sobrevivência” é utilizado como parâmetro único.

Com base nos dados de mortes de larvas obtidos ao longo dos ensaios, calculou-se a DL₅₀ média das 15 cepas APEC inoculadas (Tabela 4).

Tabela 4 – Valor da DL₅₀ das cepas APEC calculada a partir de diferentes períodos de observação, horas pós-inoculação.

DL ₅₀ (UFC)	Período de observação pós-inoculação (h)						
	24	48	72	96	120	144	168
Média	6,072	5,896	5,771	5,677	5,624	5,600	5,580
Desvio padrão	1,214	1,101	1,063	1,038	1,015	1,001	0,997
Mínima	4,000	3,923	3,876	3,791	3,768	3,768	3,744
Máxima	8,305	7,682	7,252	7,223	7,126	7,056	7,056
Diferença (máx. - mín.)	4,305	3,759	3,376	3,432	3,358	3,288	3,312
Coef. de correlação*	0,955	0,975	0,988	0,999	0,965	0,999	-

Legenda: UFC = unidades formadoras de colônia.

*Coeficiente de correlação de Pearson encontrado na análise dos dados, tendo como referência as DL₅₀ das 15 cepas APEC calculadas às 168h (sete dias), pós-inoculação.

Dados expressos em log (n= 15).

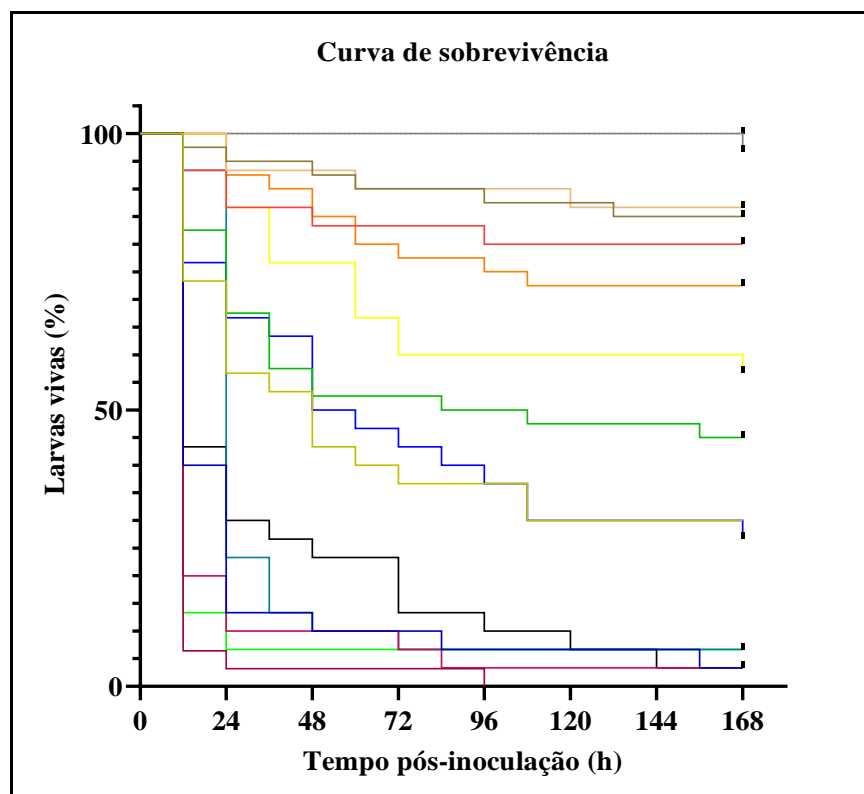
Os dados revelaram que algumas cepas APEC apresentaram reduzida capacidade de causar a morte de larvas de *G. mellonella*, pois mesmo após 168h de observação houveram valores de DL₅₀ próximo de 7 log UFC. Por outro lado, determinadas cepas se mostraram altamente patogênicas, com DL₅₀ 3,3 log UFC menor quando comparada à cepa de maior DL₅₀. Os resultados demonstraram que houve certa variabilidade na patogenicidade dos isolados APEC, indo ao encontro do verificado nos ensaios de inoculação no modelo com aves.

Tsai, Loh e Proft (2016), em sua revisão de literatura sobre o uso da *G. mellonella* como modelo de infecção em estudos de doenças bacterianas e de testes de moléculas antimicrobianas, relataram que a virulência microbiana tem sido tipicamente avaliada ao longo de 5 dias após a inoculação das larvas. Entretanto, os dados obtidos neste trabalho mostram que a DL₅₀ praticamente independe do tempo usado como referência para computação das mortes de larvas, para fins de cálculo e considerando os períodos testados, pois houve uma alta correlação (>0,95) entre os valores dos diferentes períodos de tempo. A alta correlação denota

que a morte das larvas infectadas apresentou certa linearidade quando se avaliou o conjunto dos resultados das 15 cepas APEC, pois basta observar os valores médios das DL_{50} em cada um dos períodos (redução progressiva ao longo do tempo). Esses números demonstram que ensaios de infecção podem ser realizados considerando um menor período de avaliação, sem perder valor de significância relevante. Para efeitos de comparação, Jonsson *et al.* (2016), seguindo protocolo de inoculação similar, com concentrações de suspensões bacterianas variando de 10^2 a 10^7 UFC/larva, calcularam a DL_{50} de isolados EAEC às 24h pós-infecção. Este critério havia sido anteriormente aplicado por Alghoribi *et al.* (2014), quando mesmo acompanhando a mortalidade de larvas inoculadas com UPEC por 120h, calcularam a DL_{50} das amostras considerando apenas o período de 0 a 24h.

As curvas de sobrevivência das larvas (Figura 8) foram construídas para se verificar a possibilidade de caracterização da patogenicidade das cepas APEC a partir do perfil de mortes observado ao longo do tempo. As curvas foram elaboradas com base na mortalidade encontrada em larvas inoculadas com a dose de 10^5 UFC, ao longo de 168h (7 dias).

Figura 8 – Curvas de sobrevivência construídas a partir dos dados de mortalidade de larvas encontrados após as inoculações com cada uma das cepas APEC ($n=15$).



Legenda: os dados de sobrevivência das larvas foram plotados usando o método Kaplan–Meier e são a média de três ensaios independentes de cada cepa APEC. Dose de inoculação = 10^5 UFC/larva. Houve diferença significativa entre as curvas de sobrevivência ($p \leq 0,05$, teste Log-rank - Mantel-Cox).

A Figura 8 mostra que as cepas APEC demonstraram diferentes graus de patogenicidade frente à *G. mellonella*, pois enquanto algumas provocaram baixos índices de mortalidade, outras causaram a morte de praticamente todas as larvas em poucas horas após a inoculação. O número de larvas mortas variou ao longo do tempo, de uma cepa para outra, mas, no geral, reduziu drasticamente após 72h, tornando-se pouco relevantes as modificações nas curvas de mortalidade após 108h. Esses dados sugerem que nesta fase da infecção a taxa de eliminação de APEC, pelo sistema imune das larvas, excedeu a taxa de replicação bacteriana.

Analisar a curva de mortalidade de cada cepa APEC se mostrou relevante, porque, além do total de larvas mortas, este método leva em consideração o fator tempo de morte. Além disso, seria possível realizar comparações entre as curvas, através do teste Log-rank (Mantel-Cox), par a par, para verificar se houve diferença significativa entre elas no perfil de mortalidade.

Tendo como objetivo o uso do modelo de infecção com *G. mellonella* para fins de diagnóstico da patogenicidade de isolados bacterianos, pondera-se que o tempo de observação de 168h (sete dias), para caracterização da mortalidade associada a cepas APEC, é bastante longo. Desta forma, considerando-se que mais de 90% das larvas mortas foram contabilizadas em até 72h (91,7%), que a DL_{50} guardou alta correlação entre os diferentes períodos de tempo utilizados como base para o cálculo, que as curvas de mortalidade se diferiram consideravelmente até 72h de observação e que muitas pesquisas com *E. coli* utilizaram este período, ficou estabelecido que todos os ensaios de inoculação deste estudo seriam conduzidos por até 72h. O intervalo de 12 horas entre as avaliações foi definido de maneira a potencializar a discriminação das taxas e curvas de mortalidade entre cepas APEC. A maioria dos trabalhos científicos publicados adotou um intervalo maior, de 24 horas.

Diversos estudos de infecção com larvas de *G. mellonella* e outros gêneros bacterianos utilizaram o tempo de 72h como parâmetro para observação da mortalidade: Fedhila *et al.* (2010), em estudo com isolados de *Bacillus cereus*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *L. monocytogenes*, *E. faecalis*, *P. entomophila* e *P. aeruginosa*; Giannouli *et al.* (2013), em avaliações de *Acinetobacter baumannii*, além da contabilização de mortes, considerou 72h como o período final para cálculo da DL_{50} individual das cepas; Insua *et al.* (2013) no estudo da patogênese de isolados de *Klebsiella pneumoniae*; e, Leuko e Raivio (2012) em pesquisa com EPEC. Outros trabalhos utilizaram intervalos inferiores e superiores, porém sem um critério explícito que justificasse a escolha.

5.5 Caracterização da patogenicidade de isolados APEC em ensaios de infecção *in vivo* com larvas de *G. mellonella*

Para desenvolver uma maior compreensão sobre a possibilidade de uso de larvas de *G. mellonella* em modelo de infecção para a determinação da patogenicidade de isolados APEC de diferentes origens, uma série de variáveis de resposta foram investigadas e confrontadas. Os resultados obtidos nos ensaios são apresentados nos itens a seguir.

5.5.1 DL₅₀ das cepas APEC

Definido o período de 72h pós-inoculação, para observação e contabilização das larvas mortas, seguiu-se para a determinação da DL₅₀ individual das demais 25 cepas APEC selecionadas para o estudo (Tabela 5). Buscando-se fazer um análise comparativa, uma vez que nos ensaios anteriores a correlação foi alta, a DL₅₀ das cepas também foi calculada com base em períodos mais curtos de observação (24 e 48h).

Tabela 5 – DL₅₀ das cepas APEC (n=40) calculada a partir dos dados de mortalidade computados dentro do período de avaliação de 72h pós-inoculação.

DL ₅₀	Período de observação pós-inoculação (h)		
	24	48	72
Média	5,618	5,446	5,338
Erro padrão	0,166	0,160	0,157
Mínima	3,573	3,317	3,351
Máxima	8,305	7,682	7,252
Intervalo	4,732	4,365	3,901
Coef. de correlação*	0,979	0,989	-

Legenda: DL₅₀ = dose letal para 50% das larvas. h = horas. APEC = *Escherichia coli* Patogênica Aviária.

Dados de DL₅₀ (unidades formadoras de colônia, UFC) expressos em log₁₀ (n= 40).

*Coeficiente de correlação de Pearson encontrado na associação dos dados de DL₅₀ das 24 e 48h com aqueles observados às 72h (3 dias) pós-inoculação.

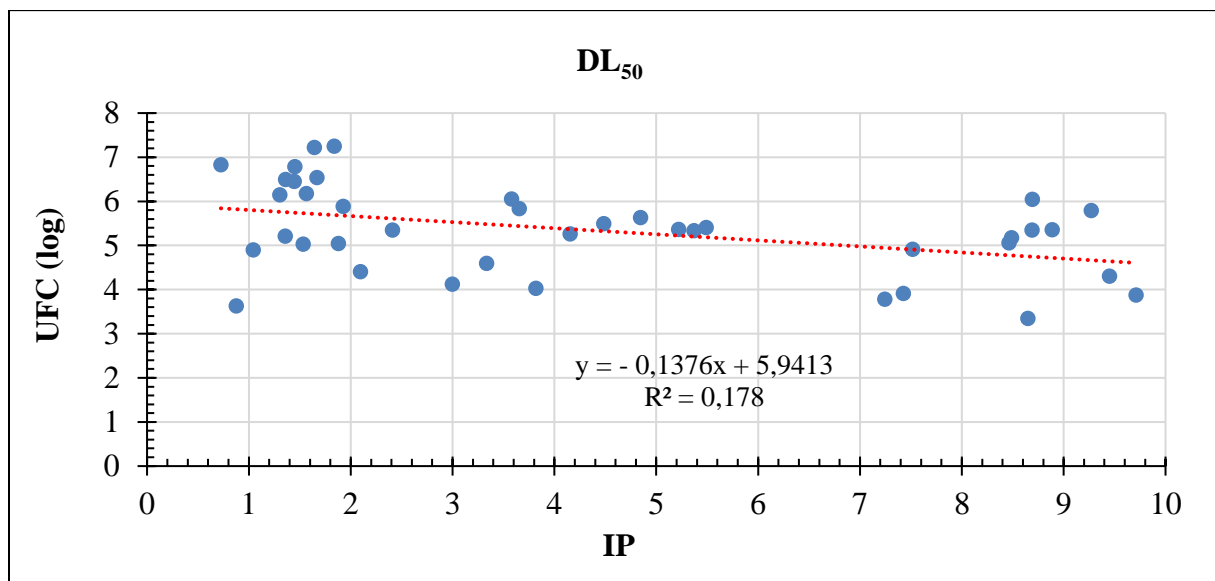
A DL₅₀ média encontrada às 72h (5,338 log), ao analisar os resultados das 40 cepas, foi um pouco menor daquela previamente determinada com apenas 15 cepas APEC (5,771 log, Tabela 4). Isso provavelmente se deveu à incorporação de cepas mais patogênicas ao grupo de estudo, após o acréscimo de 25 isolados APEC. A associação entre os valores de DL₅₀ determinado nos três períodos de tempo foi muito forte (>0,9), o que significa que o cálculo da DL₅₀ tem pouca influência do período de contabilização das mortes em modelo com *G.*

mellonella. Esses dados vão ao encontro do praticado por outros autores em pesquisas com *E. coli*, que adotaram como parâmetro o período de 24h para cálculo da DL₅₀ (ALGHORIBI *et al.*, 2014; CIESIELCZUK *et al.*, 2015; JONSSON *et al.*, 2016).

A DL₅₀ calculada com base no período de 72h teve seu valor médio compreendido entre as doses de inoculação de 10⁵ e 10⁶ UFC. Para fins de padronização dos ensaios de inoculação e comparação dos resultados obtidos nas análises de mortalidade de larvas, a dose de desafio das cepas APEC ficou definida em 10⁵ UFC, valor mais próximo da DL₅₀ média. Esta dose de inoculação é ligeiramente diferente da utilizada pelos pesquisadores Alghoribi *et al.* (2014), nos ensaios de infecção com UPEC (2.87x10⁴ UFC/larva), Williamson *et al.* (2014), nas inoculações de larvas com ExPEC (~1x10⁶ UFC, mantando consistentemente 30–40% das larvas em 72h), e Chen e Keddie (2021), nos desafios das larvas com EPEC (DL₅₀ = 1,5x10⁴ UFC). Em contrapartida, é a mesma dose padronizada por Ciesielczuk *et al.* (2015), nos ensaios com ExPEC (DL₅₀, 24h = 10⁵UFC), e por Morgan, Ortiz e Riordan (2014) em inoculações de larvas com EHEC. Para os ensaios de melanização, citotoxicidade e densidade celular a dose de inoculação foi de 10⁴ UFC/larva.

Na Figura 9 pode-se observar a DL₅₀ média de cada APEC e a correlação existente com o IP encontrado nas inoculações de pintos de um dia de idade.

Figura 9 – Correlação encontrada entre os valores individuais de DL₅₀ das cepas APEC e a patogenicidade determinada nas inoculações em pintos de um dia de idade.

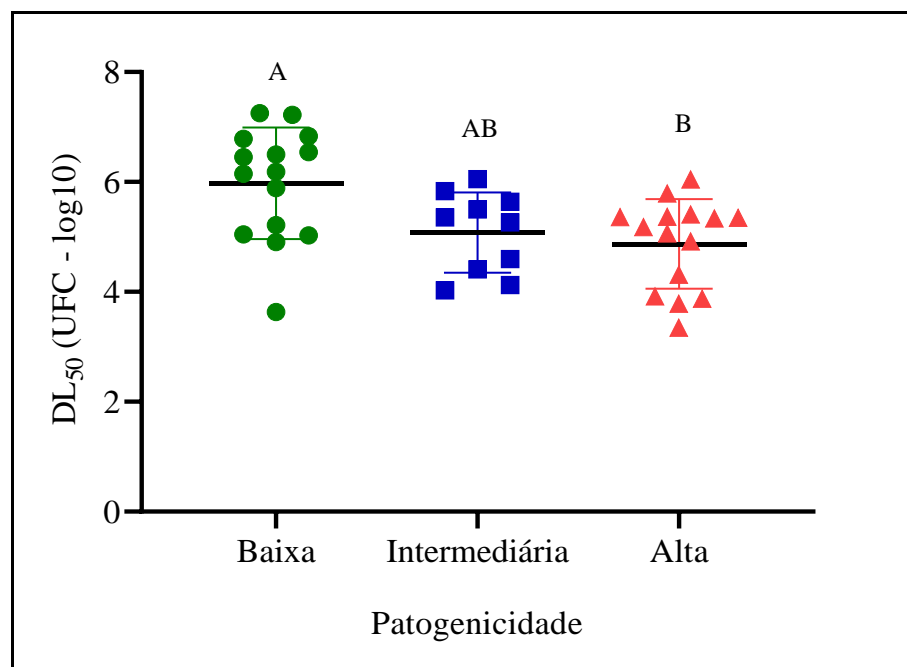


Legenda: DL₅₀ = dose letal para 50% das larvas; IP = índice de patogenicidade determinado em pintos de um dia de idade; UFC = unidades formadoras de colônia; log = logaritmo na base 10. A linha pontilhada em vermelho indica a tendência linear dos dados.

