

Caenorhabditis elegans como modelo de infección para el estudio de antimicrobianos

Caenorhabditis elegans as an infection model for the study of antimicrobials

Dayana Rodríguez Morales¹, Yenny Yolanda. Lozano Jiménez², Ruth Mélida Sánchez Mora³

Resumen

A pesar de algunas limitaciones éticas, los animales juegan un papel importante como anfitriones sustitutos para investigar los mecanismos fisiopatológicos de enfermedades con el fin de indagar en ellos medicamentos contra diferentes patologías. Uno de los grandes problemas en salud pública a nivel mundial en el contexto farmacológico es la producción de antibióticos y la ocurrencia de resistencia microbiana, además, cada vez resulta más complejo el uso de modelos animales por las restricciones bioéticas actuales, no obstante, es necesario usar modelos simples en los estudios preliminares que permitan evaluar las interacciones huésped-patógeno-antimicrobiano. Al validar que *Caenorhabditis elegans* es susceptible a varias bacterias y además tiene la capacidad de responder a estímulos ambientales con cambios observables en el comportamiento tras ser alimentado con diversas bacterias, resulta muy útil usarlo en este tipo de investigaciones ya que tiene una vida promedio corta y no cuenta con restricciones éticas para su uso. Por lo anterior, en este artículo se revisa la susceptibilidad que tiene *C. elegans* de infectarse con diferentes bacterias, además, ya que aún no se ha validado completamente como modelo para poner a prueba antimicrobianos se propone que este nematodo es útil como modelo *In vivo* para evaluar infecciones y tratamientos antibacterianos.

Palabras claves: *caenorhabditis elegans*, modelo, nematodo, bacterias, antimicrobiano, antibióticos, infección.

1. Grupo Biotecnología y genética UCMC. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.
CvLAC: https://scienti.minciencias.gov.co/cvlac/visualizador/generarCurriculoCv.do?cod_rh=0000176007
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9511-8583>
Google académico: <https://scholar.google.es/citations?hl=es&user=soG6YX4AAAAJ>

2. Universidad de La Salle, Departamento de Ciencias Básicas. Grupo entomología y enfermedades transmitidas por vectores
CvLAC: https://scienti.minciencias.gov.co/cvlac/visualizador/generarCurriculoCv.do?cod_rh=0000858790
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5419-2971>
Google académico: <https://scholar.google.es/citations?hl=es&user=pErlypQAAAAJ>

3. Grupo biotecnología y genética UCMC. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.
CvLAC: https://scienti.minciencias.gov.co/cvlac/visualizador/generarCurriculoCv.do?cod_rh=0000464252
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0572-8418>
Google académico: <https://scholar.google.es/citations?hl=es&user=6yJh6uIAAAAJ>

Correo electrónico de correspondencia: drodriguez@unicolmayor.edu.co - yylozano@gmail.com - rmsanchezm@unicolmayor.edu.co

Abstract

Despite some ethical limitations, animals play an important role as surrogate hosts in investigating the pathophysiological mechanisms of disease in order to test drugs against different pathologies. One of the great problems in public health worldwide in the pharmacological context is the production of antibiotics and the occurrence of microbial resistance, the use of animal models is becoming increasingly complex due to current bioethical restrictions, however, it is necessary to use models simple in preliminary studies that allow evaluating host-pathogen-antimicrobial interactions. Validating that *Caenorhabditis elegans* is susceptible to various bacteria and also has the ability to respond to environmental stimuli with observable changes in behavior after being fed with various bacteria, it is very useful to use it in this type of research since it has a short average life and does not have ethical restrictions for its use. Therefore, this article reviews the susceptibility of *C. elegans* to become infected with different bacteria, in addition, since it has not yet been fully validated as a model to test antimicrobials, it is proposed that this nematode is useful as an in vivo model. to evaluate infections and antibacterial treatments.

Keywords: *caenorhabditis elegans*, model, nematode, bacteria, antimicrobial, antibiotics, infection.

Introducción

Diferentes campos de investigación a través del avance de la ciencia se han centrado en contribuir a la salud y al mejoramiento de la calidad de vida por medio de la producción de fármacos o sustancias que inhiban la progresión o desarrollo de una enfermedad, la clave para esto se basa en la comprensión de los organismos modelos para el estudio, donde se destacan animales primates, porcinos, roedores entre otros (1, 2). A pesar de algunas limitaciones, los animales juegan un papel importante como anfitriones sustitutos para investigar los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad y para poner a prueba en ellos medicamentos contra dicha patología.

Es importante destacar que el uso de animales en la investigación se guía por la promoción de un marco ético como el descrito por William Russell y Rex Birch hace más de 50 años donde estipulan que los animales deben ser reemplazados cuando sea posible, o donde esto no sea posible, los estudios deben usar métodos que reduzcan el número de animales requeridos y los procedimientos deben minimizar al máximo el dolor, el sufrimiento y la angustia (1,3,4). Es por ello que se han popularizado huéspedes de reemplazo que incluyen invertebrados como la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, las larvas de la polilla de cera mayor *Galleria mellonella* o el nematodo *Caenorhabditis elegans* (1).

Dentro de las mayores problemáticas de salud pública a nivel mundial en el ámbito farmacológico se destaca la producción de antibióticos, pues actualmente las bacterias son un gran problema ya que a través del tiempo estos microorganismos han desarrollado la capacidad de infectar a una gran variedad de especies susceptibles y muchas de estas bacterias han generado “resistencia” a ciertos medicamentos libres en el mercado (1, 3). Un informe de la Organización Mundial de la Salud describe cómo las bacterias resistentes a los antibióticos están presentes en todas las regiones del mundo, y que muchos países carecen incluso de los sistemas básicos para rastrear y controlar estos microbios peligrosos (1). A todo esto, se le suma la automedicación, el uso desmedido y el fácil acceso a los antibióticos existentes como predisposición para generar resistencia y como consecuencia el daño sustancial o la muerte de diferentes seres vivos en el mundo.

Es por ello, que en los últimos años los estudios se han centrado en desarrollar antimicrobianos efectivos capaces de inhibir bacterias patógenas, de hecho esto radica como prevención y urge la necesidad de incluir al sistema farmacológico medicamentos que den cobertura a aquellas cepas que actualmente ningún antibiótico existente logra controlar. Sin embargo, los antibióticos en desarrollo han tenido limitaciones para su validación, pues en su gran mayoría inicialmente se verifican en modelos *In vitro*, a partir de medios

convencionales de crecimiento bacteriano o en líneas celulares, luego de aprobar este proceso, se usan animales complejos y finalmente la ratificación en humanos lo que prolonga el tiempo del estudio (5).

No obstante, cada vez resulta más difícil usar modelos animales por todas las limitaciones bioéticas existentes y aunque en la primera fase experimental a nivel *In vitro* es efectiva, después la mayoría de medicamentos fracasan porque no se tiene en cuenta que el huésped infectado está conformado por un sistema completo de células, proteínas y al mismo tiempo respuestas fisicoquímicas que vuelven contraproducente el tratamiento, lo que hace necesario usar un modelo desde los inicios de la propuesta para ahorrar tiempo (1, 6). Para ello es necesario usar modelos simples en los estudios preliminares que permitan evaluar las interacciones huésped-patógeno-antimicrobiano.

Las características esenciales de un modelo infeccioso radican en la capacidad que tiene el animal de tener una homología significativa con el ser humano, así como montar respuestas inmunes completas y ser sensible a una gran variedad de infecciones con el fin de permitir entender diferentes condiciones que contribuyan a comprender dicha relación y agilizar los procesos investigativos de los fármacos propuestos. Por otro lado es importante determinar hospederos, que sean de fácil manejo y sin tantas restricciones éticas, de esta forma el modelo permitirá ofre-

cer soluciones a las problemáticas actuales que perjudican la calidad de vida de los seres vivos (1, 2, 4, 5).

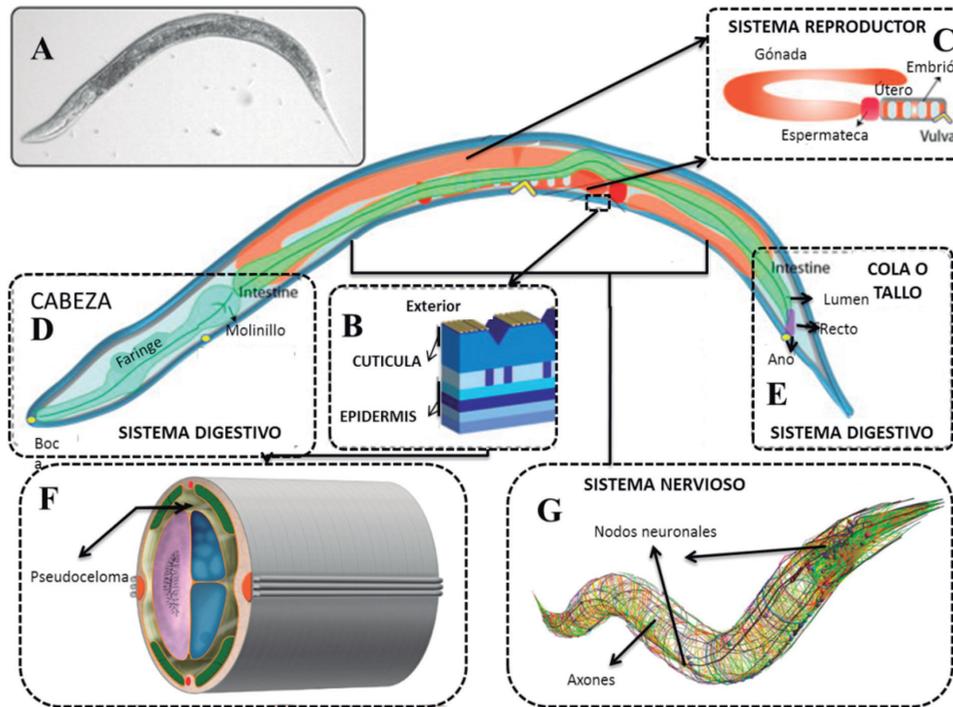
Hasta el momento, *Caenorhabditis elegans* ha demostrado ser susceptible a varias bacterias, con la capacidad de responder a estímulos ambientales con cambios observables en el comportamiento tras las infecciones. Por otro lado su estado de salud es estable al consumir su alimento normal de laboratorio (*Escherichia coli* OP50), es por ello que resulta muy útil usarlo en este tipo de investigaciones, adicionalmente *C. elegans* tiene una vida promedio corta y no cuenta con restricciones éticas para su uso (7). Por lo anterior, en este artículo se revisa la susceptibilidad que tiene *C. elegans* de infectarse con diferentes bacterias y al no estar validado completamente como modelo para poner a prueba antimicrobianos, se propone que este nematodo puede ser útil como modelo *In vivo* de infecciones y tratamientos bacterianos.

