Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Andréia Ferreira Eduardo da Costa

Aderência, invasão e indução de apoptose por estreptococos do grupo B em células epiteliais respiratórias A549

Rio de Janeiro
2009

Andréia Ferreira Eduardo da Costa

Aderência, invasão e indução de apoptose por estreptococos do grupo B em células epiteliais respiratórias A549

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.ª Dra. Prescilla Emy Nagao Ferreira

Rio de Janeiro

2009

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CBA

C837 Costa, Andréia Ferreira Eduardo da.
Aderência, invasão e apoptose por estreptococos do grupo B em células epiteliais respiratórias A549 / Andréia Ferreira Eduardo da Costa – 2009.
63 f.

Orientadora: Prescilla Emy Nagao Ferreira.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biologia.

1.Estreptococo – Teses. 2. Células epiteliais – Teses. 3. Apoptose – Teses. 4. Células – Adesão - Teses. 5. Vacúolos. I. Costa, Prescilla Emy Nagao. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 576.851.214

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

_____ _____

Assinatura Data

Andréia Ferreira Eduardo da Costa

Aderência, invasão e indução de apoptose por estreptococos do grupo B em células epiteliais respiratórias A549

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 12 de março de 2009.

Orientadora:

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

Banca Examinadora:

_____
Prof.ª Dra. Ana Cláudia de Paula Rosa Ignacio
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

_____
Prof.ª Dra. Camila Castro Figueiredo
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

_____
Prof.ª Dra. Maria Helena Simões Villas Bôas
Fundação Oswaldo Cruz

_____
Prof.ª Dra. Técia Maria Ulisses Carvalho
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2009

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela minha vida e por estar sempre ao meu lado em todos os momentos, e nele encontro força para superar todos os obstáculos que a vida me impõe.

Aos meus pais pela dedicação, carinho, muita paciência, por todo o aprendizado, e principalmente por aceitar e amar da maneira que sou.

Ao meu irmão (Bebeu) por ser sempre meu amigo e companheiro de aventuras, e pelos bons momentos que tivemos desde a nossa infância, até os dias atuais.

Aos meus avós, que mesmo não estando mais presente, sinto que estão felizes por eu estar vencer mais uma etapa da minha vida. E saiba que sinto muitas saudades de todos vocês.

Ao meu namorado André, por toda a paciência e torcida durante minha graduação e mestrado, te amo.

Aos meus primos Eduardo, Flávia, Luiz Cláudio, Renata, Júnior, Patrick, Kamilla, Leleca, Tota, Cláudio, pelas boas lembranças que tenho da minha infância.

Aos meus tios Gláucia, Sylvia, Ruth, Rita, Flávio, José Luís por todo carinho e atenção que disponibilizaram a minha pessoa em toda a minha vida.

Aos meus amigos e professores da Faculdade de Formação de Professores pelos bons momentos e grandes ensinamentos.

A Professora Prescilla Emy Nagao Ferreira pela orientação e dedicação durante a minha iniciação científica e mestrado.

A Michelle e Viviane por toda amizade, ajuda, paciência desde meus primeiros momento no laboratório, bem como as horas ao telefone para tentar sanar minhas dúvidas ou mesmo para fazer terapia devido ao estresse da dissertação.

As meninas de nosso grupo Gabi, Marcelle, Beatriz, Camila e Joselis, por toda ajuda nos experimentos e por transformarem nosso local de trabalho em um local agradável pela excelente companhia.

Ao grupo da Professora Verônica, Paula, Chico, Aline, Viviane, Laila, Juliana e Marcela pela agradável companhia.

Ao Marcos Temperini por todos seus favores, empréstimos e dicas para que o trabalho fosse possível.

A tia Mariléia pela sua dedicação na preparação de meios e material, bem como pela ajuda que me dá na minha dieta, me fornecendo biscoitos e frutas.

Aos secretários, Victor e Marcos Aurélio que estão sempre nos auxiliando nas tarefas burocráticas.