O gráfico de dispersão dos dados mostra que a correlação entre as variáveis DL_{50} e IP teve sentido negativo, o que significa dizer que quanto maior a DL_{50} , menor foi o valor do IP. Ou ainda, que cepas mais patogênicas (de maior IP) requereram uma menor dose para provocar a morte das larvas. A correlação linear entre as variáveis foi fraca (-0,420, coeficiente de Spearman), porém estatisticamente significativa ($p=0,007$). A correlação só não foi melhor porque algumas cepas com maior IP apresentaram elevada DL_{50} , e vice-versa.

Os valores individuais de DL_{50} foram ainda agrupados de acordo com o índice de patogenicidade das APEC (Figura 10).

Figura 10 – Comparação de médias das DL_{50} entre os grupos de patogenicidade das cepas APEC.



Legenda: DL_{50} = dose letal 50%; Baixa= IP $\leq 1,99$ ($n=15$). Intermediária= IP 2-4,99 ($n=10$). Alta = IP 5-10 ($n=15$). IP= índice de patogenicidade.

Letras distintas (A ou B) caracterizam diferença significativa ($p \leq 0,05$, teste de Kruskal-Wallis) entre os grupos de patogenicidade.

Os grupos com cepas de patogenicidade baixa e alta diferiram significativamente ($p \leq 0,05$) entre si na média das DL_{50} , ao passo que o grupo intermediário não diferiu dos demais. Os dados mostram que o modelo com *G. mellonella* conseguiu distinguir mais facilmente cepas com patogenicidades que se apresentam nos extremos (baixa e alta patogenicidade). Jonsson *et al.* (2016) já haviam utilizado o parâmetro DL_{50} na análise comparativa da patogenicidade de isolados EAEC. Os pesquisadores evidenciaram que a cepa 042, que experimentalmente já havia demonstrado provocar diarreia em voluntários humanos, teve a menor DL_{50} ($1,11 \times 10^4$

UFC) entre as seis cepas testadas. Em avaliação semelhante, Alghoribi *et al.* (2014) apontaram diferenças de patogenicidade entre isolados UPEC, com sequências genéticas distintas, por meio dos valores de DL₅₀ encontrados nos ensaios de inoculação. Importante destacar que em nenhum desses estudos os pesquisadores correlacionaram os resultados com outros modelos animais (por exemplo, mamíferos).

Na Tabela 6, as cepas APEC foram agrupadas a partir da estratificação das DL₅₀ obtidas nos ensaios de inoculação, comparando-se ainda as médias dos valores de IP e DL₅₀ entre os grupos.

Tabela 6 – Análise comparativa da patogenicidade das cepas APEC a partir da estratificação dos valores de DL₅₀ individuais.

DL ₅₀ (log ₁₀ , UFC)		Cepas APEC (patogenicidade)			IP ¹
Estratificação	Média	B (n=15)	I (n=10)	A (n=15)	
≤ 3,99	3,71±0,23 ^A	1/5	0/5	4/5	6,78±3,4
4 a 4,99	4,47±0,35 ^{AC}	1/7	4/7	2/7	4,32±3,0
5 a 5,99	5,39±0,27 ^{BC}	4/17	5/17	8/17	5,06±2,8*
6 a 6,99	6,39±0,30 ^B	7/9	1/9	1/9	2,42±2,5*
≥ 7	7,24±0,02 ^B	2/2	0/2	0/2	1,74±0,1

Legenda: DL₅₀= dose letal 50%; B= baixa, IP ≤ 1,99; I= intermediária, IP 2 a 4,99; A= alta, IP 5 a 10; IP= índice de patogenicidade; DL₅₀ e IP= dados expressos como média±desvio padrão).

Letras distintas (A, B ou C) na mesma coluna caracterizam diferença significativa (p≤0,05, teste de Kruskal-Wallis) entre as médias dos grupos.

*p= 0,095 (teste de Kruskal-Wallis) na comparação de médias entre os dois grupos (estratos) de IP.

Analisando a Tabela 6 a partir da perspectiva de classificação da patogenicidade por estratos, pode-se afirmar que cepas APEC com DL₅₀ ≤ 3,99 log UFC têm alta probabilidade (4/5, 80%) de serem muito patogênicas, enquanto que cepas com valores entre 4 e 5,99 log UFC têm alta probabilidade de serem de patogenicidade intermediária a alta (19/24, 79%). Destas, 21% podem ser de baixa, 37,5% de intermediária e 41,5% de alta patogenicidade. Cepas com DL₅₀ ≥ 6 log UFC podem ser classificadas como de baixa patogenicidade com uma alta probabilidade de acerto (9/11, 81,8%). Considerando estes critérios de classificação (por estratos de DL₅₀), o resultado da caracterização grupal das cepas APEC teria como diagnóstico no modelo de infecção *in vivo* com *G. mellonella*: 22,5% (9/40) baixa, 47,5% (19/40) intermediária a alta e 30% (12/40) alta patogenicidade. Para efeito comparativo, no modelo em pintos de um dia de idade tivemos a seguinte distribuição: 37,5% (15/40) baixa, 25% (10/40) intermediária e 37,5% (12/40) alta patogenicidade.

Os dados de DL_{50} evidenciaram que os modelos (pintos vs larvas) tiveram boa correlação quando os extremos foram analisados, com menor grau de associação quando cepas com características intermediárias de patogenicidade foram testadas. Os resultados demonstraram que se deve ter precaução no uso da DL_{50} como variável isolada para determinação da patogenicidade individual de cepas APEC, pois uma vez que a associação é fraca, o modelo pode conter muitos erros. A análise da mortalidade de larvas associada aos resultados de outras variáveis de resposta pode eventualmente melhorar a correlação entre os modelos (inseto e aves).

5.5.2 Avaliação de melanização

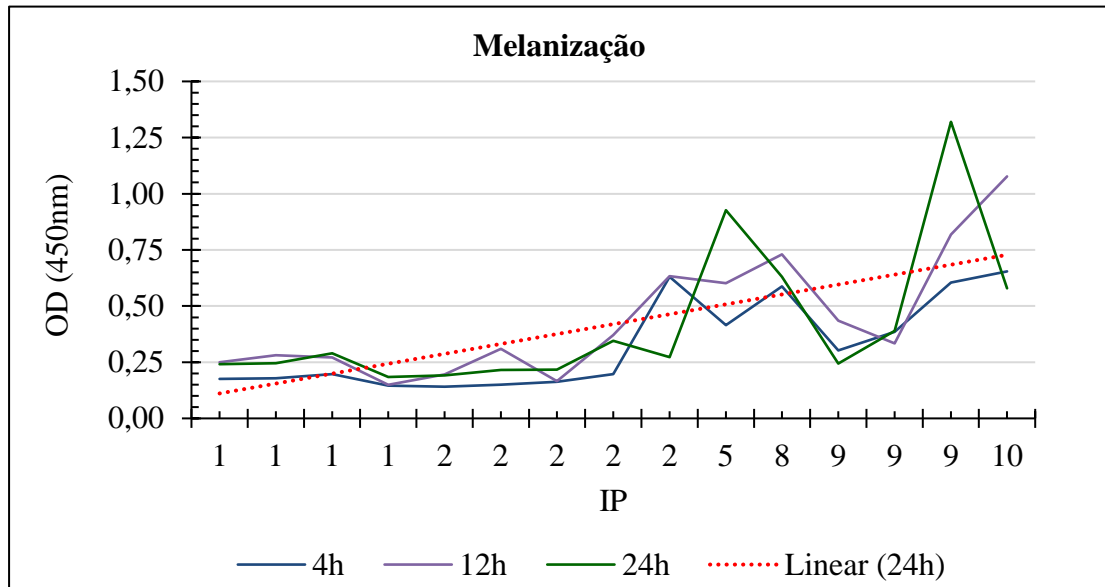
Em resposta à infecção bacteriana, o sistema imunológico da *G. mellonella* forma nódulos melanóticos, cuja formação é regulada por moléculas sinalizadoras denominadas eicosanóides. Os nódulos se formam quando hemócitos do inseto degranulam após contato com bactérias, seguido pela ativação da cascata de pro-fenoloxidase, que resulta na formação de melanina ao redor da bactéria. Subsequentemente, uma cápsula se forma ao redor das bactérias sequestradas no nódulo em desenvolvimento, devido à fixação e à disseminação de mais hemócitos. Na sequência, dá-se início a atividade fagocitária para destruir e remover as bactérias e os restos celulares (SHAURUB, 2012; ZDYBICKA-BARABAS *et al.*, 2014). No presente estudo, essa resposta imune foi avaliada com o objetivo de se verificar o nível de associação existente entre a patogenicidade (IP) de isolados APEC e a intensidade da melanização induzida pela infecção *in vivo* das larvas.

Os primeiros testes de melanização foram realizados com apenas 15 isolados APEC, previamente selecionados de maneira aleatória, pois o objetivo inicial era definir o melhor momento (4, 12 e 24h pós-inoculação) para a avaliação. Na Figura 11 são apresentados os dados obtidos nos ensaios de quantificação da melanização da hemolinfa (avaliação *in vitro*), após a inoculação das larvas de *G. mellonella*.

No decorrer dos testes de melanização realizados, algumas larvas desafiadas morreram entre os intervalos das coletas de hemolinfa, mesmo tendo sido inoculadas com doses subletais (10^4 UFC/larva). Imediatamente após a morte da larva, a hemolinfa passa por um processo de coagulação, impossibilitando a sua amostragem. Uma vez que todas as larvas mortas sempre apresentaram forte grau de melanização, determinada por análise visual da cor da larva, foi atribuído a elas um valor padrão de melanização ($OD_{450nm}=0,541$), equivalente ao valor médio de OD encontrado na espectrofotometria da hemolinfa de larvas com máxima melanização

(avaliação visual). Este procedimento foi adotado para que o número de larvas amostradas não diferisse significativamente do planejado.

Figura 11 – Níveis de melanização *in vitro* da hemolinfa de larvas de *G. mellonella* desafiadas com cepas APEC, de diferentes graus de patogenicidade, obtidos às 4, 12 e 24h pós-inoculação.



Legenda: IP= índice de patogenicidade das cepas APEC determinado em pintos de um dia de idade; Mel= melanização da hemolinfa. OD= densidade óptica determinada por espectrofotômetro (cumprimento de onda de 450nm) às 4, 12 e 24 horas pós-inoculação; Equação das retas: 4h, $y=0,035x + 0,0484$, $R^2=0,6142$; 12h, $y=0,0469x + 0,0664$, $R^2=0,5927$; 24h, $y=0,0441x + 0,0669$, $R^2=0,5685$; o pontilhado indica a linha de tendência geral dos dados, considerando os três períodos de tempo (4, 12 e 24h).

Os resultados evidenciaram que a maioria das cepas APEC foram capazes de desencadear a melanização da hemolinfa, sendo, em geral, de maior intensidade naquelas larvas inoculadas com isolados mais patogênicos. Como pode ser visualizado na Tabela 7, a correlação entre os valores de melanização e o IP das cepas APEC apresentou sentido positivo (quanto maior a patogenicidade, maior a melanização) e forte associação entre as variáveis (valores do coeficiente de Spearman entre 0,7 e 0,9, com $p \leq 0,05$). Quando se comparou os períodos de avaliação (4, 12 e 24h), não foi encontrada diferença significativa ($p > 0,05$) entre as médias dos valores de melanização da hemolinfa (0,329, 0,441 e 0,420, respectivamente).

Tabela 7 – Dados da melanização das larvas desafiadas com cepas APEC, obtidos por meio da avaliação *in vitro* da hemolinfa coletada às 4, 12 e 24h pós-inoculação.

Melanização (n=15 APEC)	OD _{450nm} *		
	4h	12h	24h
Média	0,329	0,441	0,420
Desvio padrão	0,200	0,272	0,323
Mínima	0,141	0,150	0,184
Máxima	0,654	1,077	1,320
ρ (IP vs Mel.)	0,764	0,800	0,754

Legenda: *OD= densidade óptica determinada por espectrofotômetro (cumprimento de onda de 450nm) às 4, 12 e 24 horas pós-inoculação; ρ (rho)= coeficiente de correlação de Spearman; IP= índice de patogenicidade das cepas APEC determinado em pintos de um dia de idade; Mel= melanização da hemolinfa.

Não houve diferença significativa ($p>0,05$, teste ANOVA) entre os períodos de tempo (4, 12 e 24h), pós-inoculação das larvas com as cepas APEC.

A Tabela 8 mostra a análise comparativa entre as médias de melanização *in vitro* entre os grupos de patogenicidade, de acordo com o IP definido no modelo com aves.

Tabela 8 – Análise comparativa entre os valores de melanização encontrados nas larvas desafiadas com cepas APEC, de acordo com o grupo de patogenicidade.

Patogenicidade	n	Melanização (OD _{450nm})		
		4 h	12h	24h
Controle -	8	0,176±0,011 ^A	0,203±0,006 ^A	0,243±0,046 ^A
Baixa (IP ≤ 1,99)	8	0,169±0,008 ^{Aa}	0,249±0,027 ^{Ab}	0,241±0,019 ^{Ab}
Intermediária (IP 2 a 4,99)¹	2	0,523±0,107	0,617±0,016	0,599±0,327
Alta (IP ≥ 5)	5	0,507±0,069 ^B	0,679±0,134 ^B	0,633±0,185 ^B

Legenda: OD= densidade óptica determinada por espectrofotômetro (cumprimento de onda de 450nm) às 4, 12 e 24 horas pós-inoculação; IP= índice de patogenicidade das cepas APEC determinado em pintos de um dia de idade.

¹ O grupo de patogenicidade intermediária não foi considerado, para efeitos de comparação de médias, por apresentar somente duas cepas APEC.

Letras distintas (a ou b) na mesma linha caracterizam diferença significativa ($p\leq 0,05$, teste de Kruskal-Wallis) entre os períodos de tempo (4, 12 e 24h) pós-inoculação das larvas com as cepas APEC.

Letras distintas (A ou B) na mesma coluna caracterizam diferença significativa ($p\leq 0,05$, teste de Kruskal-Wallis) entre os grupos de patogenicidade.

Os resultados obtidos com a avaliação comparativa entre os grupos de patogenicidade corroboraram numericamente com o evidenciado na análise de correlação, pois um maior nível de melanização foi induzido na hemolinfa das larvas quando estas foram desafiadas por cepas de patogenicidade elevada, e vice-versa. Desta forma, a variável melanização se configura em

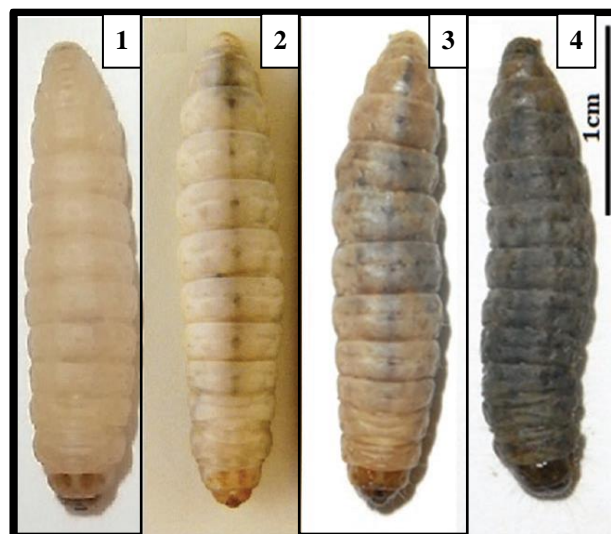
um critério importante de avaliação no modelo proposto para a caracterização da patogenicidade de isolados APEC.

Considerando-se que as médias de melanização *in vitro* e a correlação com a patogenicidade das cepas APEC, determinada em pintos de um dia de idade, foram significativamente semelhantes entre os três períodos de avaliação (Tabela xx), convencionou-se que a determinação da melanização da hemolinfa das larvas, nos testes de desafio subsequentes, seria realizada às 24h pós-inoculação. Recentemente, Chen e Keddie (2021) também adotaram o período de 24h pós-inoculação como o momento para a avaliação da melanização de larvas inoculadas com isolados EPEC.

5.5.2.1 Melanização *in vitro* vs *in vivo*

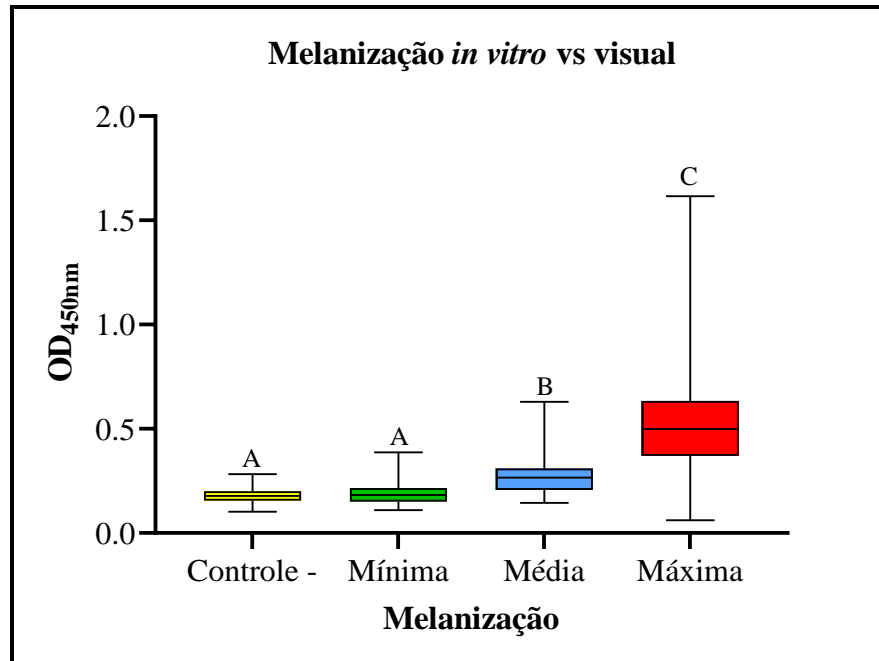
A amostragem da hemolinfa para avaliação do nível de melanização das larvas de *G. mellonella* é um procedimento que dispense tempo considerável para ser executado e requer que as larvas em estudo sejam sacrificadas, impossibilitando análises subsequentes (por exemplo, taxa de mortalidade, curva de sobrevivência, formação de casulo, atividade larval, entre outros). Com a finalidade de buscar um método alternativo, definiu-se um modelo de avaliação visual do nível de melanização (Figura 12), seguindo o proposto por Loh *et al.* (2013), uma vez que as larvas adquirem coloração escura por depositarem melanina pelo corpo. Os dados obtidos foram comparados e podem ser observados na Figura 13.