Generalidades del modelo *Caenorhabditis elegans*

Caenorhabditis elegans (*C. elegans*) fue inicialmente descrito y nombrado *Rhabditis elegans*, señalado por su valor potencial en la investigación genética (8), posteriormente fue colocado en el género *Caenorhabditis* (9). Su nombre es una mezcla de griego y latín (*Caeno*; reciente, *rabditis*; vara, *elegans*; bonito) (10, 11). Este nematodo está estrictamente relacionado con eucariotas y dado a los diferentes hallazgos hasta el momento existe una estrecha relación evolutiva con algunos mamíferos, haciendo correlación directa del 36% con el ser humano (12). *C. elegans* es de vía libre, tiene un tamaño inicial de 0.25 milímetros de largo y al llegar a la adultez mide 1.5 milímetro aproximadamente, se encuentra distribuido en todo el mundo, su principal alimento son las bacterias, su temperatura ideal oscila entre los 12-25°C durante todo su desarrollo y no son considerados patógenos para mamíferos, puesto que temperaturas superiores a los 30° inhabilitan su desarrollo (11, 12).

Este modelo tiene tejidos muy bien definidos y como todos los nematodos tienen una simetría corporal básica compuesto por dos tubos concéntricos separados por el “pseudoceloma” que aloja los sistemas de órganos principales y da la forma al animal, también, consta de una epidermis que protege los sistemas y a su vez cumple funciones neuromusculares junto con una cutícula colágena, además, la cavidad pseudocelómica, albergan los celomocitos, que actúan como carroñeros en la cavidad corporal. (11, 12). En este nematodo se han descrito tres sistemas muy bien definidos; el sistema reproductor, el nervioso y el digestivo, es por ello que algunas enfermedades e infecciones que involucran estos sistemas se pueden esclarecer en este modelo de laboratorio, Figura 1.

Figura 1. Anatomía de *C. elegans* adulto. (A): se observa una fotografía real del nematodo. (B): Conformación externa del nematodo. (C): Sistema reproductor. (D y E): Sistema Digestivo. (F): Líquido Pseudoceloma. (G): Sistema Nervioso.



Fuente: Tomado y Modificado de: Gonzalez-Moragas G. y colaboradores (13), Wormatlas (14), Prevedel R. y colaboradores (15).

El ciclo de vida de este invertebrado dura aproximadamente 3 a 4 días desde la embriogénesis hasta el adulto que pone huevos y su tamaño va aumentando proporcionalmente durante cada etapa larval L1, L2, L3 y L4 (11). Después del período reproductivo, los nematodos pueden vivir varias semanas más, antes de morir de senescencia (12). *C. elegans* tiene dos sexos naturales; XO machos y XX hembras hermafroditas. Los hermafroditas son simplemente hembras autofértiles y su puesta de huevos está entre los 300-350 por un solo animal, sin embargo, cuando ambos sexos están presentes, la hembra es muy receptiva y se aparea con el macho, en este caso la progenie es mucho más alta y logra producir más de 1000 descendientes cuando se aparea (16, 17).

Susceptibilidad bacteriana en el modelo *Caenorhabditis elegans*

Uno de los primeros agentes infecciosos utilizados en el modelo de *C. elegans* es la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas fluorescens* quien tiene la capacidad de causar muerte en los nematodos en la cepa silvestre N2 (18, 19). La muerte de los nematodos está mediada por las toxinas de esta bacteria segregadas durante la infección (20). Un estudio revela que el cianuro de hidrógeno es un factor tóxico producido por *P. aeruginosa* y es responsable de la muerte del nematodo (21). Por otro lado algunas cepas de *Pseudomonas spp* pueden causar un efecto letal que se asocia con una parálisis neuromuscular (22).

Así mismo la enterobacteria *Salmonella typhimurium*, es capaz de infectar y matar a *C. elegans* (23). Las bacterias se acumulan en la luz intestinal y los nematodos mueren en el transcurso de varios días (24). En consecuencia *Salmonella enteritidis* causa una infección persistente en el intestino de *C. elegans* y desencadena la muerte celular programada (PCD) (25). Es importante mencionar que gracias al modelo *C. elegans* - *Salmonella* es posible identificar factores de virulencia nuevos y previamente conocidos (26). Más aun, diferentes especies de *Burkholderia spp* matan a este nematodo utilizando una parálisis mediada por endotoxinas (27). Uno de los estudios sobre *Burkholderia pseudomallei* y *C. elegans* mostró que la fuerza de la virulencia de diferentes aislados clínicos es similar tanto en nematodos como en vertebrados superiores, lo que sugiere la presencia de un mecanismo evolutivamente conservado (28).

Garsin D. y colaboradores demostraron que las bacterias Gram positivas como *Enterococcus faecalis* y *Streptococcus pneumoniae* matan a *Caenorhabditis* (29), además, *Streptococcus pyogenes* asesina al nematodo, tanto en medios líquidos como en sólidos, esta muerte está mediada por peróxido de hidrógeno y para que el nematodo muera se requieren bacterias vivas, pues en algunos casos él se ve afectado por microorganismos incluso cuando están muertos, sin embargo, en algunas ocasiones la producción de catalasa puede inhibir la muerte. A diferencia de las infecciones con *S. typhimurium* o *P. aeruginosa* no se observa acumulación bacte-

riana de *S. pyogenes* en el interior *C. elegans*, lo que excluye la participación de procesos similares de infección por cada bacteria (30). Por el contrario *Staphylococcus aureus* extermina al nematodo en el transcurso de varios días en un proceso que se correlaciona con la acumulación de bacterias dentro de su tracto digestivo (31).

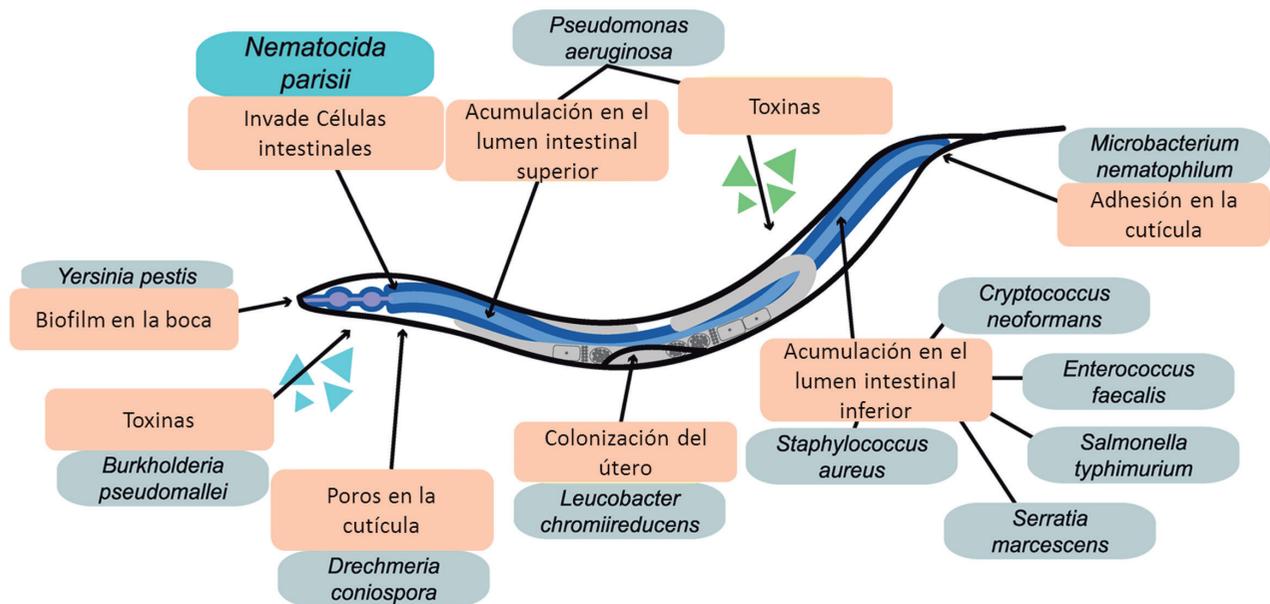
Otro de los hallazgos importantes es que algunos agentes pueden inducir cambios morfológicos en el nematodo como *Microbacterium nematophilum*, pues estas bacterias se adhieren a la cutícula rectal y posanal de los nematodos susceptibles, e inducen una hinchazón local sustancial del tejido hipodérmico subyacente. La hinchazón conduce al estreñimiento y al crecimiento lento del animal infectado, pero la infección no es letal (32). En este orden de ideas *Serratia marcescens*, también es capaz de infectar al nematodo e inducir una respuesta inmune dentro del organismo del nematodo (33). *Yersinia pestis*, la bacteria causante de la peste bubónica fue utilizada en este invertebrado para determinar la formación de Biofilm dentro del nematodo, los resultados arrojan que este microorganismo obstruye las vías de alimentación causando su muerte, de hecho, algunas cepas de *C. elegans* mutantes son resistentes a la formación de biopelículas, por lo tanto, ofrece un sistema experimental potencialmente útil para investigar interacciones mediadas por Biofilm entre bacterias e invertebrados (34, 35).

Otras investigaciones sugieren que cuando *C. elegans* es alimentado con; *Streptoverti-*

cillium albireticuli, *Bacillus megaterium*, *Shewanella frigidimarina*, *Shewanella massilia*, *Aeromonas hydrophila*, *Photobacterium luminescens*, *Xenorhabdus nematophila*, dichos microorganismos generan una reacción ne-

matocida (19, 36). Uno de los estudios que resumen algunas bacterias que afectan al nematodo por la acumulación bacteriana en cavidades corporales se expresa en la Figura 2, a través de un diagrama anatómico (37).