A Professora Tecia pela sua contribuição neste trabalho e pelo aprendizado que obtive em microscopia graças a sua atenção e dedicação.

A todos que direta ou indiretamte contribuíram para que essa dissertação fosse realizada, mas que por descuido esqueci de citar. Meu muito obrigada.

RESUMO

COSTA, Andréia Ferreira Eduardo. *Aderência, invasão e apoptose por estreptococos do grupo B em células epiteliais respiratórias A549*. 2009. 63 f. Dissertação (Mestrado em Biologia) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2009.

Estreptococos do grupo B (EGB), principalmente sorotipo III são a principal causa de pneumonia neonatal, sepse e meningite. O potencial de virulência das amostras de EGB pode determinar a colonização ou a infecção do hospedeiro. Como o pulmão constitui uns dos primeiros órgãos durante o processo de invasão sistêmica por EGB, nós decidimos investigar os mecanismos de adesão e invasão de amostras do sorotipo III (90356-líquor e 80340-vagina) com linhagem de células epiteliais do pulmão humano (A549). Desta forma, o principal objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade de aderência e invasão de duas amostras de EGB sorotipo III com células de epiteliais pulmonares A549, a persistência bacteriana intracelular, a fusão com compartimentos acídicos, potencial citotóxico e indução de apoptose. As amostras mostraram capacidade de aderir e invadir o epitélio pulmonar A549, onde a amostra 90356-líquor isolada de paciente a que apresentou maior propriedade adesiva e invasiva que a amostra 80340-vagina ($p<0,05$). Ambas as cepas mostraram persistência intracelular sem replicação no interior do epitélio respiratório até 24h de incubação. Além disso, verificamos que os EGB são capazes de promover vacuolização celular permanecendo viáveis dentro de vacúolos acídicos, sugerindo a ocorrência de fusão lisossomo-fagossomo. A amostra 90356-líquor também mostrou maior citotoxidade quando comparada com a amostra 80340-vagina. A análise por citometria de fluxo demonstrou, pela primeira vez, que o EGB induz apoptose em epitélio respiratório, podendo representar um mecanismo importante para o desenvolvimento da lesão celular aguda e a patogênese bacteriana.

Palavras-chave: Estreptococos do grupo B (EGB). Células Epiteliais. Vacúolos acídicos. Apoptose.

ABSTRACT

COSTA, Andréia Ferreira Eduardo. *Adhesion, invasion and apoptosis inducing for group B streptococci in respiratory epithelial cells A549*. 2009. 63 f. Dissertação (Mestrado em Biologia) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2009.

Group B streptococci (GBS), mainly serotype III, is a major cause of neonatal pneumonia, sepsis and meningitis. Virulence potential of GBS strains may determine the outcome of host colonization or infection. Because the lung constitutes a first step in GBS systemic invasion processes, we have investigates the adherence and invasion mechanisms of GBS-III isolates to human lung epithelial cell line (A549). Thus, the main objective of this study was to evaluate the ability of adhesion and invasion of GBS strains serotype III (90356-liquor and 80340-vagina) with A549 lung epithelial cells, intracellular bacterial persistence, fusion with acidic compartments, cytotoxic potential, and induction of apoptosis. The strains showed ability to adhere and invade the epithelial A549 cells; GBS 90356-liquor isolated from a patient showed a more efficient adherence and invasion properties than GBS-III 80340 isolated from vagina ($P<0,05$). Both strains showed persistent intracellular viability without replication into A549 cells up to 24h incubation. In addition, we found that GBS are able to promote cellular vacuolization and persisted viable inside acidic vacuoles, suggesting lysosome-phagosome fusion. The GBS 90356-líquor also showed higher cytotoxicity when compared with 80340-vagina strain. The present work describe for first time by flow cytometry that GBS induces apoptosis in respiratory epithelium and be an important mechanism for the development of acute cellular injury and bacterial pathogenesis.