Figura 12 – Parâmetro visual para intensidade de melanização em larvas de *G. mellonella*.



Legenda: 1, sem melanização; 2, mínima; 3, média; e, 4, máxima.
Fonte: Chen e Keddie (2021).

Figura 13 – Dados de melanização das larvas quando avaliadas pelo método visual e com valor *in vitro* correspondente (espectrofotometria).



Legenda: OD_{450nm} = densidade óptica determinada por espectrofotômetro (comprimento de onda de 450nm); Controle -= hemolinfa de larvas inoculadas com PBS ($n=68$); mínima, $n=83$; média, $n=56$; máxima, $n=68$.

Letras distintas (A, B ou C) caracterizam diferença significativa ($p \leq 0,05$, teste de Tukey) entre os grupos.

Interessante observar que, nas avaliações visuais, a melanização é inicialmente percebida na região dorsal, através da cutícula (Figura 12). Segundo Sigle e Hillyer (2016), a melanização ocorre primeiro ao redor do vaso dorsal, provavelmente como resultado do acúmulo de partículas melanizadas ao redor dos óstios (válvulas) do vaso dorsal, pelo movimento da hemolinfa e subsequente fagocitose por hemócitos periostiais sésseis.

Os resultados obtidos nas análises revelaram que a melanização classificada como mínima na avaliação visual não diferiu significativamente ($p > 0,05$) do grupo controle negativo (larvas inoculadas com solução salina). Possivelmente o nível de indução de resposta celular, desencadeada com o desafio por cepas de baixa patogenicidade, foi insuficiente para ser detectável por espectrofotometria. Com base nos dados encontrados nos ensaios, padronizaram-se três níveis de melanização para uso no método de avaliação visual:

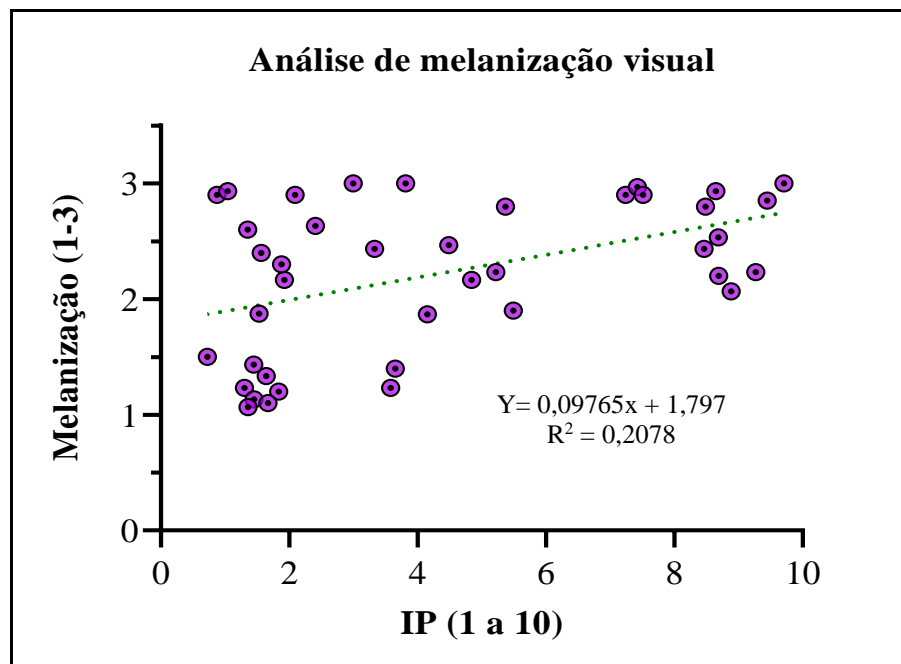
- 1) sem ou mínima – larva com coloração creme ou levemente escura, com até três manchas pretas na região dorsal;
- 2) média – larva com coloração moderadamente escura, geralmente com mais de três manchas pretas na região dorsal;
- 3) máxima – larva com superfície de coloração preta ou marrom escuro.

A classificação é semelhante à sugerida por Loh e colaboradores (2013), com a diferença de que as larvas com ausência de melanização e mínima melanização ficam agrupadas em uma mesma categoria. Além de não ter sido observada diferença significativa na análise *in vitro*, a avaliação visual de larvas com alterações pouco perceptíveis na melanização pode agregar erros ao método, comprometendo a repetibilidade e a reprodutibilidade. Chen e Keddie (2021) classificaram a melanização em somente duas categorias: escore 0, sem melanização ou leve; e, escore 1, melanização moderada a severa. Considerando os resultados do presente trabalho, os critérios adotados por Chen e Keddie (2021) não parecem ser adequados.

5.5.2.2 Associação entre a resposta de melanização e o IP dos isolados APEC

Como a avaliação da melanização *in vivo* mostrou ter significância estatística na comparação de médias entre as categorias de melanização (Figura 13), optou-se por analisar a hemolinfa das larvas inoculadas com as 40 cepas APEC por meio deste método. Na Figura 14 são apresentados os dados obtidos nos experimentos de inoculação, destacando-se que a melanização das larvas se refere ao período de 24h pós-infecção.

Figura 14 – Avaliação visual da melanização de larvas de *G. mellonella* 24h após inoculação com isolados APEC e a associação com o IP.

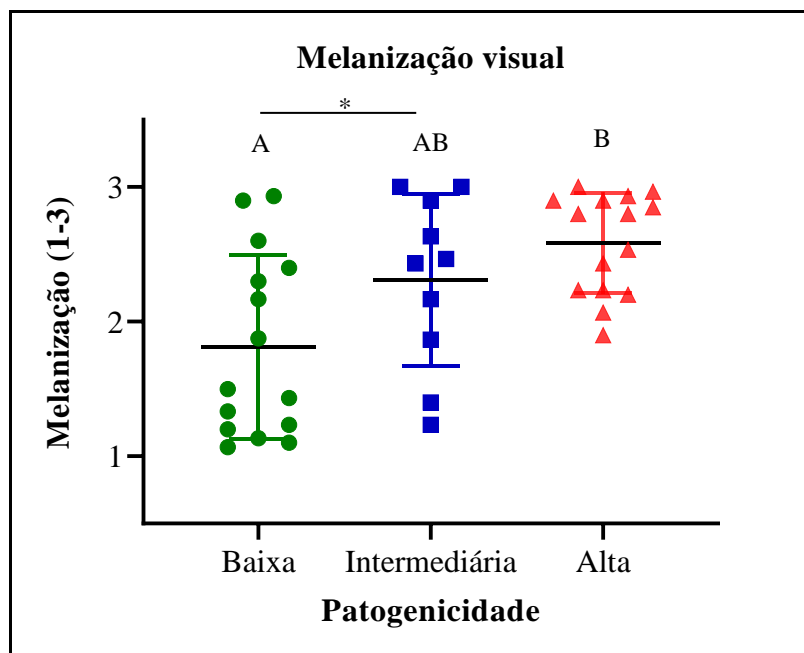


Legenda: IP= índice de patogenicidade das cepas APEC em aves. Linha pontilhada representa a tendência dos dados.

A análise dos dados obtidos revelou uma correlação positiva, porém fraca (0,456, $p=0,003$, coeficiente de Spearman) entre a melanização das larvas (determinada por meio de escore visual) e o IP dos isolados APEC. O nível de associação foi consideravelmente menor quando comparado ao encontrado na análise de melanização *in vitro* (0,754, coeficiente de Spearman) (Tabela 7). Embora os experimentos *in vitro* tenham sido realizados com apenas 15 cepas APEC, os dados encontrados sugerem que possivelmente há perda no poder de discriminação do teste de melanização visual, quando utilizado na caracterização da patogenicidade individual de APEC.

A comparação de médias dos escores de melanização *in vivo* entre os três grupos de patogenicidade APEC são mostrados na Figura 15.

Figura 15 – Comparação de médias dos dados de melanização visual entre os grupos de patogenicidade APEC.



Legenda: patogenicidade das APEC = baixa ($IP \leq 1,99$), intermediária ($IP 2$ a $4,99$) e alta ($IP \geq 5$).

Letras distintas (A ou B) caracterizam diferença significativa ($p \leq 0,05$, teste de Kruskal-Wallis) entre os grupos. * $p=0,065$.

A análise comparativa dos dados de melanização visual das larvas desafiadas entre os três grupos de patogenicidade revelou resultados semelhantes aqueles encontrados na comparação de dados da melanização *in vitro* (Tabela 8, $n=15$), em que as cepas APEC de alta patogenicidade induziram um nível de melanização significativamente ($p \leq 0,05$) maior que as de baixa patogenicidade. O grupo de patogenicidade intermediária não diferiu dos demais, mas apresentou tendência ($p=0,065$) de provocar um maior grau de melanização que as cepas de

baixo IP. De acordo com Senior *et al.* (2011), que estudaram infecções de larvas com *Campylobacter jejuni*, a cor do corpo da larva indica a progressão de uma infecção, ao passo que se correlaciona positiva e significativamente com a carga microbiana na cavidade do corpo (quanto mais escura a cor, maior o número de células microbianas). Desta forma, cepas mais patogênicas, possivelmente por terem uma maior capacidade de proliferação no corpo da larva, induzem um maior nível de melanização. Os resultados de melanização observados no presente trabalho vão ao encontro daqueles relatados por outros pesquisadores. Chen e Keddie (2021), estudando a resposta imune de larvas de *G. mellonella* frente à infecções bacterianas, concluíram que a melanização larval pode ser utilizada como um indicador visual para avaliar a virulência de isolados EPEC, uma vez que o grau de melanização foi positivamente associado à mortalidade, negativamente associado ao tempo de sobrevivência e positivamente associado ao tempo de pupação. Wand *et al.* (2013) avaliaram a resposta de *G. mellonella* à infecção por diversas cepas de *Klebsiella pneumoniae* e relataram que cepas que estimularam baixos níveis de melanização apresentaram certa atividade inicial do sistema PO, após 60min, mas essa atividade não se manteve após 4h, enquanto que cepas mais virulentas apresentaram um aumento significativo nos níveis de atividade PO quando comparado ao grupo controle.

Os dados obtidos neste estudo revelaram ainda que alguns isolados APEC de baixa patogenicidade induziram elevada melanização nas larvas inoculadas, o que de certa forma era esperado que ocorresse. Segundo Held *et al.*, (2007), diversos estudos já demonstraram que os nódulos de melanização nos insetos se formam tanto em resposta a infecções não letais, quando as bactérias são mortas e eliminadas com sucesso pelo organismo, quanto em resposta a componentes celulares exógenos, não próprios. Isso significa dizer que nem toda a melanização induzida nos ensaios de inoculação com APEC está diretamente associada à patogenicidade da bactéria.

Os resultados deste trabalho sugerem que a melanização pode ser utilizada como parâmetro para a caracterização da patogenicidade de isolados APEC, tendo em vista a associação estatisticamente significativa com o IP determinado em aves, mas não como variável de resposta analisada de forma isolada.

5.5.3 Lesão celular (citotoxicidade)

A enzima lactato desidrogenase (LDH), detectada no teste de citotoxicidade, é liberada das células durante a apoptose, por isso, vem sendo utilizada como um marcador de dano celular (WAND *et al.*, 2013). O seu uso nos ensaios de desafio *in vivo* teve como objetivo quantificar,

na hemolinfa da larva da traça de *G. mellonella*, o dano celular provocado pelas cepas APEC, com a hipótese de que quanto maior a patogenicidade da cepa, maior o nível de lesão celular gerado. Os dados obtidos são mostrados na Tabela 9, de acordo com cada período de avaliação.

Inicialmente, os testes foram realizados utilizando o reagente mercaptoetanol (inibidor do processo de melanização), junto ao tampão de IPS, no entanto, foi observada reação inespecífica do produto com o substrato do kit comercial. Esta reação provocou aumento na intensidade da cor e elevou os valores de OD, de todas as hemolinfas amostradas, a níveis não quantificáveis, inviabilizando a análise. A alternativa foi retirar o reagente mercaptoetanol do tampão IPS.

Tabela 9 – Quantificação da enzima lactato desidrogenase (LDH) na hemolinfa de larvas desafiadas com cepas APEC.

Patogenicidade	n	Citotoxicidade (OD _{490nm})*		
		4h	12h	24h
Controle -	8	1,807±0,262	1,830±0,169	2,095±0,186
Baixa (IP ≤ 1,99)	8	1,494±0,088 ^a	1,552±0,045 ^a	1,882±0,050 ^b
Intermediária (IP 2 a 4,99)	2	1,565±0,063	1,813±0,215	2,069±0,381
Alta (IP ≥ 5)	5	1,723±0,113 ^a	1,914±0,133 ^{ab}	2,426±0,117 ^b

Legenda: OD = densidade óptica; IP= índice de patogenicidade das cepas APEC determinado em pintos de um dia de idade; Dados expressos em média±erro padrão.

Letras distintas (a ou b) na mesma linha caracterizam diferença significativa ($p \leq 0,05$, teste de Kruskal-Wallis) entre os períodos de tempo (4, 12 e 24h) pós-inoculação das larvas com as cepas APEC;

Não houve diferença significativa ($p > 0,05$, teste de Kruskal-Wallis) entre as médias dos grupos de patogenicidade, em nenhum dos períodos avaliados.

Os resultados não mostraram diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos desafiados e o controle negativo (larvas inoculadas com solução salina estéril). As hemolinfas das larvas do grupo controle inclusive apresentam numericamente um maior valor de OD, ao contrário do esperado. A hipótese para explicar estes resultados é que durante a etapa do teste de citotoxicidade em que as amostras de hemolinfa ficaram incubadas à temperatura ambiente (por 30min), para reação do substrato, ocorreu em paralelo a formação de melanina no meio (tampão IPS sem mercaptoetanol). Vale lembrar que a cascata de sinalização celular que provoca a formação da melanina na hemolinfa das larvas ocorre em um curto espaço de tempo. De acordo com Harding *et al.* (2013), para evitar que a hemolinfa fique escura e coagule, ela deve ser processada dentro de 10min após a coleta. Cepas de maior patogenicidade induzem uma melanização mais intensa na hemolinfa das larvas (Figura 15) e isso pode explicar as

maiores médias de OD no ensaio de citotoxicidade naqueles grupos com cepas APEC com IP superior.

Ciesielczuk *et al.* (2015) também não obtiveram resultados satisfatórios na análise de citotoxicidade da hemolinfa de larvas coletadas 4h após o desafio com ExPEC, embora tenham usado outro inibidor da melanização, o N-feniltioureia. Os pesquisadores revelaram que mesmo utilizando LDH como marcador, é difícil determinar se esse dano celular é devido a fatores de virulência específicos ou múltiplos, ou a uma resposta imune avassaladora à infecção. Além disso, não está claro quão bem a densidade óptica corresponde ao dano celular e a quantidade de LDH liberada. Em contraponto, Wand *et al.* (2013) utilizaram o mesmo kit comercial (Cyto Tox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay - Promega), para avaliar a enzima LDH na hemolinfa de larvas de *G. mellonella* inoculadas com *Klebsiella pneumoniae*, e não relataram problemas na quantificação. A única diferença observada entre as metodologias aplicadas foi que Wand *et al.* (2013) usaram PBS estéril para diluição (1:10) da hemolinfa na etapa de pré-análise ao invés do IPS. Os autores afirmaram que para a análise de cepas de *K. pneumoniae* a LDH era o melhor marcador de virulência no modelo de *G. mellonella*, o que não foi visto no presente estudo.

Outro achado importante foi o aparecimento de amostras de hemolinfa de coloração cinza e de aspecto turvo (opaco), nas larvas desafiadas com cepas APEC de maior patogenicidade. Importante destacar que esses achados possivelmente não estavam associados a erros de coleta, quando o ato de pressionar a larva para extração da hemolinfa pode romper determinados órgãos. Acredita-se que a alteração na hemolinfa se deve a resíduos celulares e teciduais, por consequência de lesões em órgãos internos provocadas pela infecção bacteriana por APEC. Essas alterações na hemolinfa possivelmente conferem certo grau de erro sobre os resultados do ensaio de citotoxicidade, por interferir no valor de OD obtido por espectrofotometria.