Figura 2. Microorganismos nematocidas en *C. elegans*.

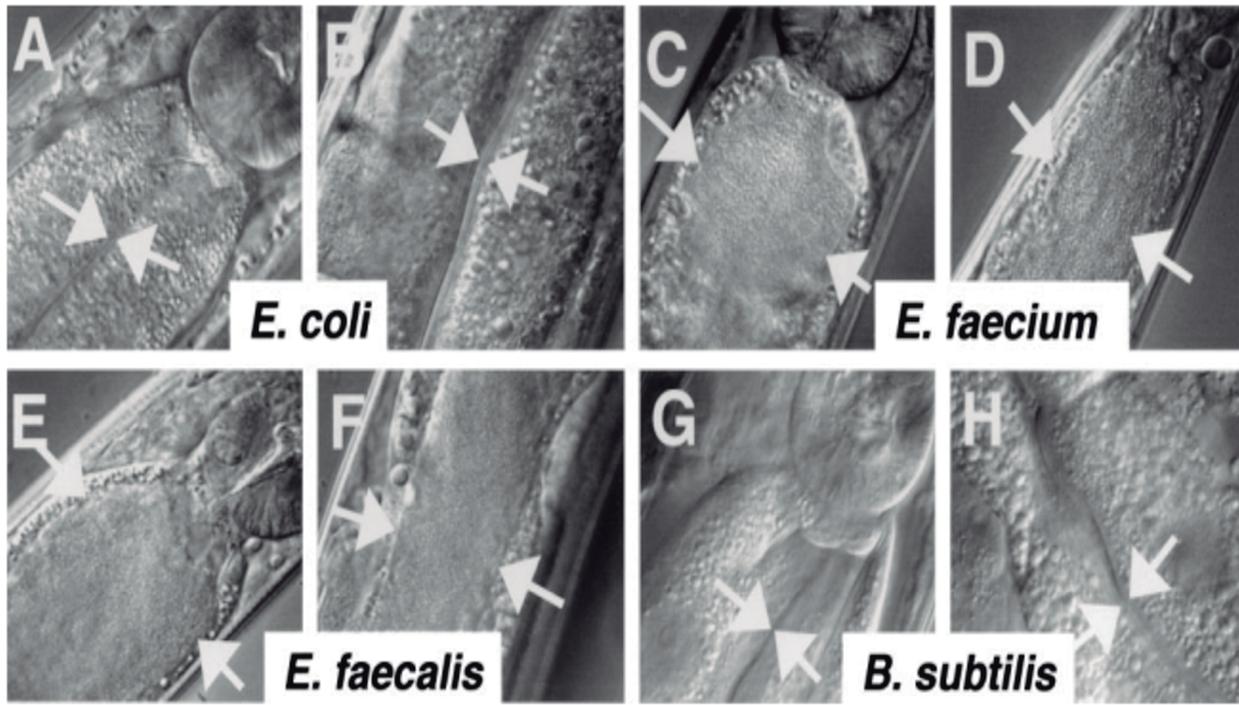


Fuente: Tomado y Modificado de: Hodgkin J. y colaboradores (37).

Es importante mencionar que cuando los nematodos se alimentan con su dieta estándar de laboratorio (la cepa OP50 de *Escherichia coli*), las bacterias no se encuentran dentro de la luz intestinal hasta 48 horas después de la última etapa larval (L4), y no provocan daño tisular extenso hasta el día de su muerte, alguna inhibición en su ciclo de vida o morfología común; por el contrario funciona como una fuente de alimento prolongando a diferencia de las bacterias mencionadas anteriormente que causan la muerte o algún perjuicio en el nematodo (33). No obstante, aún no se conoce un perfil completo de la reacción de *C. elegans*

ante todos los microorganismos o agentes infecciosos, sin embargo, se sabe que *Bacillus subtilis*, *Erwinia chrysanthemi*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Brucella sp* cepa 96-566 y *Mycobacterium fortuitum* ATCC 6841 no causan enfermedades evidentes y por consiguiente no asesinan al nematodo (19, 29). Por lo anterior se puede afirmar que estos agentes y muchos otros más sin estudiar pueden ser útiles para alimentar el nematodo. En la Figura 3, se puede observar la acumulación e infección bacteriana con respecto a aquellas bacterias que no afectan el nematodo.

Figura 3. *C. elegans* alimentado con *E. coli* y *B. subtilis* no se ve afectado ni hay acumulación bacteriana en comparación del consumo con *E. faecalis* y *E. faecium*.



Fuente: Tomado de: Garsin DA. y colaboradores (29).

En cuanto a los agentes micóticos se sabe que *C. elegans* puede usar varias levaduras, incluidas *Cryptococcus laurentii* y *Cryptococcus kuetsingii*, como única fuente de alimento, produciendo tamaños de cría similares tras el consumo *E. coli* OP50. Sin embargo, la levadura patógena humana *Cryptococcus neoformans* mata al nematodo (38). De modo similar *Candida albicans* y *Candida auris* son ingeridas por *C. elegans* y establecen una infección letal persistente en la vía intestinal del nematodo (39). Es importante destacar que los componentes clave de la patogénesis de *Candida sp* en mamíferos también están involucrados en la muerte de *C. elegans* (40). En los medios líquidos, las células de levadura experimentan un cambio morfológico para formar hifas, lo que

resulta en una destrucción agresiva del tejido y la muerte del nematodo (41).

Mecanismos de defensa y patogenia de *C. elegans* ante infecciones mediadas por microorganismos

El contacto constante de *C. elegans* con microbios transmitidos por el suelo sugiere que este nematodo debe haber desarrollado respuestas protectoras contra los patógenos. Inicialmente no se tenía claro cómo funcionaba la inmunidad de este animal, es por ello que Mallo G. y colaboradores buscan comprender el sistema inmune de este invertebrado y realizan una infección con

Serratia marcescens, obteniendo como resultado la expresión de gran cantidad de genes tras el contagio (33). Actualmente se sabe que *C. elegans* puede protegerse de los pa-

tógenos a través del uso de barreras físicas, proteínas efectoras y vías de señalización, la Tabla 1, resume estos mecanismos.

Tabla 1. Mecanismos de defensa de *C. elegans*. PNL: neuropéptidos, CNC: caenacinas, MAPK: proteína quinasa activadas por mitógenos, TGF- β : Factor de Crecimiento Transformante β , Daf-2: Gen que codifica un receptor insulínico en *C. elegans*. IGF-I: factor de crecimiento insulínico tipo I, TLR: Toll Like Receptor, ABF: Proteínas factor antibacteriano.

MECANISMOS DE DEFENSA <i>Caenorhabditis elegans</i>		
BARRERAS FÍSICAS	Cutícula	Primera línea de defensa, hinchazón y síntesis de PNL y CNC
	Boca	Molinillo o cavidad pseudoceiómica
	Ano	Segunda línea de defensa, vitan la entrada de sustancia y solo actúan como células excretoras y evitan la acumulación de sustancias.
	Vulva	
VÍAS DE SEÑALIZACIÓN	p38 (MAPK)	Relacionado con la muerte celular programada gonadal.
	TGF-P	Induce las larvas Dauer
	DAF-2 insulina / IGF-I	Vida del nematodo y el envejecimiento
	TLR	Están presente pero no parecen desempeñar un papel esencial en la inmunidad de <i>C. elegans</i> , aparentemente se activan ante el peligro
MOLÉCULAS EFECTORAS	Caenopores	Proteínas formadoras de poros que pueden matar bacterias
	Lisozimas	Intervienen en la regulación génica, vías de transducción de señales múltiples y el reconocimiento PAMPs
	ABF-1, ABF-2 y ABF3	Actúan como las defensas de vertebrados

Fuente: Elaboración propia.

Las defensas físicas están mediadas inicialmente con la cutícula quien es la primera defensa del nematodo contra cualquier agente infeccioso que encuentre (42). La epidermis de *C. elegans* está en contacto con numerosos patógenos, existen innumerables microbios bacterianos y fúngicos que atacan a los nematodos después de una unión inicial a la cutícula, causando por ejemplo hinchazón o en otros casos la expresión de genes antimicrobianos que codifican neuropéptidos, (PNL) y una familia de péptidos estrechamente relacionados llamados caenacinas (CNC), (43). Cuando el ingreso patogéni-

co va más allá de la cutícula se pueden ver involucrados la boca, el ano, la vulva o las aberturas sensoriales. Los microbios que ingresan por la boca se encuentran inmediatamente con el molinillo, formado por tres pares de células musculares que se contraen simultáneamente, con el fin de romper los agentes infecciosos a medida que pasan de regreso al intestino. Las cepas mutantes que carecen de molinillo son más susceptibles a ciertas bacterias (42).

Se sabe que los nematodos no acumulan normalmente bacterias en el intestino, sino

que expulsan las mismas a través del ano, es por ello que al observar acumulación de gérmenes dentro de *C. elegans* es un signo claro de infección. Sin embargo una pequeña fracción de agentes infecciosos puede pasar intactos a través de la cutícula y entrar al intestino (42). Una vez en el intestino, algunas bacterias patógenas son capaces de proliferar como se mencionó anteriormente y matar a *C. elegans* mediante un proceso infeccioso o con el uso de toxinas. Por otro lado, este modelo produce una amplia variedad de proteínas y péptidos antimicrobianos potenciales, muchos de estos no tienen equivalentes estructurales en otras especies, y su espectro real de actividades aún no se ha probado (43).

Las primeras proteínas descritas fueron las de tipo saposina (SPP; también conocidas como caenopores, una familia numerosa, con 28 genes diferentes que codifican al menos 33 proteínas distintas), (44). Los caenopores comparten características estructurales y funcionales con los amebopores y con las proteínas citotóxicas de los vertebrados como la granulicina y NK-lisina, en común estas proteínas son formadoras de poros que pueden matar bacterias, se expresan predominantemente en el intestino de *C. elegans* y su activación es modulada por bacterias patógenas específicas (43, 44).