Keywords: Group B streptococci (GBS). Epithelial cells. Acidic vacuoles. Apoptosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Aderência das amostras de EGB sorotipo III com células epiteliais respiratórias..... 22

Figura 2 - Invasão das amostras de EGB sorotipo III com células epiteliais respiratórias..... 23

Figura 3 - Persistência intracelular das amostras de EGB sorotipo III com células epiteliais respiratórias..... 24

Figura 4 - Microscopia confocal a laser das células A549 infectadas com amostras de EGB sorotipo III após 4h de infecção..... 26

Figura 5 - Microscopia óptica da interação ou controle das células epiteliais respiratórias A549 com amostras de EGB do sorotipo III 80340-vagina e 90356-liquor..... 28

Figura 6 - (A) Percentual de citotoxicidade das amostras de EGB sorotipo III com células epiteliais respiratórias A549; (B) Curva de citotoxicidade do peróxido de hidrogênio (H_2O_2)..... 30

Figura 7 - Células A549 infectadas ou não com EGB amostra 90356-liquor por 6h e 12h; 32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAB - Blood agar base

BHI - Infusão cérebro coração

DMEM - Dulbecco's modified Eagle's medium

D. O. – Densidade óptica/Absorbância

EDTA – Ácido etileno de amino acético

EGB – Estreptococos do grupo B

FITC - Isotiocianato de fluoresceína

INOS – Óxido nítrico sintase induzida

kDa – Kilodalton

ALT - Ácido lipoteicóico

MTT - Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide

NaCl – Cloreto de sódio

PBS – Salina tamponada com fosfato

SFB – Soro fetal bovino

TRIS – Tampão tri-hidroxímetil-amino-metano

UFC – Unidades formadoras de colônias

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	12
1	**OBJETIVOS**.....	23
2	**METODOLOGIA**.....	24
2.1	**Amostras bacterianas de EGB**.....	24
2.2	**Conservação, cultivo e preparo das suspensões bacterianas**.....	24
2.3	**Manutenção e cultivo da linhagem de células epiteliais respiratórias A549**.....	25
2.4	**Preparação de monocamadas de células epiteliais respiratórias A459**.....	25
2.5	**Ensaios de interação de EGB com células epiteliais respiratórias A549**.....	25
2.6	**Ensaios de persistência intracelular das amostras de EGB sorotipo III com células epiteliais respiratórias A549**.....	26
2.7	**Marcação do EGB com isotiocianato de fluoresceína (FITC)**.....	27
2.8	**Microscopia confocal a laser das células A549 infectadas com amostras de EGB sorotipo III**.....	27
2.9	**Microscopia óptica da interação das células epiteliais respiratórias A549 com amostras de EGB sorotipo III**.....	28
2.10	**Ensaios de citoxidade pelo Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide das amostras de EGB sorotipo III em células epiteliais humanas A549**.....	28
2.11	**Análise da apoptose através das marcações com Anexina V-FITC e Iodeto de Propídio por citometria de fluxo**.....	29
2.12	**Análise estatística**.....	30
3	**RESULTADOS**.....	31
3.1	**Análise da interação de EGB com células epiteliais respiratórias A549**.....	31
3.2	**Análise da presença de EGB em vacúolos acídicos das células epiteliais A549**.....	34
3.3	**Análise morfológica da interação de EGB com células epiteliais**	

respiratórias A549..... 36
3.4 **Potencial citotóxico das amostras de EGB**..... 38
3.5 **Indução de apoptose por amostras de EGB**..... 40
4 **DISCUSSÃO**..... 41
5 **CONCLUSÃO**..... 48
REFERÊNCIAS..... 49