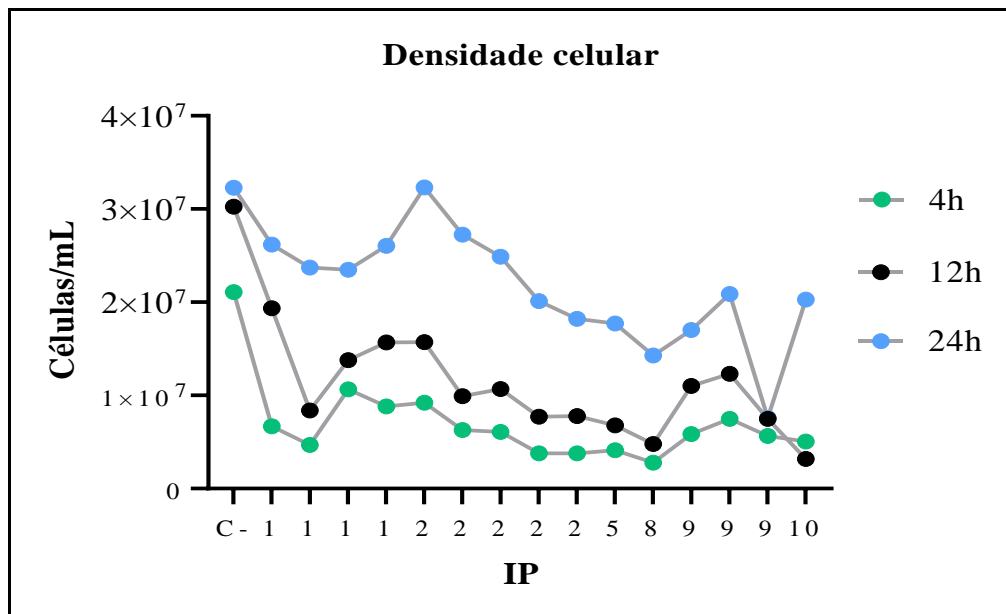
Concluídos os ensaios e analisando os resultados obtidos, pode-se afirmar que os ensaios de citotoxicidade ficaram severamente comprometidos sem a presença de um inibidor da melanização como parte constituinte dos reagentes. Somando-se isto à perda de amostras com a morte de larvas no intervalo de tempo entre a inoculação e o momento da coleta (principalmente às 12 e 24h pós-inoculação) e à ocorrência de hemolinfas com aspecto turvo, conclui-se que o teste de quantificação da LDH não contém os requisitos necessários para ser utilizado na caracterização da patogenicidade de cepas APEC.

5.5.4 Densidade celular da hemolinfa

Larvas de *G. mellonella* inoculadas com cepas APEC foram avaliadas quanto ao nível de densidade celular na hemolinfa e os dados encontrados são mostrados na Figura 16. O ensaio não diferenciou as células componentes da hemolinfa (hemócitos).

De acordo com Bergin, Brennan e Kavanagh (2003), ao avaliarem a hemolinfa de larvas de *G. mellonella* inoculadas com fungos, flutuações na densidade de hemócitos podem fornecer informações sobre a resposta imune celular e a proliferação do patógeno no hospedeiro, podendo ser utilizadas como indicador da patogenicidade.

Figura 16 – Densidade celular (concentração de hemócitos) na hemolinfa de larvas de *G. mellonella* às 4, 12 e 24h pós-desafio com isolados APEC.



Legenda: IP= índice de patogenicidade das cepas APEC ($n=15$); C-= controle negativo (larvas inoculadas com solução salina estéril). 4, 12 e 24h = períodos de avaliação pós-inoculação.

Na Tabela 10, pode-se observar os resultados de densidade celular agrupados de acordo com o IP das cepas APEC, determinado em pintos de um dia de idade.

Tabela 10 – Análise da densidade celular (total de hemócitos/mL) da hemolinfa de larvas desafiadas com cepas APEC de patogenicidade variável.

Patogenicidade	n	Densidade celular (hemócitos/mLx10 ⁷)		
		4 h	12h	24h
Controle -	8	21,0±2,87 ^A	30,26±3,86 ^A	32,30±3,05 ^A
Baixa (IP ≤ 1,99)	8	7,03±0,83 ^{Ba}	12,65±1,46 ^{ABab}	25,50±1,25 ^{ABc}
Intermediária (IP 2 a 4,99)	2	3,96±0,16 ^B	7,29±0,51 ^B	17,95±0,25 ^{AB}
Alta (IP ≥ 5)	5	5,36±0,76 ^{Ba}	7,76±1,75 ^{Bab}	16,01±2,41 ^{Bb}

Legenda: OD = densidade óptica; IP= índice de patogenicidade das cepas APEC determinado em pintos de um dia de idade. Dados expressos em média±erro padrão.

Letras distintas na mesma coluna (A ou B), ou na mesma linha (a, b ou c), caracterizam diferença significativa ($p \leq 0,05$, teste de Kruskal-Wallis) entre os grupos experimentais (períodos de tempo e graus de patogenicidade, respectivamente).

Além da barreira estrutural formada pela cutícula da larva, a *G. mellonella* monta uma resposta imune multifacetada quando desafiada por patógenos (KAVANAGH; REEVES, 2004). Os insetos não possuem uma resposta imune adaptativa, mas possuem um sistema imunológico inato que se baseia em fatores de reconhecimento, que os protegem de forma eficaz e rápida quando há infecção por microrganismos e parasitas. Este sistema inclui componentes celulares e humorais que podem ser ativados pela invasão de corpos estranhos, incluindo patógenos (HOFFMANN *et al.*, 1995). Os hemócitos formam o componente celular dessa defesa e podem reagir de três maneiras diferentes contra os patógenos: fagocitose, formação de nódulos ou encapsulamento (SHAURUB, 2012). Bergin, Brennan e Kavanagh (2003) já relataram que a densidade de hemócitos na hemolinfa varia durante a vida do inseto, mas também em resposta à introdução de patógenos.

Pela contagem total de células (Tabela 10), observou-se que as larvas de *G. mellonella* desafiadas apresentaram uma concentração média de hemócitos livres na hemolinfa, nas primeiras 4h pós-desafio, significativamente ($p \leq 0,05$) menor em comparação ao grupo controle (larvas inoculadas com solução salina estéril). A concentração de hemócitos aumentou às 12h e atingiu os maiores valores ao final das 24h, quando se aproximou dos valores médios do grupo controle. A menor concentração celular nas primeiras 4h foi semelhante nos três grupos de larvas desafiadas. Passadas 12h, as larvas inoculadas com cepas APEC de baixa patogenicidade já não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) em comparação com o grupo controle, enquanto que às 24h pós-inoculação, somente o grupo que foi desafiado com cepas de alta patogenicidade ainda apresentava menor densidade celular. Os resultados encontrados foram

na contramão do esperado, sendo que a hipótese inicial era de que cepas mais patogênicas induziriam uma maior resposta celular e, por consequência, uma elevada concentração de hemócitos na hemolinfa. Contudo, uma hipótese para os dados encontrados é que larvas desafiadas com cepas APEC mais patogênicas apresentam maior capacidade de proliferação na hemolinfa e, por isso, reagem com um elevado número de hemócitos. Esse processo infeccioso mais severo acaba que por induzir uma resposta imune intensa e prolongada, reduzindo a disponibilidade de hemócitos livres na hemolinfa e, por consequência, uma menor densidade celular. Os hemócitos aglutinados e sequestrados durante a resposta (nodulação e fagocitose) acabam que por não serem encontrados nas análises da hemolinfa.

Importante destacar também que a melanização ocorre durante a resposta de fase aguda (Ciesielczuk *et al.*, 2015). Leuko e Raivio (2012) para entender como EPEC poderia causar a morte de larvas de *G. mellonella*, realizaram inoculações com a cepa E2348/69 marcada com uma proteína fluorescente verde (GFP) e, em seguida, examinaram a hemolinfa e tecidos dissecados das larvas através de microscopia de fluorescência. Os pesquisadores verificaram que às 18h pós-infecção já não haviam bactérias intra ou extracelularmente na hemolinfa das larvas amostradas. Ao dissecar as larvas, com sinais avançados de melanização, observaram muitos nódulos melanóticos, que pela microscopia de fluorescência revelaram conter uma carga densa de bactérias. A partir dos resultados alcançados, os autores sugeriram que a EPEC não permanece dentro da hemolinfa, sendo rapidamente encapsulada em nódulos melanóticos pelo sistema imune da *G. mellonella*.

É amplamente conhecido que os hemócitos participam diretamente desta resposta imune e, portanto, de acordo com a velocidade e a severidade das reações, podem ser rapidamente consumidos durante o processo. Os resultados mostrados na Figura 16 corroboram com esta teoria, pois os dados individuais de cada cepa evidenciaram que a concentração celular na hemolinfa do inseto é menor nas primeiras horas da infecção, mas que aumenta gradativamente com o passar do tempo. Além disso, a intensa resposta celular nas primeiras horas do desafio de certa forma ajuda a explicar o alto percentual de mortalidade observado até 24h pós-desafio, independentemente do IP da cepa APEC inoculada.

Chen e Keddie (2021), ao avaliarem a resposta imune de larvas de *G. mellonella* à infecção por EPEC, identificaram uma hemocitopenia transitória entre 3-6h após as injeções, com a contagem de hemócitos circulantes se recuperando gradativamente até 48h. O declínio acentuado na contagem de hemócitos entre 3-6h, após a injeção com EPEC, coincidiu com o declínio acentuado no número de EPEC circulantes, sugerindo a remoção de EPEC da hemolinfa por nodulação. Tanto os plasmatócitos quanto os granulócitos participam da

nodulação e a maioria dos nódulos em *G. mellonella* deixa a circulação e se fixa às superfícies dos tecidos na hemocele. Outros plasmatócitos que não participam da nodulação também podem se associar aos tecidos na hemocele e permanecer fora de circulação. A coagulação da hemolinfa provavelmente contribui para a hemocitopenia ao imobilizar hemócitos junto com células bacterianas. De acordo com os pesquisadores, a depuração, eliminação da EPEC circulante na hemolinfa, ocorreu somente às 48h pós-inoculação, momento correspondente ao aparecimento de partículas e nódulos melanóticos e recuperação da hemocitopenia (reentrada de plasmatócitos sésseis e produção de novos hemócitos - hematopoiese).

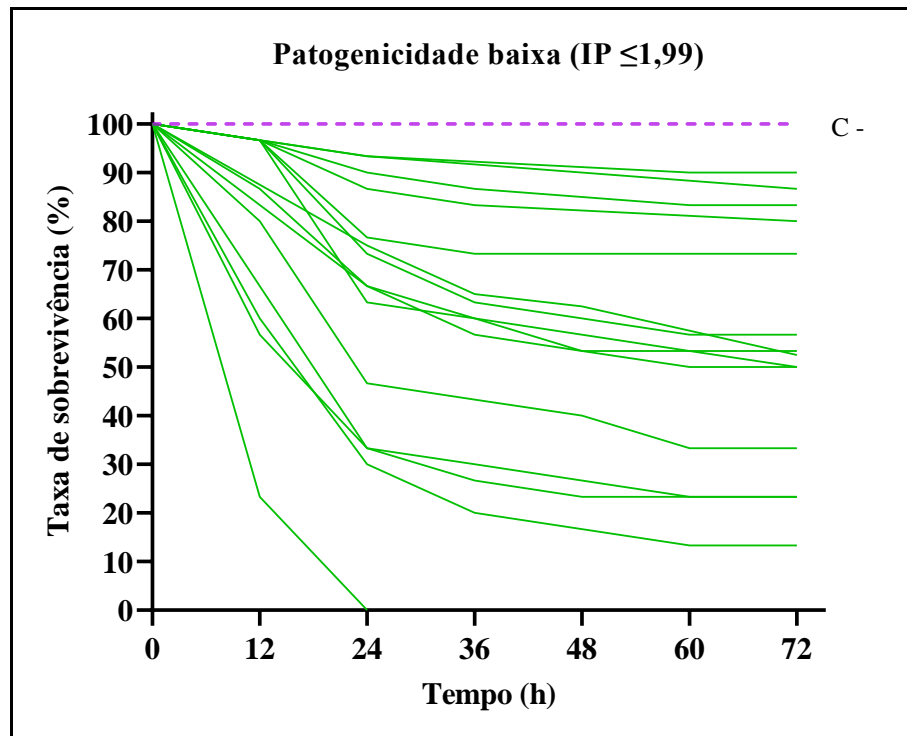
Embora a análise da concentração de hemócitos na hemolinfa possa contribuir para o entendimento das respostas desencadeadas pelas larvas da *G. mellonella* frente aos desafios, o parâmetro não se mostrou uma variável de resposta capaz de distinguir individualmente cepas APEC. Os grupos de patogenicidade não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) entre si na análise comparativa dos valores de densidade celular (Tabela 10). Além disso, larvas mortas no decorrer dos ensaios precisaram ser desconsideradas, tornando-se um viés nas avaliações.

5.5.5 Curva de sobrevivência e taxa de mortalidade

Com base nos dados obtidos em ensaios de inoculação com o patotipo EPEC, Chen e Keddie (2021) concluíram que há pelo menos três resultados potenciais da infecção bacteriana em larvas de *G. mellonella*: 1, a larva elimina a bactéria da hemolinfa e completa o seu ciclo de desenvolvimento; 2, a larva elimina a bactéria, mas morre de qualquer maneira, provavelmente devido a danos irrecuperáveis, provocados pelo patógeno e pelas respostas imunes exacerbadas; e, 3, as respostas imunes da larva falham em controlar a replicação da bactéria e a larva sucumbe à morte por septicemia.

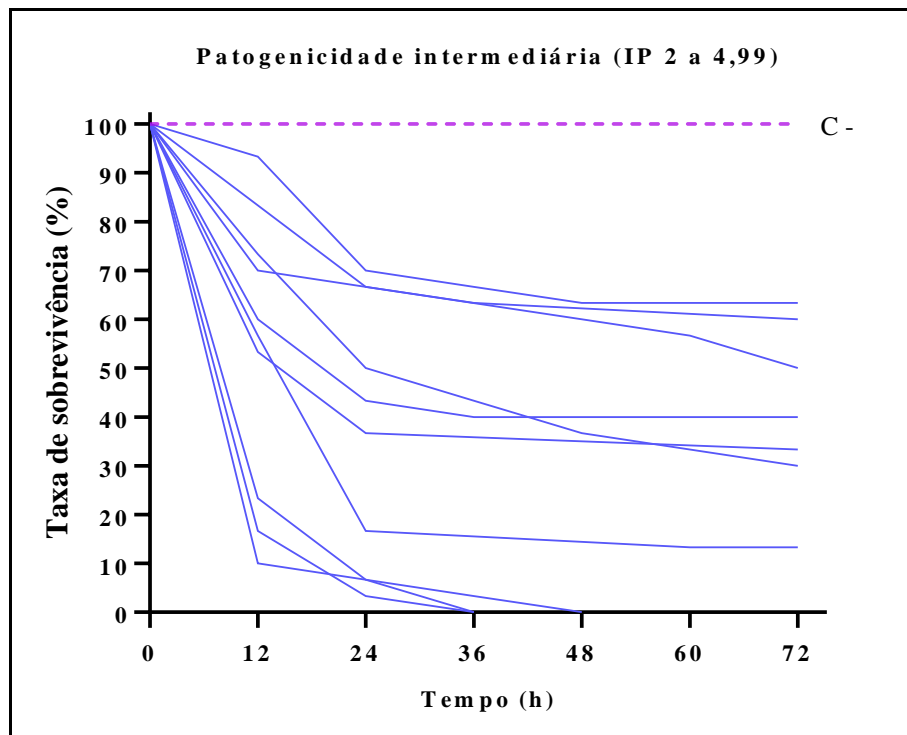
A mortalidade de larvas observada nos ensaios de desafio e contabilizada ao longo das 72h pós-inoculação com as cepas APEC, em intervalos de 12h, foi utilizada na elaboração de curvas de sobrevivência (Figuras 17 a 20 e Apêndice B). Os resultados representam a média de ao menos três ensaios independentes com 10 larvas, por isolado APEC.

Figura 17 – Curvas de sobrevivência das larvas de *G. mellonella* após desafio com cepas APEC de baixa patogenicidade ($n=15$).



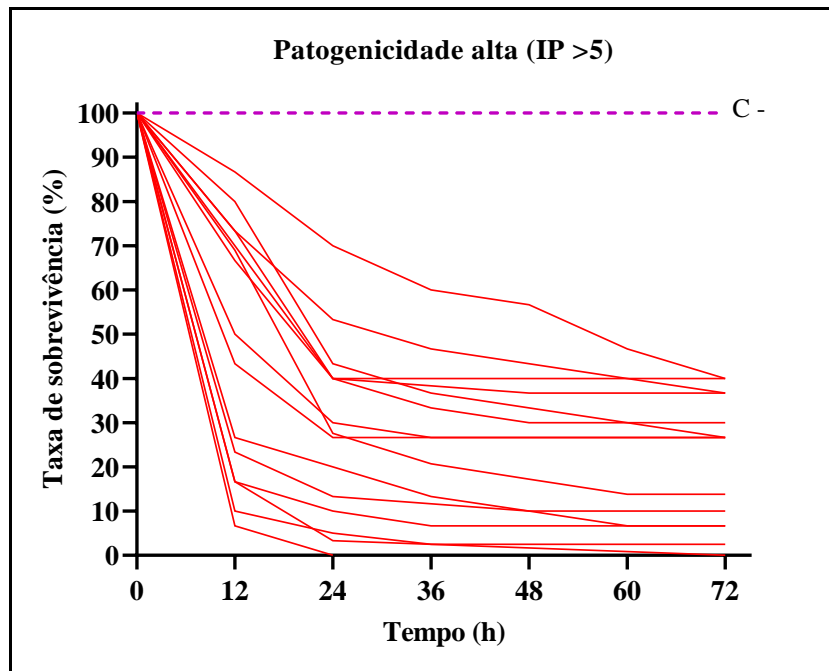
Legenda: dados de sobrevivência das larvas plotados usando o método Kaplan–Meier.

Figura 18 – Curvas de sobrevivência das larvas de *G. mellonella* após desafio com cepas APEC de patogenicidade intermediária ($n=10$).