Una segunda clase de proteínas antimicrobianas bien caracterizadas son las lisozimas, de las cuales hay 15 en *C. elegans*, se cree que se secretan en la luz intestinal, donde actúan directamente sobre los microbios, de

hecho, ciertas lisozimas han demostrado ser importantes para la resistencia del nematodo a patógenos bacterianos Gram-positivos y Gram-negativos; estas, muestran patrones complejos de regulación génica y parecen ser objetivos de vías de transducción de señales múltiples y el reconocimiento de patógenos (43).

Tras diversas investigaciones se han descrito seis péptidos del factor antibacteriano homólogo (ABF) en *C. elegans*. Estos péptidos son algo similares a las defensinas de vertebrados. Basado en su secuencia, se cree que las proteínas ABF mata microbios por disrupción de membrana, las cuales se expresan conjuntamente (ABF-1, ABF-2 y ABF-3); ABF-2 principalmente en los tejidos faríngeos, mientras que ABF-3 se detectan en el intestino y ABF1 en ambas zonas (33). Cabe resaltar que el ABF-2 recombinante tiene una actividad antimicrobiana de amplio espectro demostrada *In Vitro*, con el mayor efecto observado en bacterias Gram-positivas (45).

En cuanto a las vías de señalización algunos estudios demuestran que los genes inducidos en infecciones por patógenos de mamíferos son homologas y se expresan durante la infección en el nematodo, (38). Por ejemplo, en el ser humano una de las vías más relevantes son la ruta p38 MAP quinasa y la vía de la muerte celular programada, tras diversos estudios se identificaron dos genes homólogos en el nematodo de la ruta de la proteína quinasa activada por mitógeno p38 (MAPK): NSY-1 y SEK-1 quienes

codifican una MAPK quinasa quinasa y una MAPK quinasa respectivamente (31, 42, 46). Asimismo, la disminución de PMK-1 un “p38 MAPK” en nematodos mutados, conduce a mayor susceptibilidad de infección lo anterior permite concluir que esos genes traducen una señal de defensa en el animal (42).

Tras lo anterior algunos investigadores afirman que esta vía de señalización parece ser conservada a través de la filogenia, se sabe que la ruta de señalización MAPK de p38 de mamífero media las respuestas al estrés y se activa por choque térmico, luz ultravioleta (UV), las citoquinas proinflamatorias como la IL-1 o TNF- α , o Lipopolisacáridos bacterianos, (46). La consecuencia de la activación de p38 en células de mamíferos es la muerte celular programada (PCD) (38), En *C. elegans*, existen homólogos que inducen la PCD activada por estrés y ocurre en las células gonadales del nematodo, en respuesta a la irradiación γ o a la alimentación de *Salmonella*. Probablemente dicha muerte celular puede inducirse en otros agentes infecciosos patógenos para el invertebrado. Más aún cuando el animal consume *E. coli* OP50, que es su alimento habitual en el laboratorio se produce un bajo nivel de muerte celular programada gonadal (25).

En un estudio dirigido a examinar varios mutantes definidos de *C. elegans* que poseen pérdida de la función en los genes *esp-2 / sek-1* y *esp-8 / nsy-1*, relacionados con p38 MAPK quinasa parecen estar directamente involucrados en defensa de nematodos con-

tra múltiples patógenos, pues tras la pérdida de dichos genes se encuentra que hay mayor susceptibilidad de muerte en todas las etapas de desarrollo a comparación de la cepa N2, lo que indica que el animal posee una vía de señalización conservada de la “p38 MAP quinasa” importante en la inmunidad del nematodo (31).

Otra vía de señalización asociada a infecciones en *C. elegans* es la relacionada con el factor de crecimiento transformante de tipo TGF- β quien induce la formación de larvas Dauer en estos estadios la larva no se alimenta y presenta una cutícula más gruesa como defensa a factores ambientales externos (46). Una de las últimas vías analizadas es la DAF-2 insulina / IGF-I que se asocia directamente con la vida del nematodo y el envejecimiento (47). Por otro lado, la vía tipo Toll aunque está presente de manera ortóloga no parece desempeñar un papel esencial en la mediación de la inmunidad innata de *C. elegans*. Esto se concluye porque los nematodos con una mutación en *tol-1*, *pik-1*, *ikb-1* o *trf-1* no difieren significativamente de los animales de tipo salvaje en respuesta a diversos patógenos. Sin embargo se relaciona a comportamiento, pues la vía Toll suele asociarse como mecanismo de defensa para mantener a *C. elegans* alejado de sustancias potencialmente dañinas (42).

Uso de *C. elegans* como modelo para validar y demostrar la infección por bacterias

Los organismos invertebrados son cada vez más reconocidos para el estudio de la patogénesis que causan diferentes microorganismos durante una infección. El nematodo *C. elegans* es susceptible a una variedad amplia de infecciones por bacterias, hongos y virus, lo que lo convierte en un modelo útil para el estudio de patógenos y simbiosis (19). Esta relación creciente entre *C. elegans* y microorganismos hace que el nematodo sea considerado un modelo de estudio atractivo a nivel de la interacción huésped-patógeno (42), además, la secuenciación completa del genoma de *C. elegans* indica que al menos el 36% de las 19,000 proteínas predichas tienen homólogos en humanos (22), por lo tanto, a pesar de la enorme distancia evolutiva entre humanos y nematodos, *C. elegans* es un modelo interesante para estudios de numerosos procesos de enfermedades infecciosas.

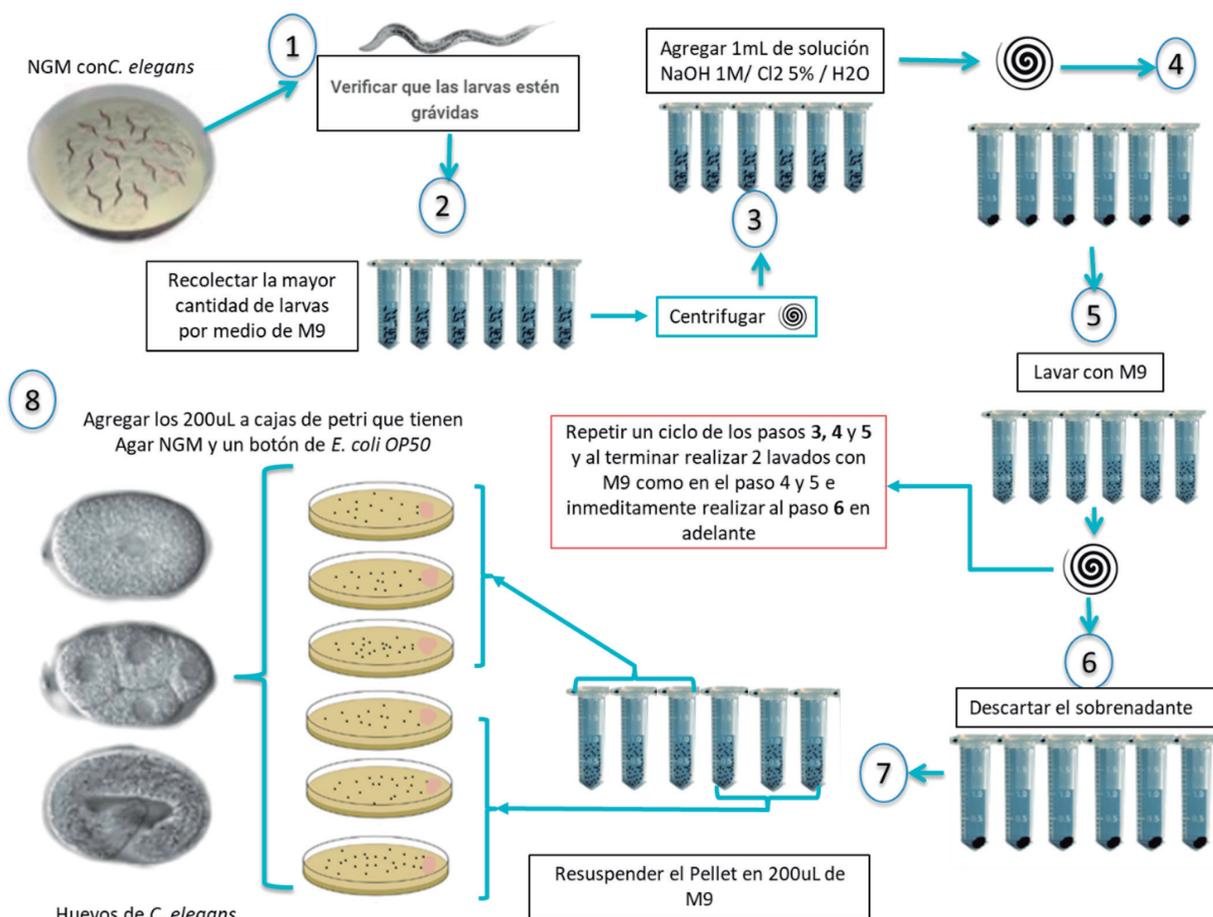
Sincronización de *C. elegans* como método inicial antes de cualquier ensayo

Una de las principales ventajas del modelo de *C. elegans* es su fácil manipulación en el laboratorio. Inicialmente, se pueden obtener nematodos en un mismo estadio del ciclo de vida de una manera rápida y sencilla, lo que permite obtener una población homogénea durante el estudio. Antes de rea-

lizar cualquier ensayo es necesario efectuar una sincronización de los nematodos, esto permite que los animales a estudiar se encuentren en su totalidad en el mismo estadio larvario, bajo las mismas condiciones de nutrición y ambiente. Además, con la sincronización, se obtienen una gran cantidad de huevos que permiten realizar estudios a nivel embrionológico en el modelo. Por otro lado, estos huevos se pueden diferenciar y se obtienen poblaciones en un mismo estadio larvario, estas larvas se pueden exponer a una sustancia o una condición definida, para identificar cambios concluyentes en las características fisiológicas del nematodo (48, 49).