INTRODUÇÃO

Estreptococos do grupo B: Características gerais

Os *Streptococcus agalatiae* (estreptococos do grupo B, EGB) pertencem à família *Streptococcaceae*, sendo caracterizados pela presença do antígeno do grupo B de Lancefield constituído por resíduos de ramnose e *N*-acetilglicosamina (Lancefield, 1934). Os EGB são cocos Gram positivos, β-hemolíticos, anaeróbios facultativos, catalase e oxidase negativa, hipurato e CAMP positivos que crescem em cadeias de tamanhos variáveis (Tamura e Rubens 1994). Possuem uma cápsula polissacarídica (CP) formada por polímeros de glicose, galactose, N-acetilglicosamina e ácido sialico (Kogan *et al.,* 1996). Atualmente, os EGB são classificados em dez sorotipos (Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII e IX) de acordo com o tipo de ligação glicosídica e número de unidades repetidas de cada açúcar que forma o antígeno capsular tipo-específico (Kogan *et al.*, 1996; Kong *et al.,* 2008). Além disso, o sorotipo III pode ainda ser subtipado em III-1, III-2 e III-3 com base no padrão de digestão do DNA cromossomal com a endonuclease *Hind* III (Adderson *et al*., 2000).

Os EGB foram inicialmente reconhecidos como agentes etiológicos da mastite bovina, mas a partir de 1970 emergiram como importante patógeno humano (Zaleznik, 2000). São microrganismos pertencentes à microbiota anfibiôntica normal dos tratos respiratório, gastrointestinal e urogenital feminino e masculino podendo ser transmitido sexualmente. Estima-se que 20-30% das mulheres sejam portadoras de EGB, cuja colonização pode ser permanente, intermitente ou transitória (Petterson, 2007). Os EGB estão associados a um número significativo de casos de infecções invasivas em recém-nascidos, mulheres grávidas e adultos imunucomprometidos (Baker 1995; Schuchat, 1999).

A patogênese da infecção neonatal começa com a colonização assintomática do trato genital feminino, onde 50-70% dos neonatos nascidos dessas mulheres tornam-se colonizados pela bactéria (Baker e Edwards, 2001). Os recém-nascidos podem entrar em contato com a bactéria durante a passagem pelo canal do parto contaminado, onde o EGB alcança o trato respiratório promovendo injúria no epitélio

pulmonar e pneumonia (Shet & Ferrieri 2004). Em muitos casos, além da pneumonia pode ocorrer sepse e/ou meningite e, com menor freqüência, osteomelite, celulite e artrite séptica em neonatos (Gibbs *et al.,* 2004; Law *et al.,* 2005).

A colonização materna e a transmissão vertical do EGB são reconhecidas em mais de 95% dos casos de infecções neonatais e dependem de fatores de risco como, o grau de colonização, a prematuridade, o tempo entre a ruptura da placenta e o parto, febre materna acima de 38°C e infecção urinária (Baker, 1999; Hickman *et at,* 1999; Gibbs *et al.,* 2004; Law *et al.,* 2005; Hakansson *et al.,* 2006).

A infecção neonatal por EGB apresenta duas formas clínicas: a infecção de inicio precoce e a infecção de inicio tardio. As infecções de inicio precoce representam 80% de todos os casos clínicos (Spelleberg, 2000) e iniciam nas primeiras 6-8h de vida. Os principais sintomas são pneumonia, falência respiratória e septicemia (Baker e Edwards, 2001). Análises histológicas do pulmão demonstram injúria tecidual, infiltração inflamatória e hemorragia alveolar (Katzenstein *et al*., 1976). A taxa de mortalidade é de 2-5% para bebês nascidos entre a 37^{a} e 42ª semanas de gestação e de 25% para bebês prematuros (Radetsky *et al .,* 1994; Adriaanse *et al.,* 1996; Gibbs *et al .,* 2004).

As infecções de inicio tardio por EGB ocorrem em recém-nascidos com mais de 7 semanas de vida, cujas principais manifestações clínicas são bacteremia e meningite (Baker & Edwards, 2001). As infecções de início tardio podem ser transmitidas pelo contato com profissionais de saúde ou indivíduos portadores da comunidade (Hager *et al.,* 2000; Law *et al.,* 2005).