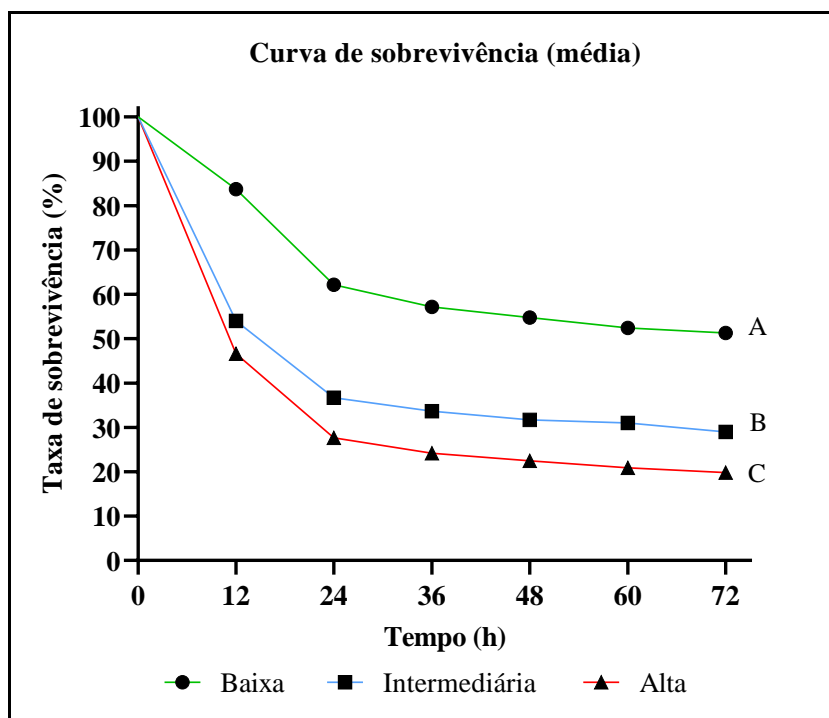
Legenda: dados de sobrevivência das larvas plotados usando o método Kaplan–Meier.

Figura 19 – Curvas de sobrevivência das larvas de *G. mellonella* após desafio com cepas APEC de alta patogenicidade ($n=15$).



Legenda: dados de sobrevivência plotados usando o método Kaplan–Meier.

Figura 20 – Curvas de sobrevivência das larvas de *G. mellonella* elaboradas com base nas taxas de mortalidade médias, após desafio com cepas APEC ($n=40$).



Legenda: patogenicidade das APEC = baixa (IP $\leq 1,99$), intermediária (IP 2 a 4,99) e alta (IP ≥ 5). Dados de sobrevivência das larvas plotados usando o método Kaplan–Meier.

Letras distintas (A, B ou C) caracterizam diferença significativa entre as curvas de sobrevivência ($p \leq 0,05$, teste Log-rank - Mantel-Cox).

A Figura 17 evidencia que as cepas APEC de baixa patogenicidade apresentaram curvas de sobrevivência com perfil mais horizontal, com as mortes das larvas ocorrendo de forma mais branda e gradativa ao longo do tempo. Somente uma APEC de baixa patogenicidade apresentou mortalidade acima de 50% nas primeiras 12 horas pós-inoculação, ao contrário do observado nas cepas de patogenicidade intermediária a alta (Figuras 18 e 19). Estas provocaram mortalidades mais agudas, já nas primeiras horas de infecção, e taxas de mortalidade maiores (acima de 50%) ao final do período de observação (72h). No geral, APEC de patogenicidade intermediária (Figura 18) mostraram mortalidades semelhantes aos grupos de baixa e alta mortalidade.

Na Tabela 11 são mostrados os dados de mortalidade considerando os períodos de avaliação de 24 e 72h pós-desafio e a relação com a patogenicidade do conjunto de cepas APEC testadas. As taxas de mortalidade induzidas pelas cepas APEC e computadas às 12 e 72h pós-inoculação foram as que apresentaram maior correlação (coeficiente de Spearman de 0,450 e 0,442, respectivamente) com a patogenicidade das cepas APEC determinada em pintos de um dia de idade (IP).

Tabela 11 – Análise comparativa da patogenicidade das cepas APEC a partir das taxas de mortalidade, observadas às 12 e 72h pós-inoculação das larvas de *G. mellonella*.

TM (%)	Cepas APEC (patogenicidade)							
	12h				72h			
	B	I	A	IP	B	I	A	IP
0 - 10	9/10	1/10	0/10	1,66±0,76 ^A	1/1	0/1	0/1	1,36
11 - 30	2/9	3/9	4/9	4,96±2,85 ^B	4/4	0/4	0/4	1,56±0,23
31 - 50	3/9	3/9	3/9	4,39±2,95 ^B	5/8	3/8	0/8	2,37±1,45
51 - 70	0/2	0/2	2/2	8,56±0,16 [*]	1/9	3/9	5/9	5,61±2,76
71 - 90	1/9	3/9	5/9	5,32±3,04 ^B	3/9	1/9	5/9	5,13±3,27
91 - 100	0/1	0/1	1/1	9,71 [*]	1/9	3/9	5/9	5,80±3,38
TM média %	16,6	46,0	52,4	-	48,4	71,0	80,1	-

Legenda: TM= taxa de mortalidade; B= baixa, IP ≤ 1,99 (n=15); I= intermediária, IP 2 a 4,99 (n=10); A= alta, IP 5 a 10 (n=15); IP = índice de patogenicidade (dados expressos como média±desvio padrão). *Dados desconsiderados para efeito de comparação de médias.

Letras distintas na mesma coluna (A ou B) caracterizam diferença significativa (p≤ 0,05, teste de Kruskal-Wallis) entre os estratos de TM.

A partir dos resultados visualizados nas curvas de mortalidade e na Tabela 11, pode-se aferir que cepas APEC que apresentam taxas de mortalidade de larvas de *G. mellonella*

inferiores a 10% às 24h e a 50% ao final das 72h têm grande probabilidade de serem de baixa patogenicidade para aves. Das 10 cepas que induziram até 10% de mortalidade nas primeiras 24h, nove (90%) eram de baixa patogenicidade. Do total de cepas que provocaram mortalidade inferior a 50% até 72h, 77% (10/13) eram de baixa patogenicidade, sendo as demais de patogenicidade intermediária (23%, 3/13). Por outro lado, das cepas APEC que provocaram taxas de mortalidade superiores a 70% nas primeiras 24h, 60% (6/10) eram de alta patogenicidade e outras 30% intermediária. Nos casos com mortalidade maior que 50% às 72h, 81,5% eram cepas APEC de intermediária (26%, 7/27) à alta patogenicidade (55,5%, 15/27).

A injeção de inóculos inativados por calor, banho-maria a 80 °C por 90min (segundo o proposto por Peleg *et al.*, 2009b), de 15 cepas APEC, em dois ensaios independentes e com dose de 10^7 UFC/larva, provocou a morte de aproximadamente 6% (18/300) das larvas desafiadas (dados não publicados). Os resultados sugerem um possível efeito tóxico de componentes ou moléculas que compõem a estrutura da célula bacteriana de determinadas cepas APEC. Dados semelhantes foram relatados por Torres, Entwistle e Coote (2016). Ao inocularem larvas de *G. mellonella* com altas concentrações de inóculos inativados por calor, sendo estes constituídos por cepas de *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae*, observaram elevadas taxas de letalidade. Os autores concluíram que as mortes não podiam ser atribuídas apenas à infecção por células vivas, mas também à presença de componentes tóxicos das bactérias mortas. Uma possível explicação sugerida pelos pesquisadores, mas não investigada, é que a toxicidade observada das células mortas pode ser devido à indução de um efeito pró-inflamatório análogo ao observado na sepse por Gram negativas em humanos.

Mukherjee *et al.* (2010) demonstraram que preparações mortas por calor de *L. monocytogenes* podem induzir respostas imunes nas larvas de *G. mellonella* semelhantes às observadas em desafio letal com *Listeria* patogênica. Em contrapartida, Wand *et al.* (2013), ao inocularem suspensões bacterianas mortas de *K. pneumoniae* em *G. mellonella*, não relataram qualquer mortalidade de larvas durante os 5 dias de observação.

Resultados semelhantes foram confirmados por Jonsson *et al.* (2016). Ao injetarem larvas com 6 cepas de EAEC mortas por calor (10^7 UFC/mL), nenhuma morte foi observada para qualquer uma das cepas, sugerindo que foi a EAEC viva, e não o lipopolissacarídeo (LPS), que mediou a morte das larvas. Leuko e Ravio (2012) inocularam larvas com diluições decimais seriadas (0 a 10^5 células) de uma amostra EPEC e outra *E. coli* K-12 (não patogênica) inativadas por calor e não observaram mortes de larvas. Os achados com inóculos inativados demonstram que o crescimento bacteriano dentro das larvas é requerido para provocar as mortes e confirma

que determinadas cepas APEC apresentam atributos-chave de virulência, responsáveis pelas altas taxas de letalidade.

Os dados da variável “taxa de mortalidade” tiveram correlação com o IP das APEC semelhante ao encontrado nas análises da DL₅₀. Ambas demonstraram ser úteis na caracterização de isolado apatogênicos e de alta patogenicidade. Em paralelo, curvas de mortalidade podem ser construídas e comparadas para melhor demonstrar o efeito de cepas controle (por exemplo, cepas que provocam baixa e alta mortalidade) e selvagens (amostras de campo com patogenicidade desconhecida).

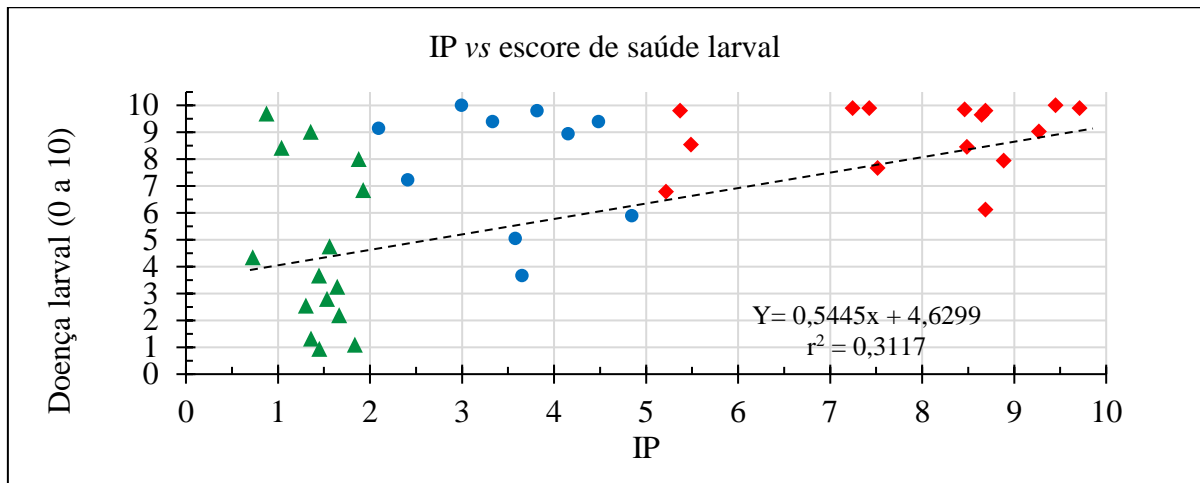
5.5.6 Escore de doença larval

As larvas de *G. mellonella*, ao serem inoculadas com suspensões bacterianas, demonstram sinais de alteração no seu comportamento normal. Desta forma, Loh *et al.* (2013) sugeriram mensurar a intensidade dessas alterações frente às infecções bacterianas e criaram uma metodologia denominada escore de saúde larval. No presente trabalho, devido a alterações realizadas em alguns parâmetros, optou-se por chamá-la de escore de doença larval. Segundo Chen e Keddie (2021), os sinais de doença podem ser usados como métricas para aferir a virulência em *G. mellonella* e provavelmente ocorrem devido a uma combinação de fatores relacionados à septicemia e à imunopatologia.

O valor do escore de doença larval (0 a 10) foi determinado para cada cepa APEC, conforme descrito no item 4.8.7. Na Figura 21, pode-se verificar a associação do IP das cepas APEC com o escore de doença das larvas inoculadas.

As análises dos dados dos escores de doença larval mostraram um grau de associação moderado com o IP das cepas APEC. Os valores de coeficiente de Spearman foram de 0,558, 0,547 e 0,539 às 24, 48 e 72h pós-desafio, respectivamente. Além disso, a correlação dos resultados entre os três períodos de observação foi alta (maior que 0,994), o que demonstra que houve uma forte tendência linear dos dados com o passar do tempo, tornando-se desnecessárias avaliações subsequentes à primeira (24h pós-inoculação).

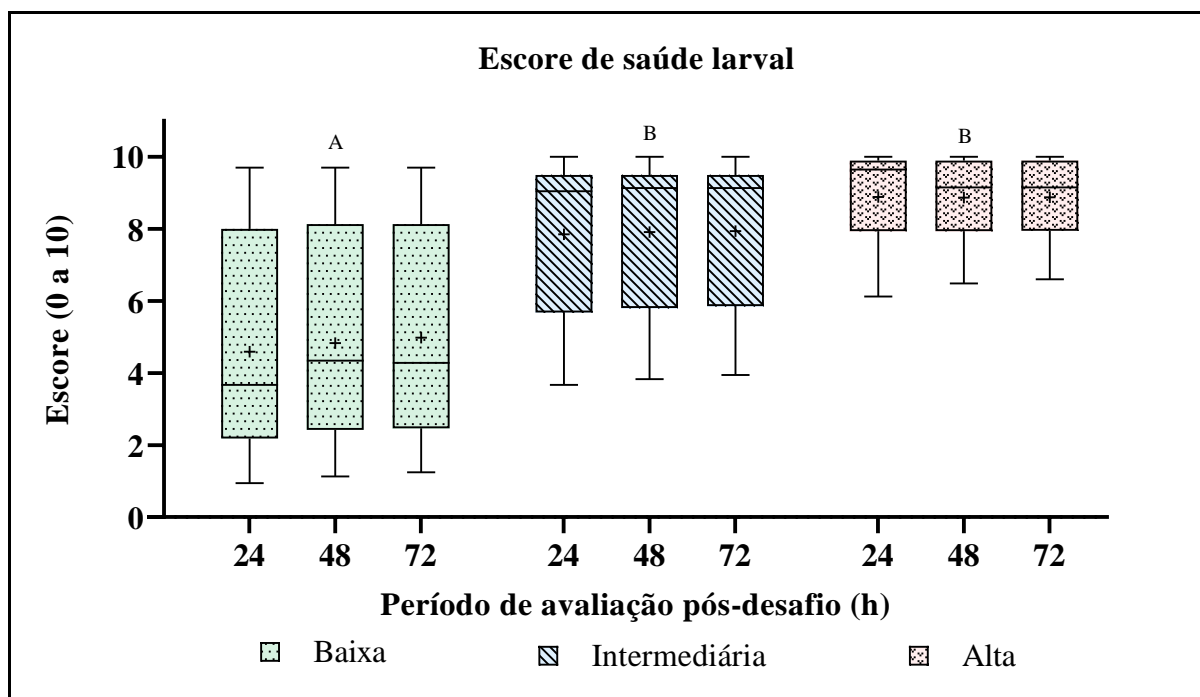
Figura 21 – Índice de patogenicidade das cepas APEC e a relação com o escore de doença das larvas de *G. mellonella* às 24h pós-inoculação.



Legenda: patogenicidade das APEC = baixa (IP $\leq 1,99$, $n=15$, marcadores verdes), intermediária (IP 2 a 4,99, $n=10$, azuis) e alta (IP ≥ 5 , $n=15$, vermelhos); linha pontilhada = tendência linear;

Na Figura 22, os valores do escore de doença larval tiveram suas médias comparadas de acordo com os grupos de patogenicidade das cepas APEC (baixa, intermediária e alta).

Figura 22 – Análise comparativa entre os valores de escore de doença larval de acordo com o grupo de patogenicidade das cepas APEC.



Legenda: + = valor médio; patogenicidade das cepas APEC = baixa, IP $\leq 1,99$ ($n=15$); I = intermediária, IP 2 a 4,99 ($n=10$); A = alta, IP 5 a 10 ($n=15$);

Letras distintas (A ou B) caracterizam diferença significativa ($p \leq 0,05$, teste de Tukey) entre os grupos de patogenicidade, independente do período de avaliação comparado (24, 48 ou 72h).

Ao confrontar os dados de escore de doença das larvas entre os três grupos de cepas APEC, pôde-se observar que as de alta e intermediária patogenicidade tiveram uma média de escores de doença significativamente ($p \leq 0,05$) superior quando comparado ao grupo de baixa patogenicidade, sugerindo que provocaram uma infecção mais severa nas larvas desafiadas. Cepas APEC de baixa patogenicidade, no geral, levaram a uma menor mortalidade, menor grau de melanização, maior formação de casulo e maior atividade larval. Estes dados sugerem que os genes de virulência desses isolados possivelmente não são expressos durante a infecção de larvas de *G. mellonella* ou, se expressos, não contribuem significativamente para o processo de infecção. O contrário também é verdadeiro para a maioria das cepas com IP elevado.

Algumas cepas APEC com patogenicidade definida como intermediária no modelo com pintos de um dia de idade apresentaram comportamento de alta patogenicidade no modelo com *G. mellonella*, motivo pelo qual não se observou diferença significativa ($p > 0,05$) entre estes grupos.

Na Tabela 12, os escore de doença das larvas foram categorizados para que fosse possível observar a distribuição das cepas APEC, o IP médio resultante e a proporção de classificações corretas da patogenicidade tendo como base o modelo proposto.

Tabela 12 – Grupos de patogenicidade e escore de doença larval 24h pós-inoculação das cepas APEC.

Escore de doença larval	Cepas APEC (patogenicidade)				IP	IP
	B	I	A			
0 – 2,49	4/4	0/4	0/4		1,652±0,72 ^A	1,652±0,72 ^{A*}
2,5 – 4,99	6/7	1/7	0/7			
5 – 7,49	1/6	3/6	2/6		4,444±2,45 ^{AB}	4,444±2,45 ^{AB*}
7,5 – 8,99	2/7	1/7	4/7		5,351±3,14 ^B	
9,0 - 10	2/16	5/16	9/16		5,826±3,13 ^B	5,681±3,07 ^B

Legenda: B= baixa, IP $\leq 1,99$ ($n=15$); I= intermediária, IP 2 a 4,99 ($n=10$); A= alta, IP 5 a 10 ($n=15$); IP = índice de patogenicidade (dados expressos como média±desvio padrão).