La sincronización es clave para los estudios en el modelo infeccioso de *C. elegans*, pues permiten evaluar todo tipo de respuestas inmunes, ciclos de vida (antes, durante y después de la infección), observar cambios específicos a través del crecimiento y desarrollo pre y post contagio bacteriano, así como analizar la variabilidad morfológica o incluso la muerte. Todas estas características son esenciales para poner a prueba un tratamiento que promueva la mejoría del animal luego del contacto con el microorganismo problema. En la Figura 4, se evidencia el paso a paso de la sincronización según lo estandarizado por el grupo de investigación de Biotecnología y Genética UCMC de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca luego de analizar el protocolo del Wormbook y diferentes protocolos propuestos por otros investigadores (8, 45).

Figura 4. Método de sincronización de *C. elegans* para obtener larvas en un mismo estadio



Fuente: Elaboración propia.

Ensayos fisiológicos en el modelo de infección de *C. elegans*

Los ensayos convencionales son muy útiles para determinar si los nematodos están infectados y si esta infección produjo algún cambio a nivel fenotípico o fisiológico, estos ensayos comienzan desde observar cambios por microscopia, hasta determinar las características de comportamiento que presenta el modelo como variaciones en longevidad, longitud, movilidad y reproducción. Los protocolos de estos ensayos son tomados del Wormbook, sin embargo, se deben

realizar las estandarizaciones dependiendo de la cepa a trabajar así como las variaciones según el enfoque de la investigación (49).

Longevidad

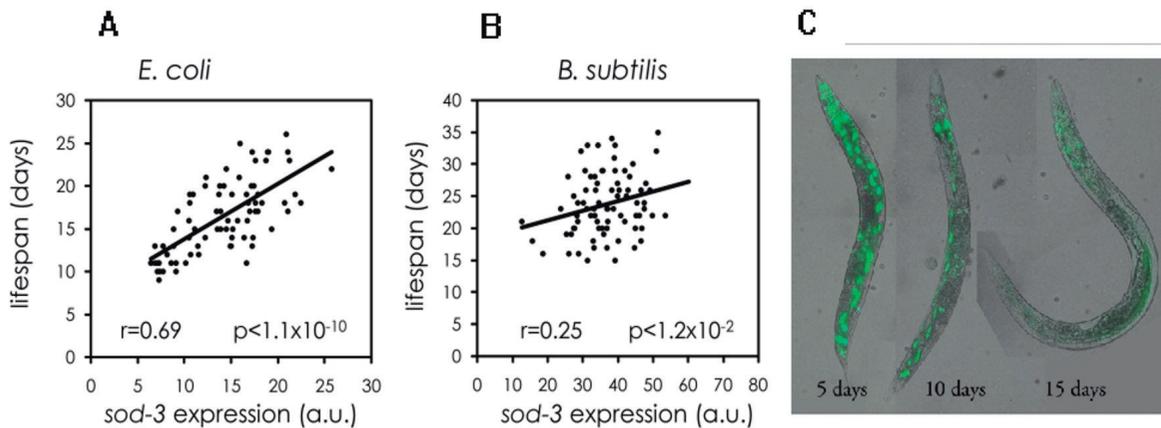
C. elegans es un modelo popular para estudiar el envejecimiento o longevidad debido a su corta vida útil y capacidad de rastreo genético, la medición de longevidad es un método directo que determina las consecuencias del envejecimiento y la muerte. Este procedimiento se fundamenta en contar nematodos vivos y muertos en poblaciones sincronizadas a intervalos de tiempo

regulares que se exponen a una condición como por ejemplo un agente patógeno, para luego generar curvas estadísticas de la vida útil e ilustrar los porcentajes de animales vivos en las poblaciones a lo largo del tiempo (50).

En un estudio realizado por Blanco A. y Kim S. luego de la sincronización de *C. elegans*, permitió evaluar la esperanza de vida tras la exposición del nematodo con *E. coli* y *B. subtilis*, Figura 5A y 5B. La evaluación se realizó durante el desarrollo del nematodo utilizando una cepa transgénica que

contiene un marcador de envejecimiento (*sod-3* unido con la proteína verde fluorescente (GFP)) cuya expresión disminuye con la edad. Este transgénico puede usarse para medir la edad fisiológica del nematodo, Figura 5C. Estos investigadores encontraron que los nematodos alimentados con *B. subtilis* viven más que los nematodos cultivados en *E. coli* y como se indicó anteriormente *B. subtilis* no afecta la vida del nematodo en comparación a otras bacterias que probablemente al usar esta cepa de *C. elegans* pueden disminuir significativamente su esperanza de vida (51).

Figura 5. Esperanza de vida de *C. elegans* *sod-3* marcado con GFP, (A): *C. elegans* alimentado con *E. coli*, (B) *C. elegans* marcado con *B. subtilis* (C) *C. elegans* *sod-3* marcado con GFP.



Fuente: Tomado y modificado de: Sanchez-Blanco A y colaboradores (51).

Movilidad y Longitud

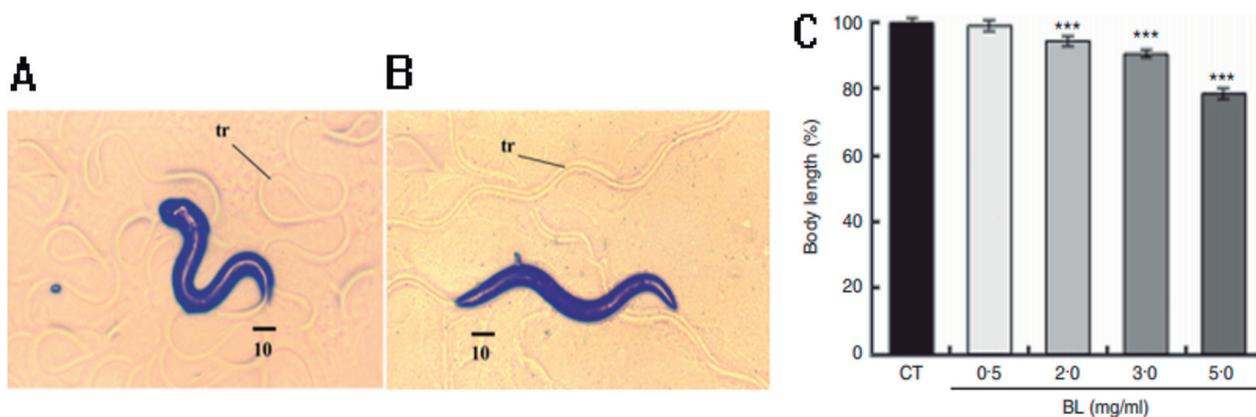
Para la *movilidad* se determinan las ondulaciones realizadas por el nematodo en estadio L4 durante 30 segundos y de la misma forma para el ensayo de *longitud* se miden los nematodos, usualmente tratados con levamisol con el fin de provocar la inmovilización de los nematodos y ser medidos en microscopio de retícula (52, 53).

En un estudio realizado por Joshua P. y colaboradores; Figura 6A y 6B, se puede observar como el nematodo tiene ondulaciones aberrantes cuando consume *Yersinia pseudotuberculosis* en comparación de un movimiento sinusoidal normal de los nematodos cuando se exponen a *E. coli* OP50, lo cual indica que algunas bacterias pueden afectar significativamente su movilidad y si este modelo se usa con el fin de tratar con

antibióticos a *Y. pseudotuberculosis* se esperaría que el animal recobrara su movimiento o mejorara el mismo a través del tiempo dependiendo de la dosis del fármaco (35). Por otro lado en un estudio realizado por Sugawara T. y colaboradores; Figura 6C., se observa como *Bifidobacterium longum* afec-

ta la longitud del nematodo en comparación con aquellos *C. elegans* que consumieron *E. coli* OP50, lo que indica también que hay probabilidad de que otros microorganismos repercutan en el crecimiento normal del nematodo. (54).

Figura 6. (A) *C. elegans* alimentado con *Y. pseudotuberculosis* genera un movimiento aberrante (curvas cerradas) (B) *C. elegans* cultivado en *E. coli* OP50 genera un movimiento sinusoidal normal. (C). Efectos de diferentes concentraciones de *Bifidobacterium longum* (BL) en el crecimiento de *C. elegans*, *E. coli* OP50 es el control (CT).



Fuente: Tomado y modificado de: Joshua GWP. y colaboradores (35) y Sugawara T. y colaboradores (54).

Reproducción

Para los ensayos de reproducción, una vez los nematodos son sincronizados y alcanzan el estadio larvario L4, se debe realizar una transferencia a medios NGM que contiene las bacterias en estudio, después del tratamiento, se deposita un nematodo por caja y diariamente cada nematodo es analizado durante su periodo reproductivo (4 días), las placas con los huevos puestos por los nematodos se observan un par de días después de la eclosión de los huevos, en donde se deben contar los nematodos en estado larvario L2 y L3; a la vez que se verifica la fertilidad de los huevos por medio del número

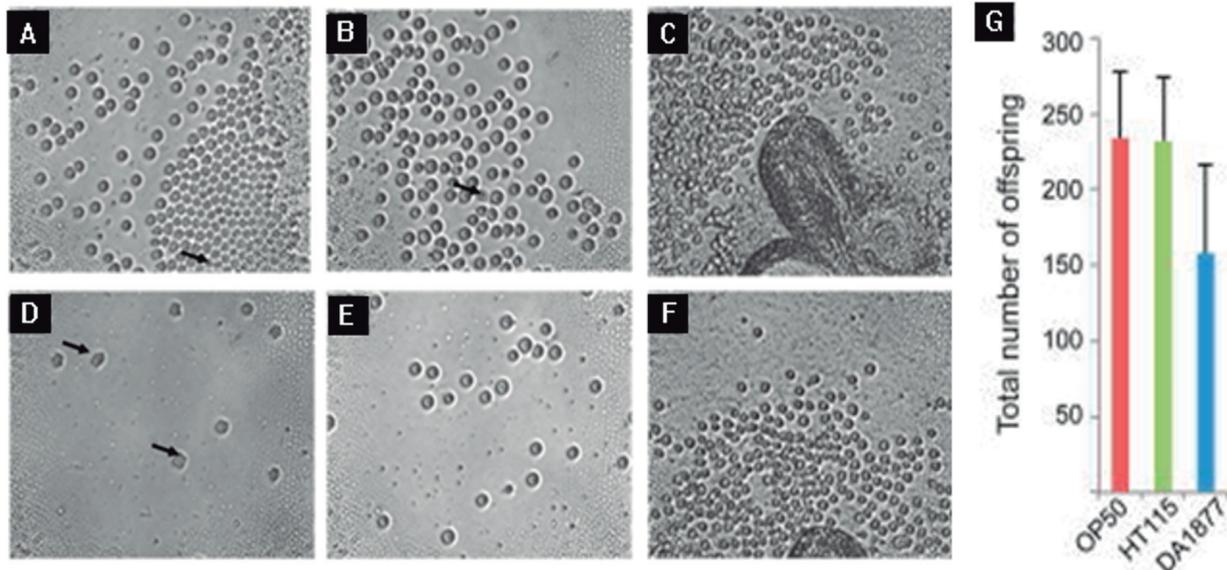
de larvas eclosionadas. Es importante estandarizar el ensayo de reproducción como lo reportan Bustos AVG. y colaboradores en el 2017, quienes describen los ensayos de reproducción en una cepa mutante NB327 de *C. elegans* modelo para el estudio de cáncer de pulmón y próstata (52).