Letras distintas na mesma coluna (A, B ou C) caracterizam diferença significativa ($p \leq 0,05$, teste de Kruskal-Wallis) entre os grupos. * Valor de P= 0,062 na comparação de médias entre os dois grupos.

Os dados dos ensaios de desafio revelaram que cerca de 91% (10/11) das cepas APEC que induziram um escore de doença larval menor que 4,99 eram de baixa patogenicidade. Isso corresponde a 66,7% (10/15) das APEC de baixa patogenicidade. Nenhuma estirpe de alta patogenicidade apresentou escore menor que cinco. Escores entre os valores 5 e 7,49

caracterizaram cepas APEC de patogenicidade intermediária a alta, enquanto que escores iguais ou maiores que 7,5 definiram cepas de alta patogenicidade (56,5%, 13/23, considerando cepas dos três grupos), ou 86,7% (13/15) considerando somente as APEC de alta patogenicidade (IP 5-10). Neste mesmo grupo incluiu-se outros 26% (6/23) de cepas de patogenicidade intermediária. A comparação entre as médias dos IP das cepas APEC, agrupadas em cada estrato de escore, demonstrou que o modelo de avaliação proposto teve um elevado percentual de acerto na caracterização de cepas *E. coli* apatogênicas e de alta patogenicidade.

Dentre todas as variáveis de resposta pesquisadas no modelo de infecção com *G. mellonella*, o escore de doença larval foi a que apresentou o maior grau de associação com os resultados de patogenicidade das cepas APEC determinado em aves (pintos de um dia de idade). Essa maior correlação, embora moderada (0,558, $p \leq 0,05$, coeficiente de Spearman), pode ser explicada pelo fato do escore ser constituído por várias subvariáveis (tempo de morte, melanização, formação de casulo e atividade larval), em que o valor final é uma soma dos efeitos destas.

Uma análise comparativa entre os resultados gerais encontrados na classificação da patogenicidade das cepas APEC, através dos grupos filogenéticos e do escore de doença larval, revela uma certa similaridade no percentual de acerto entre os dois métodos, quando as cepas são analisadas de maneira grupal (conjunto de cepas). Entretanto, somente por meio do teste de inoculação das larvas se torna possível discriminar cepas apatogênicas, ou de baixa patogenicidade, com grande precisão (escore de doença larval menor que 4,99). O estrato com escore menor que 2,5 ficou constituído apenas por cepas de baixa patogenicidade. Levando-se em consideração a média dos IP dos grupos de cepas APEC que provocaram escores de 7,5 a 10 ($5,681 \pm 3,07$), a mesma conclusão cabe na avaliação de cepas de alta patogenicidade.

A análise de correlação se faz particularmente relevante nesse tipo de estudo, porque ela independe da formação de grupos, para efeitos de comparação, e trata da relação direta entre os dados de duas variáveis. A Tabela 13 traz um resumo com as variáveis de resposta do modelo com *G. mellonella* que melhor se correlacionaram com o IP das cepas APEC e mostra o nível de associação encontrado entre elas.

Tabela 13 – Nível e tipo de associação encontrada entre as variáveis de resposta do modelo de *G. mellonella* e o IP de APEC.

Coefficientes de correlação	IP*	DL ₅₀ ¹	Mel. <i>in vitro</i>	Mel. visual	Taxa de mortalidade ²	Escore de doença
IP	1	-	-	-	-	-
DL ₅₀ ¹	-0,422 (0,007)	1	-	-	-	-
Mel. <i>in vitro</i>	0,731 (0,002)	-0,536 (0,039)	1	-	-	-
Mel. visual	0,456 (0,003)	-0,850 (0,000)	0,600 (0,018)	1	-	-
Taxa de mortalidade ²	0,450 (0,004)	-0,849 (0,000)	0,728 (0,002)	0,797 (0,000)	1	-
Escore de doença ¹	0,558 (0,000)	-0,789 (0,000)	0,630 (0,012)	0,865 (0,000)	0,848 (0,000)	1

Legenda: IP= índice de patogenicidade (1-10); DL₅₀= dose letal para 50% das larvas; Mel. *in vitro*= melanização da hemolinfa determinada por espectrofotometria; Mel. visual= melanização das larvas definida por escore visual (0-3);

¹Parâmetro calculado considerando os dados coletados no período de 0 a 72h pós-desafio;

²Taxa de mortalidade considerando o total de larvas mortas acumulado no período de 12h pós-inoculação; demais parâmetros foram avaliados às 24h pós-desafio; *n*=40, com exceção da análise de melanização *in vitro* que foi realizada com 15 isolados APEC.

A associação entre as variáveis foi verificada através do coeficiente de Pearson, à exceção do IP, que foi analisada pelo coeficiente de Spearman; o valor entre parênteses é o valor de *p* estatístico calculado por análise de regressão.

Os resultados mostraram que as variáveis de resposta do modelo com larvas de *G. mellonella* apresentaram associação de fraca (0,3 a 0,5) a moderada (0,5-0,7) com o IP das cepas APEC. Por outro lado, a análise de correlação entre as variáveis de resposta mostrou uma associação de moderada (0, 5-0,7) a forte (0,7-0,9). Além disso, evidenciou-se que a melanização determinada por espectrofotometria (avaliação *in vitro* da hemolinfa) foi o parâmetro que apresentou o menor nível de correlação com as demais variáveis, à exceção da associação com o IP, possivelmente pelo menor número de amostras (*n*=15) utilizadas nos ensaios de inoculação. Como esperado, as variáveis dependentes do evento “morte de larvas”, após as inoculações com as cepas APEC, tiveram elevado grau de associação entre si (DL₅₀, taxa de mortalidade e escore de doença larval).

A análise dos obtidos do modelo de *Galleria mellonella* revelou que a leitura das variáveis de resposta pode ser padronizada para ocorrer somente até o período de 24h pós-inoculação, sem comprometer o nível de correlação com IP e sem reduzir o poder de discriminação na caracterização da patogenicidade de isolados APEC, ao menos até que novos estudos aprimorem a metodologia aqui proposta. O menor tempo para obtenção dos dados se

faz importante quando se vislumbra o uso do modelo como método de diagnóstico rápido da patogenicidade de APEC.

Os dados gerados no presente trabalho sustentam a indicação do modelo de infecção com larvas de *G. mellonella* como uma ferramenta de diagnóstico válida para a caracterização da patogenicidade de isolados APEC. Embora a correlação entre os modelos tenha se mostrado ser de grau moderado, ela foi estatisticamente significativa em todas as análises. Além disso, o modelo se mostrou muito assertivo na caracterização de cepas com virulência bem definida (apatogênicas e de alta patogenicidade).

A partir dos dados alcançados, sugere-se o uso do escore de doença larval como variável de escolha para a determinação da patogenicidade de isolados APEC em modelo com larvas de *G. mellonella*. Para tal, deve-se seguir os seguintes critérios de classificação, de acordo com o escore:

- cepas apatogênicas, ou de baixa patogenicidade: 0 a 4,99;
- intermediária: 5 a 7,49; e,
- alta patogenicidade: 7,5 a 10.

De acordo com Tsay, Loh e Proft (2016), os insetos divergiram dos vertebrados há aproximadamente 500 milhões de anos, e essa distância evolutiva acabou que por determinar muitos fenômenos específicos associados a cada hospedeiro (MUKHERJEE *et al.*, 2010). A análise geral dos resultados encontrados neste estudo reforça a teoria de que existe um limite máximo de correlação que pode ser alcançado quando modelos animais tão distintos (inseto vs aves) são confrontados. Contudo, cabe aos pesquisadores determinar se o nível de associação encontrado satisfaz os objetivos das investigações.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo realizado com as larvas de *G. mellonella* foi muito inovador e inédito, porque além de caracterizar a patogenicidade de amostras APEC nos diversos ensaios de infecção, tratou de correlacionar as variáveis de resposta do inseto com a patogenicidade encontrada em modelo *in vivo* com o hospedeiro (alvo) natural da bactéria - aves (IP, pintos de um dia de idade). Modelos de infecção com invertebrados foram recentemente empregados para investigar a virulência de diversos patótipos de *E. coli* de interesse para a saúde humana, mas até o momento nenhum trabalho avaliando isolados APEC em modelo de *Galleria mellonella* foi publicado.

Com base nos achados alcançados nos ensaios de melanização, densidade celular e mortalidade, sugere-se que estudos futuros avaliem a dinâmica dessas variáveis com maior ênfase nas primeiras 24 horas, considerando intervalos de tempo mais curtos (por exemplo, a cada 6 ou 8 horas). Acredita-se que uma análise mais detalhada nesta fase possa aumentar o poder de discriminação do modelo de infecção com *G. mellonella* no estudo da patogênese de cepas APEC. O inseto possui sistemas de defesa e metabolismo muito acelerados quando incubado a temperaturas de 37°C.

Importante enfatizar também a importância da padronização da metodologia a ser aplicada em estudos futuros. Muitos trabalhos já mostraram que até mesmo o tipo de dieta fornecida aos insetos durante a criação pode influenciar na sua capacidade de resposta frente a processos infecciosos (JORJÃO *et al.*, 2018b; KANGASSALO *et al.*, 2015, KANGASSALO *et al.*, 2018; KRAMS *et al.*, 2015). Indivíduos que estão em boas condições, devido a um ambiente rico em recursos, podem ter melhor capacidade de resistir a parasitas e patógenos (BOOTS, 2000). Por outro lado, a privação alimentar pode diminuir a resposta imune (SIVA-JOTHY; THOMPSON, 2002). Revisões de literatura recentemente identificaram e discutiram com mais detalhes as questões relacionadas à padronização do modelo de infecção com *G. mellonella* (CHAMPION; TITBALL; BATES, 2018; TSAI; LOH; PROFT, 2016).

O modelo proposto de determinação da patogenicidade de isolados APEC com larvas de *G. mellonella*, para funcionar, deve respeitar alguns pressupostos:

- a) utilizar somente larvas criadas sob as mesmas condições de manejo, temperatura e dieta;
- b) apenas larvas com peso corporal entre 260 e 320mg devem ser inoculadas, desconsiderando-se o seu comprimento; devem ser distribuídas nos grupos de maneira aleatória (pesos homogêneos);

c) após a seleção por peso, manter as larvas armazenadas em ambiente escuro sob refrigeração (10-14°C) por até 5 dias; passado este período devem ser descartadas;

d) utilizar uma dose de desafio de aproximadamente 10^5 UFC/larva, isso deve conferir bom poder de discriminação nos ensaios com APEC; neste caso sempre utilizar cepas de patogenicidade conhecida como controles (baixa e alta patogenicidade); desconsiderar resultados de ensaios com diferença entre doses maior que 0,5 log UFC; uma alternativa para não utilizar cepas controle é a utilização de três doses de desafio (10^4 , 10^5 e 10^6 UFC/larva).

f) idealmente, montar grupos de teste com mais de dez larvas cada;

g) realizar no mínimo três repetições de cada teste, devendo ser realizados, preferencialmente, em diferentes dias;

h) reduzir ao máximo o intervalo de tempo entre as avaliações, no período pós-inoculação, principalmente nas primeiras 24h.

A padronização dos procedimentos supracitados minimiza os efeitos das variáveis não controladas (erro desconhecido) sobre os resultados. Para que dados sejam comparados entre diferentes grupos experimentais (controles negativos e positivos, estirpes de bactérias com patogenicidade variável, medicamentos, probióticos, entre outros testes) é importante que as informações geradas sejam confiáveis. Todavia, resultados confiáveis só podem ser alcançados quando a metodologia de avaliação utilizada tem elevado nível de repetibilidade e de reprodutibilidade – padronização.

O poder de *G. mellonella* como hospedeiro modelo reside não apenas em sua capacidade de melhorar a eficiência da pesquisa por meio da diminuição de custo e de tempo associados ao uso de animais vertebrados, mas também na capacidade de aumentar a escala e, portanto, o poder estatístico de experimentos.

As razões por trás da menor ou maior patogenicidade de determinados isolados APEC não foram o foco do presente trabalho. Outras pesquisas investigando a patogenicidade de APEC neste modelo podem incluir, por exemplo, estudos de mutagênese ou *knockout* para avaliar a contribuição dos fatores de virulência, semelhante ao conduzido por Morgan, Ortiz e Riordan (2014) com isolados EHEC. Com uma triagem prévia em modelos de larvas, seria possível direcionar os esforços àqueles isolados com características bem marcadas de patogenicidade (por exemplo, isolados APEC de alta letalidade). Alghoribi e seus colegas (2014), ao analisarem o comportamento de isolados UPEC no modelo com *G. mellonella*, encontraram uma associação significativa entre a mortalidade de larvas e o carregamento de fatores de virulência específicos. Da mesma forma, Ciesielczuk *et al.* (2015) demonstraram que cepas ExPEC com determinados fatores de virulência (adesinas, fímbrias, proteínas de

membrana) foram associadas com mortalidade elevada e/ou uma forte resposta imunológica em larvas de *Galleria mellonella*. Williamson *et al.* (2014) mostraram que houve boa correlação entre o número de genes de virulência das cepas testadas e a sobrevivência das larvas, de forma que os isolados ExPEC com maior escore de virulência (mais genes) mataram as larvas de *G. mellonella* significativamente mais rápido que os isolados com menores escores de virulência. Estes dados apontam para um tipo de análise associativa que também pode vir a ser aplicada para estirpes do patótipo APEC. O levantamento do repertório, sequência, expressão e papel na virulência dos genes da APEC, em modelos de infecção controlada como o proposto, oferecem uma excelente oportunidade para melhorar nosso entendimento sobre os preditores moleculares da patogenicidade.

O modelo de infecção com larvas de *Galleria mellonella*, associado a técnicas de manipulação genética, também pode se tornar uma metodologia alternativa para atenuação da bactéria em estudos de vacinação e imunização. Além disso, pode-se explorar o modelo em estudos envolvendo interações entre o hospedeiro e o patógeno, identificando, por exemplo, fatores do agente que modulam a imunidade inata em prol do crescimento bacteriano durante a infecção. Tudo isso sem as barreiras logísticas, éticas e financeiras que existem nos modelos com aves.

Com a conclusão do estudo proposto, abre-se a perspectiva para o estabelecimento de um novo método de determinação da patogenicidade de isolados APEC, baseado no modelo de infecção *in vivo* de larvas do inseto *Galleria mellonella* – traça maior da cera. A definição de um método, com boa acurácia e que seja aplicável em larga escala a nível laboratorial, é determinante para o avanço das pesquisas nessa área. O diagnóstico e a vigilância epidemiológica (flutuações de patogenicidade de amostras isoladas de casos clínicos) assertivos, a respeito da patogenicidade de isolados *E. coli*, poderão dar maior segurança ao médico veterinário na tomada de decisão, quanto a que tipo de estratégia deve adotar para ter sucesso na prevenção e no controle da colibacilose aviária. Medir flutuações de patogenicidade de amostras de casos clínicos da doença pode ser o primeiro passo

Uma vez que o inseto se mostrou susceptível à infecção por APEC, revela-se a possibilidade de novas pesquisas com outros gêneros e espécies de bactérias, de interesse para a saúde animal. As bactérias poderão ainda ser estudadas em modelos mistos de infecção, verificando-se o sinergismo ou o antagonismo entre dois ou mais agentes patogênicos no mesmo hospedeiro.

Embora até hoje isolados APEC sejam caracterizados por infectar aves (galinhas, perus, patos, entre outras), estudos recentes sugerem a possibilidade do patótipo APEC estar implicado

também em infecções extraintestinais em humanos. Análises genômicas comparativas entre cepas APEC, UPEC e NMEC (*E. coli* causadora de meningite em neonatos), revelaram semelhanças notáveis em ilhas genômicas, genes de virulência, sobreposição de sorogrupos e filogenia. Esses dados levam alguns pesquisadores a sugerir que APEC pode representar um risco zoonótico, inclusive com a possibilidade de uma ligação de origem alimentar entre esses patogrupos. Dentro desse contexto, o modelo de infecção em *G. mellonella* pode vir a ser utilizado em pesquisas que busquem esclarecer essa possível relação interespecie dos patotipos de *E. coli*.

Apesar da clara utilidade do modelo *Galleria mellonella* para o estudo da patogênese de isolados APEC, alguns obstáculos ainda precisam ser superados para que o método se consolide: novas variáveis devem ser incorporadas; encontrar associação com marcadores moleculares de patogenicidade, realizar comparações interlaboratoriais, validar a metodologia com maior número de amostras; padronizar internacionalmente a linhagem do inseto a ser utilizada; entre outros fatores. O modelo de *G. mellonella* não substitui modelos de animais vertebrados bem estabelecidos, mas é um método barato e confiável que fornece a capacidade de estudar a diferença de patogenicidade entre cepas APEC, identificar marcadores de virulência putativos e possíveis novos alvos moleculares para terapia antimicrobiana e desenvolvimento de vacinas.

7 CONCLUSÕES

As larvas de *G. mellonella* foram susceptíveis à infecção com isolados APEC. Os ensaios revelaram que a mortalidade das larvas é dose-dependente, com o inseto sendo eficaz na resposta a infecções com concentrações $<10^3$ UFC.

Para os ensaios de inoculação, padronizou-se que as larvas precisam ter peso corporal entre 260 e 320mg, que o tempo total de observação pós-desafio deve ser de 72h e que a dose dos inóculos que melhor confere poder de discriminação entre cepas é 10^5 UFC/larva. As análises de correlação mostraram também que, dependendo da variável de interesse, pode-se reduzir o período de observação para 24h, sem prejuízo aos resultados (por exemplo, taxa de mortalidade, DL_{50} , melanização e escore de doença larval). Por outro lado, a comparação de curvas de sobrevivência requer ao menos 72h de coleta de dados, se o intervalo entre avaliações for de 12h.