En el estudio realizado por MacNeil L y colaboradores. estudiaron el tamaño de la cría de *C. elegans* expuestos a tres bacterias diferentes, *E. coli* OP50, *E. coli* HT115 y *Comomonas* DA1877, encontraron que la descendencia disminuye o reduce la fecundidad significativamente entre *E. coli* y *Comomonas* como se observa en la Figura 7G,

por otro lado Sharika L. y colaboradores; Figura 7A-F descubrieron que los exposiciones a *Staphylococcus aureus* y *Vibrio alginolyticus* tienen una diferencia en la morfología, el

tamaño y la activación de los espermatozoides provenientes de machos *C. elegans* en comparación con la dieta convencional con *E. coli* OP50 (55, 56).

Figura 7. Tamaño de cría de *C. elegans* cepa N2 en tres dietas diferentes *E. coli* OP50, *E. coli* HT115 y *Comomonas* DA1877. Las barras representan el número total promedio de prole por animal.



Fuente: Tomado y modificado de: MacNeil LT y colaboradores.(55) y Sharika L. y colaboradores (56).

Evaluación de la infección en el Modelo de *C. elegans*

La utilidad de *C. elegans* como organismo modelo de infección es el resultado de su trazabilidad genética, tiempo de generación rápido, facilidad de propagación, un mapa de linaje celular bien definido y un genoma completamente secuenciado que contiene una gran cantidad de genes ortólogos de vertebrados (42). En comparación con otros animales este nematodo en particular tiene varias ventajas sobre otros modelos de mamíferos; no plantea tantas preocupaciones éticas como el uso de modelos vertebrados

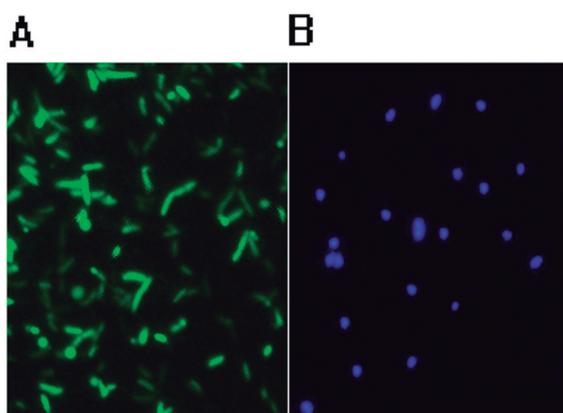
y los nematodos son fáciles de manipular en el laboratorio porque son lo suficientemente pequeños como para analizarlos en placas de microtitulación estándar (57).

Además la transparencia del cuerpo de *C. elegans* permite examinar el desarrollo y los cambios a nivel de una sola característica por medio de proteínas o sustancias fluorescentes en células vivas, de hecho la gran ventaja de este modelo como propuesta de infección radica en la capacidad que tienen las bacterias de ser teñidas fácilmente con sustancias fluorescentes o marcarse con GFP lo que facilita su observación al interior del nematodo. En la Figura 8, se obser-

va a *Pseudomonas putida* marcada con GFP y a *E. faecalis* teñida con DAPI. Una de las propuestas del grupo de Biotecnología y Genética UCM de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca radica en la posi-

bilidad de usar tinciones más sencillas para observar bacterias al interior del nematodo diferente al uso de plásmidos y la proteína verde fluorescente.

Figura 8. Bacterias fluorescentes. (A) *Pseudomonas putida* marcada con GFP. Tomado de: Duncan D. y colaboradores (58) y *E. faecalis* teñida con DAPI.



Fuente: Elaboración propia.

En un estudio elaborado por Aballay A, y colaboradores Figura 9 A-F, se puede observar la acumulación bacteriana y la presencia de las mismas por medio de la fluorescencia pues las bacterias *E. coli* OP50, *S. typhimurium* y *P. aeruginosa* fueron marcadas con plásmidos de expresión que llevan GFP, lo que permitió observarlas claramente en el intestino del nematodo por microscopio invertido y microscopía de fluorescencia, gracias a la transparencia del cuerpo de este modelo (24).

La fluorescencia de las bacterias marcadas con GFP también puede correlacionarse directamente con la inflamación del nematodo luego de la infección, factor que es muy frecuente dependiendo del tipo de bacteria y de su colonización dentro del cuerpo del nematodo. Por ejemplo, en un estudio rea-

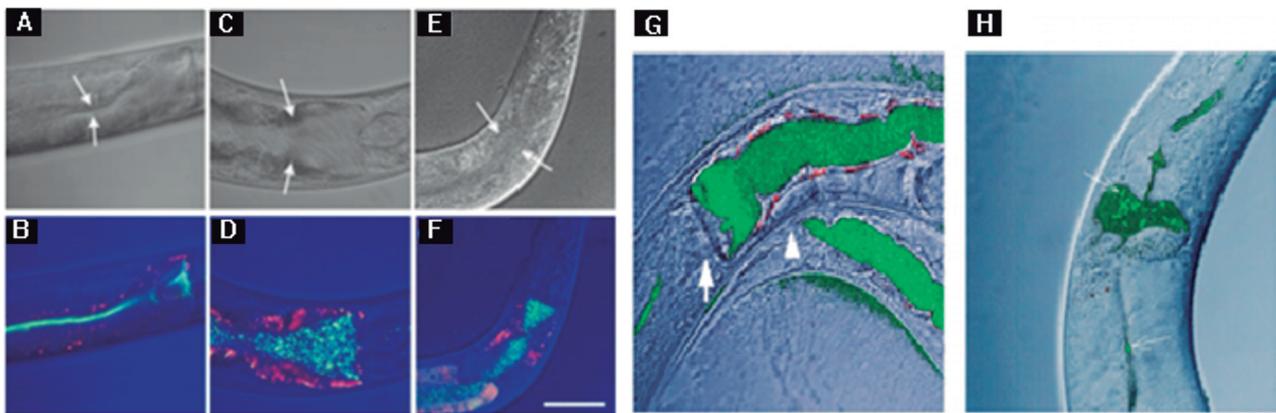
lizado por Sifri D. y colaboradores; Figura 9G y 9H, se observa la distensión del tracto digestivo de *C. elegans* alimentados con *S. aureus*, pero no con *E. coli* OP50. Gracias a la expresión del GFP los investigadores pueden correlacionar la morfología respectiva de los cocos o bacilos correspondientes a las bacterias en estudio y la respectiva respuesta frente a la inflamación en cada caso, concluyendo así que *S. aureus* afecta la morfología normal del modelo (31).

Durante la evaluación de la infección los investigadores observaron que cuando los nematodos en etapa L4 se alimentan con una cepa bacteriana que es patógena, se encuentran bacterias intactas dentro de la luz intestinal aproximadamente a las 6 horas postcontagio, ellas proliferan rápidamente y en algunos casos se evidencia una disten-

sión progresiva de la luz intestinal. Además, también reportan que los nematodos muestran pocos signos de infección durante las primeras 24 horas, su tasa de puesta de huevos es normal lo cual refleja que el estado general del nematodo es eficiente. Sin embargo, luego de este tiempo se observa que la locomoción del nematodo, el bombeo faríngeo y el forrajeo es anormal y posteriormente se evidencia una destrucción progresiva del epitelio intestinal y de la línea germinal, acompañado de una clara caída en la tasa de puesta de huevos después de 48 horas (31, 33).

Después de todo lo anterior, los nematodos comienzan a morir, y quedan inmóviles alrededor de las 72 horas de contacto con el agente. Muchos nematodos muertos pierden toda la arquitectura celular aparente. Además, tras la infección en algunos casos se observa el llamado fenotipo de “bolsa de nematodos”, en el cual los huevos de un hermafrodita grávido eclosionan internamente y las larvas resultantes consumen al progenitor (31). Es por ello que el tiempo de vida, así como el de infección pueden ser claves para poner a prueba antibióticos.

Figura 9. Colonización bacteriana en el intestino de *C. elegans* (A, B) *E. coli* OP50 marcada con GFP por 72 h, (C, D) *S. typhimurium* marcada con GFP por 72 h, (E, F) *P. aeruginosa* marcada con GFP durante 24 h. (G) cocos abundantes compatibles a *S. aureus* dentro de *C. elegans* con distensión del tracto digestivo. (H) Bacilos escasos compatibles con *E. coli* OP50 dentro de *C. elegans* sin distensión del tracto digestivo.



Fuente: Tomado de: Aballay A, y colaboradores (24) Y Sifri CD, y colaboradores (31).