As variáveis de resposta do inseto hospedeiro que melhor possibilitaram caracterizar as diferenças de patogenicidade entre cepas APEC foram DL_{50} , taxa de mortalidade, curva de sobrevivência, melanização e escore de doença larval. A densidade de hemócitos na hemolinfa e a quantificação da enzima LDH (citotoxicidade) apresentaram resultados inconsistentes, não sendo recomendado o uso em trabalhos futuros.

O escore de doença larval é a variável do modelo de *G. mellonella* que guarda o maior nível de associação com o IP das APEC, sendo moderado (coeficiente de Pearson de 0,558) e de sentido positivo. A melanização *in vitro* teve uma associação maior, mas é desconsiderada devido ao baixo número de amostras testadas ($n=15$). Demais variáveis apresentam menores níveis de associação (fraca a moderada) com o IP, porém todas estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$).

O percentual de acerto na classificação da patogenicidade dos isolados APEC é semelhante entre o modelo *in vivo* com *G. mellonella* e o método molecular por grupos filogenéticos (A, B1, B2 e D). Todavia, o modelo de infecção com as larvas tem maior capacidade de distinguir os isolados com patogenicidade destacada dentro do grupo amostral (por exemplo, as cepas apatogênicas, ou comensais, e as de alta patogenicidade).

Os resultados alcançados neste estudo não permitem padronizar um método *in vivo* com larvas de *G. mellonella* que possa ser utilizado de maneira isolada para determinar a patogenicidade de cepas APEC. Outros estudos precisam ser conduzidos para a aumentar a robustez do teste (reprodutibilidade e repetibilidade) e, assim, elevar o nível de confiança dos dados gerados. Contudo, ao passo que a correlação entre os dois modelos animais (larva e aves)

foi estatisticamente significativa, o estudo fornece validação preliminar para uso do modelo como ferramenta de triagem da patogenicidade de amostras de *E. coli* de origem avícola.

REFERÊNCIAS

- ALGHORIBI, M. F. *et al.* *Galleria mellonella* infection model demonstrates high lethality of ST69 and ST127 uropathogenic *E. coli*. **PLoS One**, v. 9, p. 1-10, 2014.
- ANTÃO, E. M. *et al.* The chicken as a natural model for extraintestinal infections caused by avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Microbial Pathogenesis**, v. 45, p. 361-369, 2008.
- ANTOINE, C. *et al.* In Vitro Characterization and In Vivo Efficacy Assessment in *Galleria mellonella* Larvae of Newly Isolated Bacteriophages against *Escherichia coli* K1. **Viruses**, v. 13, p. 1-19, 2021.
- ASKOURA, M.; STINTZI, A. Using *Galleria mellonella* as an Infection Model for *Campylobacter jejuni* Pathogenesis. **Methods in Molecular Biology**, v. 1512, p. 163–169, 2017.
- AZEEM, T. *et al.* Host immune responses and vaccination against avian pathogenic *Escherichia coli*. **World's Poultry Science Journal**, [s. l.], v. 73, n. 1, p. 29-44, 2017.
- BENDER, J. K. *et al.* LPS Structure and PhoQ Activity Are Important for *Salmonella* Typhimurium Virulence in the *Galleria mellonella* Infection Model. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 8, n. 8, p. 1-12, 2013.
- BERGIN, D.; BRENNAN, M.; KAVANAGH, K. Fluctuations in haemocyte density and microbial load may be used as indicators of fungal pathogenicity in larvae of *Galleria mellonella*. **Microbes and Infection**, v. 5, p. 1389-1395, 2003.
- BINDER, U.; MAURER, E.; LASS-FLORL, C. *Galleria mellonella*: an invertebrate model to study pathogenicity in correctly defined fungal species. **Fungal biology**, v. 120, p. 288 -295, 2016.
- BLANCO, J. E. *et al.* Serotypes of *Escherichia coli* isolated from septicaemic chickens in Galicia (northwest Spain). **Veterinary Microbiology**, v. 61, n. 3, p. 229-235, 1998.
- BOOTS, M. Density-independent resource limitation and the transmission of an insect pathogen. **Oecologia**, v. 124, p. 172-175, 2000.
- BRENNAN, M. *et al.* Correlation between virulence of *Candida albicans* mutants in mice and *Galleria mellonella* larvae. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 34, n. 2, p.153-157, 2002.
- BROWN, S. E. *et al.* A peptidomics study reveals the impressive antimicrobial peptide arsenal of the wax moth *Galleria mellonella*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**., v. 39, p. 792-800, 2009.
- BROWNE, N.; HEELAN, M.; KAVANAGH, K. An analysis of the structural and functional similarities of insect hemocytes and mammalian phagocytes. **Virulence**, v. 4, n. 7, p. 597-603, 2013.

- CADOT, C. *et al.* InhA1, NprA and HlyII as candidates to differentiate pathogenic from non pathogenic *Bacillus cereus* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, p. 1358-1365, 2010.
- MOURA, A. C. de; IRINO, K.; VIDOTTO, M. C. Genetic variability of avian *Escherichia coli* strains evaluated by enterobacterial repetitive intergenic consensus and repetitive extragenic palindromic polymerase chain reaction. **Avian Diseases**, v. 45, p. 173-181, 2001.
- CHAMPION, O. L. WAGLEY, S.; TITBALL, R. W. *Galleria mellonella* as a model host for microbiological and toxin research. **Virulence**, v. 7, p. 840-845, 2016.
- CHAMPION, O. L.; TITBALL, R. W.; BATES, S. Standardization of *G. mellonella* larvae to provide reliable and reproducible results in the study of fungal pathogens. **Journal of Fungi**, v. 4, p. 840-845, 2018.
- CHADWICK, J. S.; VILK, E. Endotoxins from several bacterial species as immunizing agents against *Pseudomonas aeruginosa* in *Galleria mellonella*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 13, p. 410-415, 1969.
- CHEN, R. Y.; KEDDIE, B. A. The *Galleria mellonella*-Enteropathogenic *Escherichia coli* Model System: Characterization of Pathogen Virulence and Insect Immune Responses. **Journal of Insect Science**, v. 21, n. 4, p. 1-15, 2021.
- CIESIELCZUK, H. *et al.* Comparative virulence of urinary and bloodstream isolates of extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* in a *Galleria mellonella* model. **Virulence**, v. 6, p. 145-151, 2015.
- CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 10, p. 4555-4558, 2000.
- COLLINGWOOD, C. *et al.* Is the concept of avian pathogenic *Escherichia coli* as a single pathotype fundamentally flawed? **Frontiers in Veterinary Science**, v. 1, n. 5, p. 1-4, 2014.
- CONTRERAS-GARDUNO, J. *et al.* Insect immune priming: ecology and experimental evidences. **Ecological Entomology**, v. 41, n. 4, p. 351-366, 2016.
- CYTRYNSKA, M.; ZDYBICKA-BARABAS, A.; JAKUBOWICZ, T. The involvement of protein kinase A in the immune response of *Galleria mellonella* larvae to bacteria. **Acta Biochimica Polonica**, v. 54, n. 1, p. 167-74, 2007.
- DELICATO, E. R. *et al.* Virulence-associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. **Veterinary Microbiology**, v. 94, p. 97-103, 2003.
- DHO, M.; LAFONT, J. P. Adhesive properties and iron uptake abilities in *E. coli* lethal and non-lethal for chicks. **Avian Diseases**, v. 28, n. 4, p. 1016-1025, 1984.
- DHO-MOULIN, M.; FAIRBROTHER, J. M. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). **Veterinary Research**, v. 30, p. 299-316, 1999.

DOZOIS C.; DAIGLE, F.; CURTISS, R. Identification of pathogen-specific and conserved genes expressed in vivo by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 100, p. 247–252, 2003.

DUNPHY, G. B. *et al.* I. Virulence of *Candida albicans* mutants toward larval *Galleria mellonella* (Insecta, Lepidoptera, Galleridae). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 49, p. 514-524, 2003.

DZIVA, F.; STEVENS, M. P. Colibacillosis in poultry: Unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* in their natural hosts. **Avian Pathology**, v. 37, n. 4, p. 355-366, 2008.

ELLIS, J. D.; GRAHAM, J. R.; MORTENSEN, A. Standard methods for wax moth research. **Journal of Apicultural Research**, v. 52, p. 1–17, 2013.

EVANS, B. A.; ROZEN, D. E. A *Streptococcus pneumoniae* infection model in larvae of the wax moth *Galleria mellonella*. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 31, p. 2653-2660, 2012.

EWERS, C. *et al.* Intestine and environment of the chicken as reservoirs for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains with zoonotic potential. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 184-192, 2009.

FALLON, J.P.; TROY, N.; KAVANAGH, K. Pre-exposure of *Galleria mellonella* larvae to different doses of *Aspergillus fumigatus* conidia causes differential activation of cellular and humoral immune responses. **Virulence**, v. 2, p. 413-421, 2011.

FANTINATTI, F.; SILVEIRA, W. D.; CASTRO, A. F. Characteristics associated with pathogenicity of avian septicemic *Escherichia coli* strains. **Veterinary Microbiology**, v. 41, p. 75-6, 1994.

FEDHILA, S. *et al.* Comparative analysis of the virulence of invertebrate and mammalian pathogenic bacteria in the oral insect infection model *Galleria mellonella*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 103, p. 24-29, 2010.

FIRACATIVE, C.; DUAN, S.; MEYER, W. *Galleria mellonella* Model Identifies Highly Virulent Strains among All Major Molecular Types of *Cryptococcus gattii*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. 1-12, 2014.

FORTES, F. B. B. **Perfil bioquímico de amostras de *Escherichia coli* isoladas de materiais avícolas no Estado do Rio Grande do Sul e sua relação com a patogenicidade.** 2008. 53f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 2008.

GALVEZ, D.; CHAPUISAT, M. Immune priming and pathogen resistance in ant queens. **Ecology and Evolution**, v. 4, n. 10, p. 1761-1767, 2014.

GAO, W.; *et al.* Two novel point mutations in clinical *Staphylococcus aureus* reduce linezolid susceptibility and switch on the stringent response to promote persistent infection. **PLoS Pathogens**, v. 6, p. 1-15, 2010.

GARCÍA-RODAS, R. *et al.* *Cryptococcus neoformans* capsular enlargement and cellular gigantism during *Galleria mellonella* infection. **PLoS One**, v. 6, n. 9, p. 1-12, 2011.

GARCIA-SOLACHE, M. A. *et al.* Fungal virulence in a lepidopteran model is an emergent property with deterministic features. **MBio**, v. 4, n. 3, p. 1-9, 2013.

GIANNOULI *et al.* Virulence-related traits of epidemic *Acinetobacter baumannii* strains belonging to the international clonal lineages I-III and to the emerging genotypes ST25 and ST78. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, p. 1-11, 2013.

GILBERT, R.; KARP, R. D.; UETZ, G. W. Effects of juvenile infection on adult immunity and secondary sexual characters in a wolf spider. **Behavioral Ecology**, v. 27, n. 3, p. 946-954, 2016.

GILLESPIE, J. P.; KANOST, M. R.; TRENCZEK, T. Biological mediators of insect immunity. **Annual Review of Entomology**, v. 42, p. 611-643, 1997.

GOMIS, S. M. *et al.* Experimental reproduction of *Escherichia coli* cellulitis and septicemia in broiler chickens. **Avian Diseases**, v. 41, n. 1, p. 234-240, 1997.

GUABIRABA, R.; SCHOULER, C. Avian colibacillosis: Still many black holes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 362, n. 15, p. 1-8, 2015.

HARDING, C. R. *et al.* Use of *Galleria mellonella* as a Model Organism to Study *Legionella pneumophila* Infection. **Journal of Visualized Experiments**, v. 81, p. 1-10, 2013.

HARRY, E. G. The survival of *Escherichia coli* in the dust of poultry houses. **The Veterinary Record**, v. 76, p. 466-470, 1964.

HARRY, E. G.; HEMSLEY, L. A. The association between the presence of septicaemic strains of *Escherichia coli* in the respiratory and intestinal tracts of chickens and the occurrence of colisepticaemia. **The Veterinary Record**, v. 77, p. 35-40, 1965.

HASAN, B. *et al.* High prevalence of antibiotic resistance in pathogenic *Escherichia coli* from large- and small-scale poultry farms in Bangladesh. **Avian Disease**, v. 55, p. 689-692, 2011.

HELD, K. G. *et al.* A metalloprotease secreted by the insect pathogen *Photobacterium luminescens* induces melanization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 7622-7628, 2007.

HOFFMANN, J. A. Innate immunity of insects. **Current Opinion in Immunology**, v. 7, n. 1, p. 4-10, 1995.

INSUA, J. L. *et al.* Modeling *Klebsiella pneumoniae* pathogenesis by infection of the wax moth *Galleria mellonella*. **Infection and Immunity**, v. 81, p. 3552-3565, 2013.

İZZETOĞLU, S. A new approach for classification of major larval hemocytes (prohemocytes, plasmatocytes and granular cells) in the greater wax moth, *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) by acridine orange staining. **Entomological Society of Turkey**, v. 36, p. 163-168, 2012.

JANDER, G.; RAHME, L. G.; AUSUBEL, F. M. Positive correlation between virulence of *Pseudomonas aeruginosa* mutants in mice and insects. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 13, p. 3843-3845, 2000.

JONSSON, R. *et al.* The wax moth *Galleria mellonella* as a novel model system to study Enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenesis. **Virulence**, v. 8, n. 8, p. 1894-1899, 2016.

JORJÃO, A. L. *et al.* Effect of *Lactobacillus rhamnosus* on the response of *Galleria mellonella* against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* infections. **Archives of Microbiology**, v. 200, p. 383-389, 2018a.

JORJÃO, A. L. *et al.* From moths to caterpillars: Ideal conditions for *Galleria mellonella* rearing for in vivo microbiological studies. **Virulence**, v. 9, n. 1, p. 383-389, 2018b.

JOYCE, S. A.; GAHAN, C. G. Molecular pathogenesis of *Listeria monocytogenes* in the alternative model host *Galleria mellonella*. **Microbiology**, v. 156, p. 3456-3468, 2010.

JUNQUEIRA, J. C. *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens: recent studies and new perspectives. **Virulence**, v. 3, p. 474-476, 2012.

KABIR, S. M. L. Avian Colibacillosis and Salmonellosis: A Closer Look at Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis, Control and Public Health Concerns. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, vol. 7, p. 89-114, 2010.

KANGASSALO, K. *et al.* Independent and interactive effects of immune activation and larval diet on adult immune function, growth and development in the greater wax moth (*Galleria mellonella*). **Journal of Evolutionary Biology**, v. 31, n. 10, p. 1485-1497, 2018.

KANGASSALO, K. *et al.* Intra- and trans-generational effects of larval diet on susceptibility to an entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, in the greater wax moth, *Galleria mellonella*. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 28, p. 1453-1464, 2015.

KARIYAWASAM, S.; WILKIE, B. N.; GYLES, C. L. Construction, characterization and evaluation of vaccine potential of three genetically defined mutants of avian pathogenic *Escherichia coli*. **Avian Diseases**, v. 48, p. 287-299, 2004.

KAVANAGH, K.; REEVES, E. P. Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 28, n. 1, p. 101-112, 2004.

KAWAOKA, S. *et al.* Functional analysis of four Gloverin-like genes in the silkworm, *Bombyx mori*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 67, p. 87-96, 2008.

KRAMS, I. *et al.* Effects of food quality on trade-offs among growth, immunity and survival in the greater wax moth *Galleria mellonella*. **Insect Science**, v. 22, p. 431-439, 2015.

KWADHA, C. A. *et al.* The biology and control of the greater wax moth, *Galleria mellonella*. **Insects**, v. 8, n. 61, p. 1-17, 2017.

KWAGA, J. K. *et al.* A carAB mutant of avian pathogenic *Escherichia coli* serogroup O2 is attenuated and effective as a live oral vaccine against colibacillosis in turkeys. **Infection and Immunity**, v. 62, p. 3766-3772, 1994.

LA ROSA, S. L. *et al.* *In vivo* assessment of growth and virulence gene expression during commensal and pathogenic lifestyles of luxABCDE-tagged *Enterococcus faecalis* strains in murine gastrointestinal and intravenous infection models. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n.13, p. 3986-3997, 2013.

LANDMAN, W. *et al.* Molecular typing of avian pathogenic *Escherichia coli* colonies originating from outbreaks of *E. Coli* peritonitis syndrome in chicken flocks. **Avian Pathology**, v. 43, n. 4, p. 345-356, 2014.

LANDMAN, W.; HEUVELINK, A.; VAN ECK, J. Reproduction of the *Escherichia coli* peritonitis syndrome in laying hens. **Avian Pathology**, v. 42, n. 2, p. 157-162, 2013.

LANGE, A.; BEIER, S.; HUSON, D. H.; PARUSEL, R.; IGLAUER, F.; FRICK, J. -S. Genome Sequence of *Galleria mellonella* (Greater Wax Moth). **Genome Announcements**, v. 6(2), 2018.

LAVINE, M. D.; STRAND, M. R. Insect hemocytes and their role in immunity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.32, p.1295-1309, 2002.

LEUKO, S.; RAIVIO, T. L. Mutations that impact the enteropathogenic *Escherichia coli* Cpx envelope stress response attenuate virulence in *Galleria mellonella*. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 9, p.3077-3085, 2012.

LI, D. *et al.* Insect hemolymph clotting: evidence for interaction between the coagulation system and the prophenoloxidase activating cascade. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 32, p. 919–928, 2002.

LI, G. *et al.* Identification of genes required for avian *Escherichia coli* septicemia by signature-tagged mutagenesis. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 2818–2827, 2005.

Li G, *et al.* Transcriptome analysis of avian pathogenic *Escherichia coli* O1 in chicken serum reveals adaptive responses to systemic infection. **Infection and Immunity**, v. 79, p. 1951–1960, 2011.