Mutantes para los estudios de infección en *C. elegans*

Actualmente, se han caracterizado mutantes que son susceptibles o resistentes a la muerte mediada por toxinas bacterianas o por infección. Por ejemplo los mutantes de *C. elegans* *daf-2* de larga vida son resistentes a los

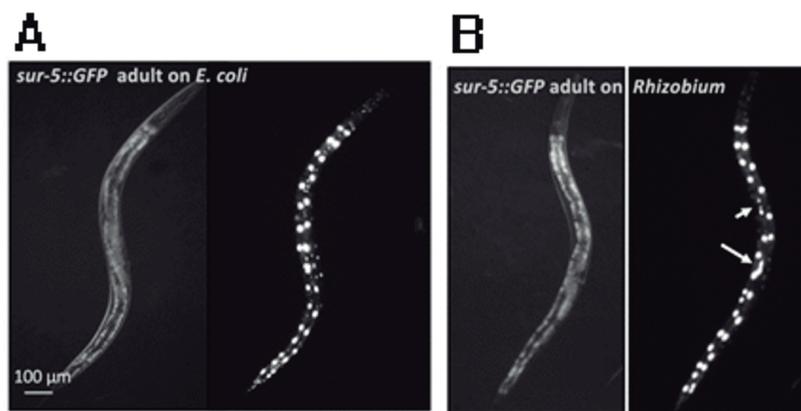
patógenos bacterianos de mamíferos (59), y la cepa *sek-1* (*km4*) provoca una mayor sensibilidad a diversos patógenos (57). Una de las ventajas que tiene el modelo y sus cepas mutantes es que la infección se hace evidente debido a que estas cepas poseen proteínas las cuales están marcadas usualmente con GFP y tras el consumo bacteriano en

comparación con la cepa control de *E. coli* OP50 se puede observar fluorescencia ante aquellas bacterias que son perjudiciales para el nematodo.

Por ejemplo, Kniazeva M. y Ruvkun G. buscaron determinar si el desarrollo de los embriones de *C. elegans* adultos que tenía

marcada la proteína sur-5 con GFP era normal o no al ser alimentado con *E. coli* OP50 y con *Rhizobium huautlense*, como resultado obtuvieron que los núcleos intestinales se encuentran anormalmente alargados y fragmentados tras el consumo de esta última bacteria, Figura 10. (60).

Figura 10. (A) imágenes fluorescentes de *C. elegans* sur-5 GFP adulto alimentado *E. coli* OP50 desde el momento de la eclosión. (B) imágenes fluorescentes de *C. elegans* sur-5 GFP adulto alimentado con *Rhizobium* desde el momento de la eclosión. Las flechas largas y cortas apuntan a núcleos intestinales anormalmente alargados y fragmentados.



Fuente: Tomado de: Kniazeva M. y Ruvkun G.(60).

Por otro lado, también se ha demostrado que como mecanismo de defensa *C. elegans* deja de alimentarse en respuesta a los tóxicos ambientales o agentes que causan daño de forma dependiente de la dosis y reanuda la alimentación cuando se elimina el “tóxico” o la sustancia que causa daño en su organismo (27). Lo anterior sugiere que tanto la naturaleza del patógeno como la ruta de infección contribuyen a la inducción de genes de defensa específicos en *C. elegans* así como también inducir un tratamiento puede contribuir al mejoramiento de los signos

presentados (61). Por esta razón, diversas investigaciones sugieren utilizar los medios Infusión Cerebro Corazón (BHI) o Luria Bertani (LB) para el cultivo de las bacterias que se van a exponer al nematodo, ya que se ha demostrado que otro tipo de medios de cultivo pueden aumentar la virulencia bacteriana y afectar notoriamente al nematodo (20, 39).

Es importante mencionar que existen algunos requisitos a tener en cuenta para la funcionalidad de *C. elegans* como modelo

huésped-patógeno, debido a que el nematodo solo tiene defensas inmunes innatas, las preguntas dirigidas a comprender el sistema inmunitario adquirido deberán abordarse en un modelo de vertebrado. *C. elegans* también carece de un tipo de célula fagocítica móvil, como el macrófago de mamífero o el hemocito de *Drosophila*. Además, no todos los genes de inmunidad innata de vertebrados tienen ortólogos en este modelo. Estas limitaciones subrayan la necesidad de una variedad de sistemas de modelos complementarios de huésped-patógeno para comprender a fondo la complejidad total de las interacciones virulencia-defensa, sin embargo es importante considerar que este modelo puede ser muy útil para realizar tamizajes en el estudio de sustancias candidatas a fármacos (42).

Finamente, otro de los factores importantes para seleccionar este nematodo como modelo eucariota es la capacidad que tiene de crio preservarse a largo plazo, lo que permite realizar variados estudios con diferentes cepas transgénicas o mutantes (12). Por otro lado, dado a los estudios realizados en el nematodo infectado con patógenos, con el fin de comprobar la función y efectividad de compuestos o estandarizar alternativas de tratamiento eficientes, este animal puede ser propuesto como modelo *In Vivo* de infecciones. Se podrían evaluar sustancias, extractos o péptidos antimicrobianos entre otros, pues en él se pueden aplicar infinidad de ensayos arrojando resultados de manera rápida y concluyente (40, 57). Además, es importante reconocer que durante muchos

años *C. elegans* se ha utilizado para comprender enfermedades como Alzheimer, Diabetes Mellitus entre otros y ha proporcionado numerosos avances en estas áreas del conocimiento (12).

Conclusiones

Diversos son los estudios realizados hasta el momento enfatizados en demostrar que pese a que *C. elegans* se alimenta naturalmente de bacterias no todas pueden ser relativamente sanas o promover su ciclo de vida normal, de hecho a lo largo de este artículo se evidenció que el nematodo puede verse afectado al consumir ciertas bacterias en comparación a su alimento habitual en el laboratorio (la *E. coli* OP50), lo que indica que pese a la distancia evolutiva sigue existiendo una conexión entre una especie y otra, sobre todo en el caso de la sensibilidad a infecciones que atacan a diferentes mamíferos.

Además todo esto contribuye a la posibilidad de usar este nematodo como modelo *In vivo* de infecciones y no solamente con el fin de determinar aspectos netos de la inmunidad o las repercusiones que los microorganismos tienen en la vida del modelo, sino que es posible que a nivel de ciencia e investigación este pequeño invertebrado sea útil para descartar o no medicamentos en estudio en diferentes campos de investigación, sobre todo aquellos que involucran los sistemas que conforman a *C. elegans*.

Las infecciones son cada vez más persistentes y la necesidad de explorar nuevas sustancias para contrarrestarlos es evidente en la actualidad, a través de este modelo se puede contribuir sustancialmente para validar antibióticos candidatos de manera rápida y sencilla y al mismo tiempo evitar largas experimentaciones que en un final fracasan, porque comprometen la vida de otros modelos animales que tiene un periodo de vida más largo o que presenta restricciones éticas.

El semillero de Biotecnología y Genética UCMC de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca propone utilizar a este modelo como fase inicial de experimentación a nivel de antibióticos, usando las técnicas *In vitro* convencionales y comparándolas con la infección y la resolución de la misma dentro del nematodo tras la administración del fármaco en estudio, para posteriormente hacer estudios más especializados con otros animales solo si el medicamento no compromete la vida del nematodo. De hecho, actualmente este grupo tiene en curso una investigación que tiene como objetivo validar y estandarizar a *C. elegans* como modelo *In Vivo* de infección para el estudio de antimicrobianos.

Referencias

1. Wiles S. All models are wrong, but some are useful: Averting the 'microbial apocalypse'. *Virulence*. 2015;6(8):730-2.
2. Meurens F, Summerfield A, Nauwynck H, Saif L, Gerdtts V. The pig: a model for human infectious diseases. *Trends in microbiology*. 2012;20(1):50-7.
3. Duval RE, Grare M, Demore B. Fight Against Antimicrobial Resistance: We Always Need New Antibacterials but for Right Bacteria. *Molecules*. 2019;24(17).
4. Zhao M, Lepak AJ, Andes DR. Animal models in the pharmacokinetic/pharmacodynamic evaluation of antimicrobial agents. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2016;24(24):6390-400.
5. Tunkel AR, Scheld WM. Applications of therapy in animal models to bacterial infection in human disease. *Infectious disease clinics of North America*. 1989;3(3):441-59.
6. Baldelli I, Biolatti B, Santi P, Murialdo G, Bassi AM, Santori G, et al. Conscientious Objection to Animal Testing: A Preliminary Survey Among Italian Medical and Veterinary Students. *Alternatives to laboratory animals : ATLA*. 2019;47(1):30-8.
7. Kumar A, Baruah A, Tomioka M, Iino Y, Kalita MC, Khan M. *Caenorhabditis elegans*: a model to understand host-microbe interactions. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2020;77(7):1229-49.
8. Maupas E. Modes et formes de reproduction des nématodes 1900.
9. NCBI. Taxonomy browser *Caenorhabditis elegans* 2020 [updated 2020; cited 2020 11/06/2020]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&iid=6239&lvl=3&keep=1&srchmode=1&unlock&lin=s&log_op=lineage_toggle.
10. Dougherty EC, V. N. A new species of the free-living nematode genus *Rhabditis* of interest in comparative physiology and genetics. *Journal of Parasitology*. 1949;35(11).
11. Riddle DL, Blumenthal T, Meyer BJ ea, editors. *C. Elegans II*. 2nd Edition. Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1997.