LOH, J. M. S. *et al.* *Galleria mellonella* larvae as an infection model for group A streptococcus. **Virulence**, v. 4, n. 5, p. 419-428, 2013.

MAK, P.; CHMIEL, D.; GACEK, G. J. Antibacterial peptides of the moth *Galleria mellonella*. **Acta Biochimica Polonica**, v. 48, n. 4, p. 1191-1195, 2001.

MANOHAR, p.; NACHIMUTHU, R.; LOPES, B. S. The therapeutic potential of bacteriophages targeting gram-negative bacteria using *Galleria mellonella* infection model. **BMC Microbiology**, v. 18, n. 97, p. 1-11, 2018.

MELLATA, M. Human and Avian Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*: Infections, Zoonotic Risks, and Antibiotic Resistance Trends. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 10, n. 11, p. 916-932, 2013.

MICHAUX, C. *et al.* CspR, a Cold Shock RNA-Binding protein involved in the long-term survival and the virulence of *Enterococcus faecalis*. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 24, p. 6900-6908, 2012.

MIKULAK, E. *et al.* *Galleria mellonella* L. as model organism used in biomedical and other studies. **Przegl Epidemiol**, v. 72, n. 1, p. 57-73, 2018.

MIYATA, S. *et al.* Use of the *Galleria mellonella* caterpillar as a model host to study the role of the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 5, p. 2404-2413, 2003.

MOKADY, D.; GOPHNA, U.; RON, E. Z. Extensive gene diversity in septicemic *Escherichia coli* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 66-73, 2005.

MORGAN, J. K.; ORTIZ, J. A.; RIORDAN, J. T. The role for TolA in enterohemorrhagic *Escherichia coli* pathogenesis and virulence gene transcription. **Microbial Pathogenesis**, v. 77, p. 42-52, 2014.

MORIN, N. *et al.* Autoactivation of the AggR regulator of enteroaggregative *Escherichia coli* in vitro and in vivo. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 58, p. 344-355, 2010.

MUKHERJEE, K. *et al.* *Galleria mellonella* as a Model System for Studying *Listeria* Pathogenesis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p. 310–317, 2010.

MYLONAKIS, E. *et al.* A. *Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 7, p. 3842-3850, 2005.

NOLAN, L. K. *et al.* Colibacillosis. In: **Diseases of Poultry**, 13th ed.; SWAYNE, D. E. *et al.* (Ed.); Iowa State University Press: Ames, IA, USA, 2013. p. 751-806

OLIVEIRA, A. A. *et al.* Principais causas de condenação ao abate de aves em matadouros frigoríficos registrados no serviço brasileiro de inspeção federal entre 2006 e 2011. **Ciência Animal Brasileira**, v. 17, n. 1, p. 79-89, 2016.

OLIVER, J. D. *et al.* Comparative analysis of hemocyte phagocytosis between six species of arthropods as measured by flow cytometry. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 108, p. 126-130, 2011.

OLSEN, R. J. *et al.* Virulence of serotype M3 Group A *Streptococcus* strains in wax worms (*Galleria mellonella* larvae). **Virulence**, v. 2, p. 111–119, 2011.

PANDEY, J. P.; TIWARI, R. K. An overview of insect hemocyte science and its future application in applied and biomedical fields. **American Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 2, p. 82-105, 2012.

PECH, L. L.; STRAND, M. R. Granular cells are required for encapsulation of foreign targets by insect haemocytes. **Journal of Cell Science**, v. 109, p. 2053-2060, 1996.

PEIGHAMBARI, S. *et al.* Safety, immunogenicity, and efficacy of two *Escherichia coli* cya crp mutants as vaccines for broilers. **Avian Diseases**, v. 46, p. 287-297, 2002.

PELEG, A.Y.; *et al.* Reduced susceptibility to vancomycin influences pathogenicity in *Staphylococcus aureus* infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 199, p. 532-536, 2009a.

PELEG, A.Y.; *et al.* *Galleria mellonella* as a Model System to Study *Acinetobacter baumannii* Pathogenesis and Therapeutics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 6, p. 2605–2609, 2009b.

PEREIRA, A. J. P.; KNOBL, T. Colibacilose. In: JÚNIOR, A. B. *et al.* **Doenças das aves**. 2. ed. Campinas, São Paulo, Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, p. 457-471, 2009.

PILATTI, L. *et al.* The virulence factor *ychO* has a pleiotropic action in an Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strain. **BMC Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 1-12, 2016.

RAHMAN, M.A. *et al.* Bacterio-pathological studies on salmonellosis, colibacillosis and pasteurellosis in natural and experimental infections in chickens. **Bangladesh Journal of Veterinary Medicine**, v. 2, n. 1, p. 1-8, 2004.

RAMARÃO, N.; NIELSEN-LEROUX, C.; LERECLUS, D. The insect *Galleria mellonella* as a powerful infection model to investigate bacterial pathogenesis. **Journal of Visualized Experiments**, v. 70, p. 1-7, 2012.

RATCLIFFE, N. A.; ROWLEY, A. F. Role of hemocytes in defence against biological agents. In: Gupta AP (Ed.) **Insect hemocytes development, forms, functions and techniques**. Cambridge University Press, Cambridge, 1979, p. 331-414

REJASSE, A.; *et al.* Temperature-dependent production of various PlcR-controlled virulence factors in *Bacillus weihenstephanensis* strain KBAB4. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, p. 2553-2557, 2012.

ROCHA, S. L. S. *et al.* Classificação de *Escherichia coli* patogênica aviária (APEC) e de *Escherichia coli* uropatogênica (UPEC) em grupos filogenéticos e associação com a patogenicidade *in vivo*. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 45, p. 1-8, 2017.

SADEYEN, J.-R. *et al.* Immune responses associated with homologous protection conferred by commercial vaccines for control of avian pathogenic *Escherichia coli* in turkeys. **Veterinary Research**, v. 46, p. 1-5, 2015.

SALAMITOU, S. *et al.* The plcR regulon is involved in the opportunistic properties of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* in mice and insects. **Microbiology**, v. 146, n. 11, p. 2825-2832, 2000.

SALZET, M. Vertebrate innate immunity resembles a mosaic of invertebrate immune responses. **Trends Immunology**, v. 22, n. 6, p. 285-288, 2001.

SCHOULER, C. *et al.* Genomic subtraction for the identification of putative new virulence factors of an avian pathogenic *Escherichia coli* strain of O2 serogroup. **Microbiology**, v. 150, p. 2973–2984, 2004.

SCORZONI, L.; *et al.* Antifungal efficacy during *Candida krusei* infection in non-conventional models correlates with the yeast *in vitro* susceptibility profile. **PLoS One**, v. 8, p. 1-13, 2013.

SENIOR, N. J. *et al.* *Galleria mellonella* as an infection model for *Campylobacter jejuni* virulence. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, n. 5, p. 661-669, 2011.

SHAURUB, E. H. Immunomodulation in insects post-treatment with abiotic agents: a review. **European Journal of Entomology**, v. 109, n. 3, p. 303-316, 2012.

SIGLE, L. T.; HILLYER, J. F. Mosquito hemocytes preferentially aggregate and phagocytose pathogens in the periostial regions of the heart that experience the most hemolymph flow. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 55, p. 90-101, 2016.

SIVA-JOTHY, M. T.; THOMPSON, J. J. W. Short-term nutrient deprivation affects immune function. **Physiological Entomology**, v. 27, p. 206-212, 2002.

SODERHALL, K.; CERENIUS, L. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. **Current Opinion in Immunology**, v. 10, p. 23-28, 1998.

SOUZA, G. F. *et al.* Classification of Avian Pathogenic *Escherichia coli* by a Novel Pathogenicity Index Based on an Animal Model. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 44, p. 1347-1352, 2016.

STEPHENS, J. M. Immune responses of some insects to some bacterial antigens. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 5, p. 203-228, 1959.

STEPHENS, J. M. Protective effects of several immunizing preparations that produce active immunity in *Galleria mellonella* (Linnaeus). **Journal of Insect Pathology**, v. 5, p. 129, 1963.

STRAND, M. R.; PECH, L. L. Immunological basis for compatibility in parasitoid-host relationships. **Annual Review of Entomology**, v. 40, p. 31-56, 1995.

TANG, H. Regulation and function of the melanization reaction in *Drosophila*. **Fly**, v. 3, p. 105-111, 2009.

TEJKOWSKI, T. M. **Uso de redes neurais artificiais para classificação da patogenicidade de *Escherichia coli* de origem aviária**. 2013. 64f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 2013.

TORRES, M. P.; ENTWISTLE, F.; COOTE, P. J. Effective immunosuppression with dexamethasone phosphate in the *Galleria mellonella* larva infection model resulting in enhanced virulence of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 205, p. 333-343, 2016.

TSAI, C.J.; LOH J. M.; PROFT, T. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. **Virulence**, v. 7, n. 3, p. 214-229, 2016.

VIEGAS, S. C. *et al.* The virulence of *Salmonella enterica* serovar typhimurium in the insect model *Galleria mellonella* is impaired by mutations in RNase E and RNase III. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 19, p. 6124-6133, 2013.

VILCINSKAS, A. Anti-infective therapeutics from the Lepidopteran model host *Galleria mellonella*. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, p. 1240-1245, 2011.

WAND, M. E. *et al.* Complex interactions of *Klebsiella pneumoniae* with the host immune system in a *Galleria mellonella* infection model. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. 12, p. 1790-1798, 2013.

WHITE, D. G.; DHO-MOULIN, M.; WILSON, R. A.; WHITTAM, T. S. Clonal relationships and variation in virulence among *Escherichia coli* strains of avian origin. **Microbial Pathogenesis**, v. 14, p. 399-409, 1993.

WILLIAMSON, D. A. *et al.* *In vivo* correlates of molecularly inferred virulence among extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) in the wax moth *Galleria mellonella* model system. **Virulence**, v. 5, n. 3, p. 388-393, 2014.

WOJDA, I. *et al.* The greater wax moth *Galleria mellonella*: biology and use in immune studies. **Pathogens and Disease**, v. 78, n. 9, p. 1-15, 2020.

WU, G.; XUA, L.; YIA, Y. *Galleria mellonella* larvae are capable of sensing the extent of priming agent and mounting proportionatal cellular and humoral immune responses. **Immunology Letters**, v. 174, p. 45-52, 2016.

WU, X. *et al.* The role of the *ptsI* gene on AI-2 internalization and pathogenesis of avian pathogenic *Escherichia coli*. **Microbial Pathogenesis**, v. 113, p. 321-329, 2017.

YOGARATNAM, V. Analysis of the causes of high rates of carcass rejection at a poultry processing plant. **The Veterinary Record**, v. 137, p. 215–217, 1995.

ZDYBICKA-BARABAS, A. *et al.* Lysozyme and defense peptides as suppressors of phenoloxidase activity in *Galleria mellonella*. **Insect Biochemistry and Physiology**, v. 87, n. 1, p. 1-12, 2014.

ZDYBICKA-BARABAS, A. *et al.* Synergistic action of *Galleria mellonella* apolipoprotein III and lysozyme against Gram-negative bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1828, n. 6, p. 1449-1456, 2013.

APÊNDICE A – Identificação, origem e grupo filogenético das amostras APEC

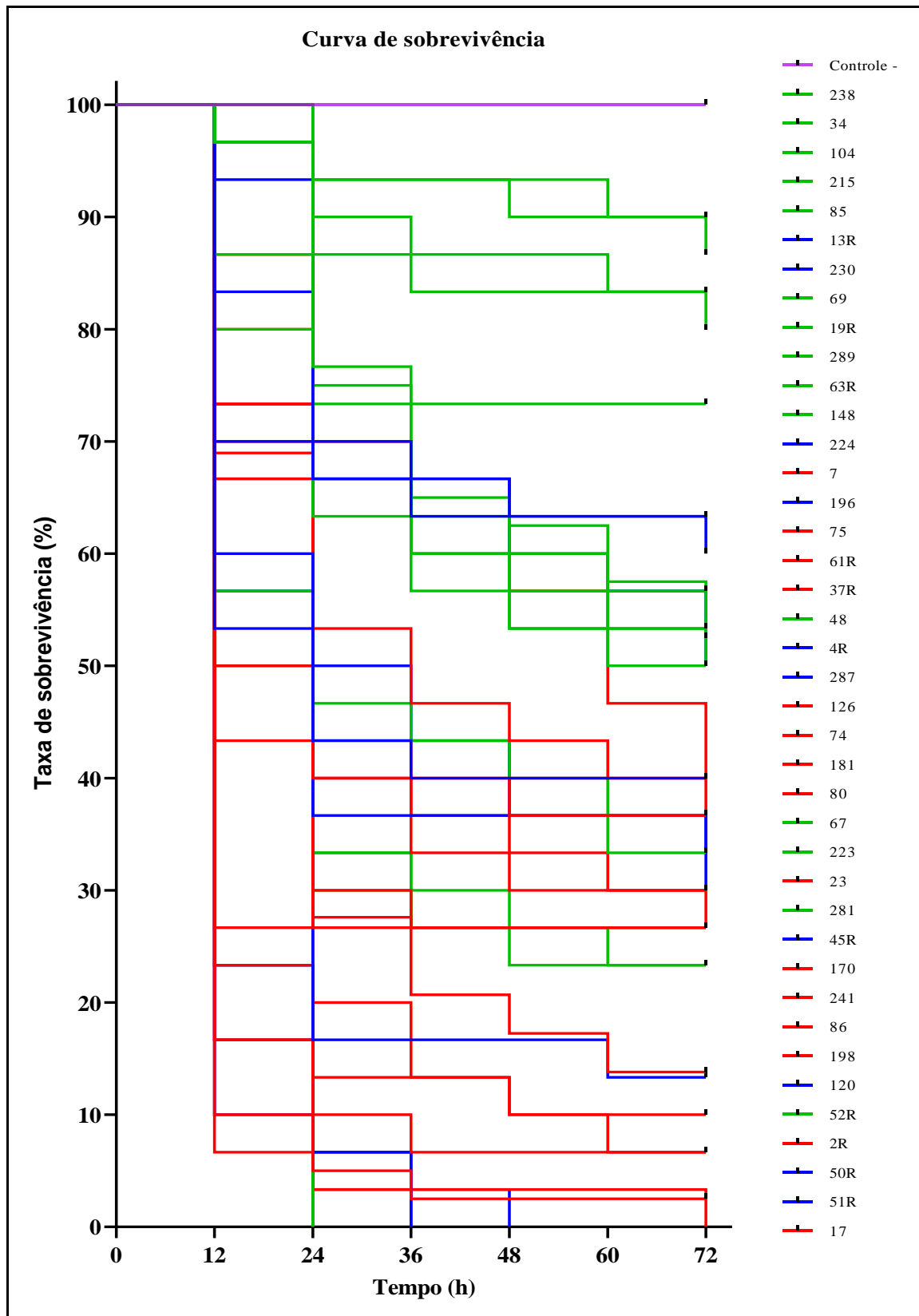
Número	Identificação da cepa	Origem de isolamento	Grupo Filogenético
1	7	celulite	D
2	17	celulite	D
3	23	celulite	B1
4	34	celulite	B1
5	48	celulite	A
6	67	celulite	A
7	69	celulite	A
8	74	celulite	B2
9	75	celulite	B2
10	80	celulite	A
11	85	cama aviária	B1
12	86	celulite	D
13	104	celulite	B1
14	120	cama aviária	A
15	126	celulite	B2
16	148	cama aviária	A
17	170	celulite	A
18	181	celulite	B2
19	196	celulite	D
20	198	celulite	D
21	215	cama aviária	B1
22	223	celulite	B1
23	224	celulite	D
24	230	cama aviária	A
25	238	celulite	B1
26	241	cama aviária	B2
27	281	cama aviária	D
28	287	cama aviária	D
29	289	celulite	B1
30	13R	respiratória	B2
31	19R	respiratória	B2
32	2R	respiratória	D
33	37R	respiratória	D
34	45R	respiratória	B2
35	4R	respiratória	B1
36	50R	respiratória	D

APÊNDICE A – Identificação, origem e grupo filogenético das amostras APEC

(continua)

Número	Identificação da cepa	Origem de isolamento	Grupo Filogenético
37	51R	respiratória	A
38	52R	respiratória	B2
39	61R	respiratória	B1
40	63R	respiratória	B1

APÊNDICE B – Curva de sobrevivência das larvas de *G. mellonella* após desafio com cepas APEC ($n=40$)



Legenda: Cores das linhas contínuas (APEC) = verde, patogenicidade baixa ($IP \leq 1,99$); azul, patogenicidade intermediária ($IP 2$ a $4,99$); vermelho, patogenicidade alta ($IP \geq 5$);

ANEXO A – Carta de Aprovação do Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA-UFRGS)



UFRGS
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 37010

Título: Galleria mellonella como modelo de infecção para o estudo da patogenicidade de Escherichia coli patogênica aviária (APEC)

Vigência: 01/05/2019 à 31/12/2021

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

CARLOS TADEU PIPPI SALLE - coordenador desde 01/05/2019
HAMILTON LUIZ DE SOUZA MORAES - pesquisador desde 01/05/2019
THALES QUEDI FURIAN - pesquisador desde 01/05/2019
KAREN APELLANIS BORGES FURIAN - pesquisador desde 01/05/2019
GABRIELA ZOTTIS CHITOLINA - Analista de Laboratório desde 01/05/2019
Elisar Camilotti - Médico Veterinário desde 01/05/2019

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 1360 pintos Gallus gallus domesticus, de um dia de idade, saudáveis, de ambos os sexos, da linhagem corte, provenientes da Granja Pinheiros Ltda (CNPJ número 87.702.528/0001-90, Rua da Pedreira, 1019 - Linha Imperial, Nova Petrópolis - RS, CEP: 95150-000); de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Porto Alegre, Sexta-Feira, 7 de Junho de 2019

ALEXANDRE TAVARES DUARTE DE OLIVEIRA
Coordenador da comissão de ética