12. Ann K. Corsi, Bruce Wightman, Chalfie M. A. Transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans* New York 2015 [cited 2020 11/06/2020]. Available from: http://www.wormbook.org/chapters/www_celegansintro/celegansintro.html.
13. Gonzalez-Moragas L, Roig A, Laromaine A. C. *elegans* as a tool for in vivo nanoparticle assessment. *Advances in colloid and interface science*. 2015;219:10-26.
14. Wormatlas. 2020 [cited 2020 11/06/2020]. Available from: <https://www.wormatlas.org/>.
15. Prevedel R, Yoon YG, Hoffmann M, Pak N, Wetzelstein G, Kato S, et al. Simultaneous whole-animal 3D imaging of neuronal activity using light-field microscopy. *Nature methods*. 2014;11(7):727-30.
16. Schedl T, Kimble J. *fog-2*, a germ-line-specific sex determination gene required for hermaphrodite spermatogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 1988;119(1):43-61.
17. L'Hernault SW, Arduengo PM. Mutation of a putative sperm membrane protein in *Caenorhabditis elegans* prevents sperm differentiation but not its associated meiotic divisions. *The Journal of cell biology*. 1992;119(1):55-68.
18. Tan M-W, Rahme LG, Sternberg JA, Tompkins RG, Ausubel FM. *Pseudomonas aeruginosa* killing of *Caenorhabditis elegans* used to identify *P. aeruginosa* virulence factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999;96(5):2408-13.
19. Couillault C, Ewbank JJ. Diverse bacteria are pathogens of *Caenorhabditis elegans*. *Infection and immunity*. 2002;70(8):4705-7.
20. Mahajan-Miklos S, Tan MW, Rahme LG, Ausubel FM. Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa*-*Caenorhabditis elegans* pathogenesis model. *Cell*. 1999;96(1):47-56.
21. Gallagher LA, Manoil C. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 kills *Caenorhabditis elegans* by cyanide poisoning. *Journal of bacteriology*. 2001;183(21):6207-14.
22. Darby C, Cosma CL, Thomas JH, Manoil C. Lethal paralysis of *Caenorhabditis elegans* by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(26):15202-7.
23. Arnaud Labrousse, Sophie Chauvet, Carole Couillault, C. Léopold Kurz, Ewbank JJ. *Caenorhabditis elegans* es un huésped modelo para *Salmonella typhimurium*. *Current Biology*. 2000;10(23).
24. Aballay A, Yorgey P, Ausubel FM. *Salmonella typhimurium* proliferates and establishes a persistent infection in the intestine of *Caenorhabditis elegans*. *Current biology : CB*. 2000;10(23):1539-42.
25. Aballay A, Drenkard E, Hilbun LR, Ausubel FM. *Caenorhabditis elegans* innate immune response triggered by *Salmonella enterica* requires intact LPS and is mediated by a MAPK signaling pathway. *Current biology : CB*. 2003;13(1):47-52.
26. Tenor JL, McCormick BA, Ausubel FM, Aballay A. *Caenorhabditis elegans*-based screen identifies *Salmonella* virulence factors required for conserved host-pathogen interactions. *Current biology : CB*. 2004;14(11):1018-24.
27. O'Quinn AL, Wiegand EM, Jeddelloh JA. *Burkholderia pseudomallei* kills the nematode *Caenorhabditis elegans* using an endotoxin-mediated paralysis. *Cellular microbiology*. 2001;3(6):381-93.
28. Gan YH, Chua KL, Chua HH, Liu B, Hii CS, Chong HL, et al. Characterization of *Burkholderia pseudomallei* infection and identification of novel virulence factors using a *Caenorhabditis elegans* host system. *Molecular microbiology*. 2002;44(5):1185-97.
29. Garsin DA, Sifri CD, Mylonakis E, Qin X, Singh KV, Murray BE, et al. A simple model host for identifying Gram-positive virulence factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(19):10892-7.

30. Jansen WT, Bolm M, Balling R, Chhatwal GS, Schnabel R. Hydrogen peroxide-mediated killing of *Caenorhabditis elegans* by *Streptococcus pyogenes*. *Infection and immunity*. 2002;70(9):5202-7.
31. Sifri CD, Begun J, Ausubel FM, Calderwood SB. *Caenorhabditis elegans* as a model host for *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *Infection and immunity*. 2003;71(4):2208-17.
32. Hodgkin J, Kuwabara PE, Corneliussen B. A novel bacterial pathogen, *Microbacterium nematophilum*, induces morphological change in the nematode *C. elegans*. *Current biology : CB*. 2000;10(24):1615-8.
33. Park JO, El-Tarabily KA, Ghisalberti EL, Sivasi-thamparam K. Pathogenesis of *Streptovorticillium albireticuli* on *Caenorhabditis elegans* and its antagonism to soil-borne fungal pathogens. *Letters in applied microbiology*. 2002;35(5):361-5.
34. Darby C, Hsu JW, Ghorri N, Falkow S. *Caenorhabditis elegans*: plague bacteria biofilm blocks food intake. *Nature*. 2002;417(6886):243-4.
35. Joshua GWP, Karlyshev AV, Smith MP, Isherwood KE, Titball RW, Wren BW. A *Caenorhabditis elegans* model of *Yersinia* infection: biofilm formation on a biotic surface. *Microbiology*. 2003;149(11):3221-9.
36. Mallo GV, Kurz CL, Couillault C, Pujol N, Granjeaud S, Kohara Y, et al. Inducible antibacterial defense system in *C. elegans*. *Current biology : CB*. 2002;12(14):1209-14.
37. Hodgkin J, Partridge FA. *Caenorhabditis elegans* meets microsporidia: the nematode killers from Paris. *PLoS biology*. 2008;6(12):2634-7.
38. Mylonakis E, Ausubel FM, Perfect JR, Heitman J, Calderwood SB. Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Cryptococcus neoformans* as a model of yeast pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(24):15675-80.
39. Feistel DJ, Elmostafa R, Nguyen N, Penley M, Morran L, Hickman MA. A Novel Virulence Phenotype Rapidly Assesses *Candida* Fungal Pathogenesis in Healthy and Immunocompromised *Caenorhabditis elegans* Hosts. *mSphere*. 2019;4(2).
40. Breger J, Fuchs BB, Aperis G, Moy TI, Ausubel FM, Mylonakis E. Antifungal chemical compounds identified using a *C. elegans* pathogenicity assay. *PLoS pathogens*. 2007;3(2):e18.
41. Pukkila-Worley R, Peleg AY, Tampakakis E, Mylonakis E. *Candida albicans* hyphal formation and virulence assessed using a *Caenorhabditis elegans* infection model. *Eukaryotic cell*. 2009;8(11):1750-8.
42. Alegado RA, Campbell MC, Chen WC, Slutz SS, Tan MW. Characterization of mediators of microbial virulence and innate immunity using the *Caenorhabditis elegans* host-pathogen model. *Cellular microbiology*. 2003;5(7):435-44.
43. Ewbank JJ, Zugasti O. *C. elegans*: model host and tool for antimicrobial drug discovery. *Disease models & mechanisms*. 2011;4(3):300-4.
44. Roeder T, Stanisak M, Gelhaus C, Bruchhaus I, Grotzinger J, Leippe M. Caenopores are antimicrobial peptides in the nematode *Caenorhabditis elegans* instrumental in nutrition and immunity. *Developmental and comparative immunology*. 2010;34(2):203-9.
45. Kato Y, Aizawa T, Hoshino H, Kawano K, Nitta K, Zhang H. *abf-1* and *abf-2*, ASABF-type antimicrobial peptide genes in *Caenorhabditis elegans*. *The Biochemical journal*. 2002;361(Pt 2):221-30.
46. Schulenburg H, Kurz CL, Ewbank JJ. Evolution of the innate immune system: the worm perspective. *Immunological reviews*. 2004;198:36-58.
47. Nicholas HR, Hodgkin J. Responses to infection and possible recognition strategies in the innate immune system of *Caenorhabditis elegans*. *Molecular immunology*. 2004;41(5):479-93.

48. Mary R. Brockett, Patrick S. Spica, Shinn-Thomas JH. *C. elegans* synchronization: Small- and large-scale protocols to isolate synchronized L1 larvae and beyond New York 2016 [updated 2016; cited 2020 11/06/2020]. Available from: <http://wormbook.org/2016/05/16/c-elegans-synchronization-small-and-large-scale-protocols-to-isolate-synchronized-l1-larvae-and-beyond/>.
49. Stiernagle T. Maintenance of *C. elegans* Minneapolis 2006 [updated 2006; cited 2020 11/06/2020]. Available from: http://www.wormbook.org/chapters/www_strainmaintain/strainmaintain.html.
50. Park HH, Jung Y, Lee SV. Survival assays using *Caenorhabditis elegans*. *Molecules and cells*. 2017;40(2):90-9.
51. Sanchez-Blanco A, Kim SK. Variable pathogenicity determines individual lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS genetics*. 2011;7(4):e1002047.
52. Bustos AVG, Jimenez MG, Mora RMS. The *Annona muricata* leaf ethanol extract affects mobility and reproduction in mutant strain NB327 *Caenorhabditis elegans*. *Biochemistry and biophysics reports*. 2017;10:282-6.
53. Parada Ferro LK, Gualteros Bustos AV, Sánchez Mora RM. Caracterización fenotípica de la cepa N2 de *Caenorhabditis elegans* como un modelo en enfermedades neurodegenerativas. *NOVA*. 2017;15:69.
54. Sugawara T, Sakamoto K. Killed *Bifidobacterium longum* enhanced stress tolerance and prolonged life span of *Caenorhabditis elegans* via DAF-16. *British Journal of Nutrition*. 2018;120(8):872-80.
55. MacNeil LT, Watson E, Arda HE, Zhu LJ, Walhout AJ. Diet-induced developmental acceleration independent of TOR and insulin in *C. elegans*. *Cell*. 2013;153(1):240-52.
56. Sharika R, Subbaiah P, Balamurugan K. Studies on reproductive stress caused by candidate Gram positive and Gram negative bacteria using model organism, *Caenorhabditis elegans*. *Gene*. 2018;649:113-26.
57. Okoli I, Coleman JJ, Tampakakis E, An WF, Holson E, Wagner F, et al. Identification of antifungal compounds active against *Candida albicans* using an improved high-throughput *Caenorhabditis elegans* assay. *PloS one*. 2009;4(9):e7025.
58. Duncan D. Cameron, Jurriaan Ton, Alejandro Pérez de Luque. *Mycocrop* United Kingdom 2013 [updated 2015; cited 2020 11/06/2020]. Available from: <https://mycocrop.wordpress.com/summary-results/>.
59. Garsin DA, Villanueva JM, Begun J, Kim DH, Sifri CD, Calderwood SB, et al. Long-lived *C. elegans* *daf-2* mutants are resistant to bacterial pathogens. *Science*. 2003;300(5627):1921.
60. Kniazeva M, Ruvkun G. *Rhizobium* induces DNA damage in *Caenorhabditis elegans* intestinal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2019;116(9):3784-92.
61. Jurado-Gamez H, Gúzman-Insuasty M. Determinación de la cinética, pruebas de crecimiento y efecto de inhibición in vitro de *Lactobacillus casei* en *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli*. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*. 2015;62.