Os sorotipos Ia, II, III e V são os mais frequentes em infecções neonatais (Petterson, 2007) e o sorotipo V em adultos imunocomprometidos (Domingo, 1997; Harrison *et al*., 1998). Entretanto, a distribuição dos sorotipos varia com a região geográfica e origem étnica (Spellerberg, 2000). Nos Estados Unidos e oeste da Europa os sorotipos Ia, II e III englobam 85% dos isolados clínicos neonatais (Zaleznik *et al.,* 2000), onde amostras dos sorotipos IV, VI, VII e VIII têm sido raramente isoladas nestas regiões (Weisner *et al.,* 2004). Entretanto, a emergência destes últimos sorotipos tem sido descrita no Japão, onde os sorotipos VI (25%) e VIII (36%) foram os mais prevalentes em gestantes (Lachenauer *et al.,* 1999).

No Brasil há poucos estudos sobre a prevalência dos EGB na população. O primeiro a analisar a colonização pelos EGB em gestantes foi Benchetrit em 1982, onde 86 gestantes apresentaram taxa de colonização de 26%, sendo que 15% dos

recém nascidos dessas mulheres tornaram-se contaminados (Benchetrit *et al*., 1982). Na cidade de Londrina no Paraná foi encontrada taxa de 15% de colonização (Mocelin *et al*., 1995). Estudos mais recentes, realizados nos estados do Paraná e Santa Catarina encontraram prevalências de 14,9 e 21,6%, respectivamente (Beraldo *et al.,* 2004, Pogere *et al.,* 2005). Na região nordeste do Brasil a prevalência de colonização materna foi de 20,4% (Costa *et al .,* 2008)

A presença de taxas de colonização materna entre 15% e 25% coloca o Brasil em patamar preocupante, pois é possível que infecções neonatais de início precoce estejam ocorrendo sem serem identificadas. A incidência de septicemia causada por EGB em recém-nascidos tem sido relatada em 0,2-2/1000 nascidos vivos em diferentes populações (Grimwood *et al.,* 2002; Bertini *et al.,* 2006). Em Porto Alegre foi encontrada uma prevalência de 1/1000 nascidos vivos no período de janeiro de 1996 a junho de 1999 (Miura & Martin 2001). Estudos realizados na cidade de Campinas demonstraram a incidência de 1,4/1000 neonatos no período de fevereiro de 2003 a janeiro de 2004 (Nonura *et al.,*2005).

Fatores de Virulência

Moléculas localizadas na superfície bacteriana, bem como as secretadas contribuem para a patogenicidade do microrganismo. Essas moléculas permitem a colonização e invasão em células e tecidos do hospedeiro, favorecendo a disseminação do patógeno. Podemos destacar como principais fatores de virulência dos EGB a cápsula polissacarídica, a hemolisina, a C5a peptidase, o fator CAMP, a proteína C, a hialuronidase, o ácido lipotéico e a toxina CM101 (Liu & Nizet 2004, Doran & Nizet 2004).

A cápsula polissacarídica (CP) é encontrada na maioria dos isolados clínicos de EGB oriundos de doenças invasivas (Cheng *et al.,* 2001). Apesar da CP ser importante para evitar a fagocitose dos EGB por macrófagos, a estrutura não apresenta influência na sobrevivência intracelular da bactéria nesse tipo celular (Cornacchione *et al.*, 1998). A cápsula também é capaz de inibir a ativação da via alternativa do complemento, impedindo a ligação do C3b à superfície dos EGB (Marques *et al.*, 1992), bem como favorecendo a ligação ao fator H induzindo a

inativação do C3b pelo fator I (Edwards *et al.*, 1993). A regulação da produção da CP é dependente da taxa de crescimento celular (Paoletti *et al.*, 1996) e de fatores nutricionais, tais como crescimento em meios líquidos ou sólidos e a presença de soro humano (Platt *et al.*, 1994).

No inicio da infecção por EGB, a principal manifestação clínica observada é uma pneumonia severa com extensivo dano pulmonar (Vollman, 1976). A perda da integridade celular permite a entrada dos EGB diretamente na circulação, o que parece estar em grande parte relacionada com a ação da β-hemolisina - uma citolisina formadora de poros que lisa as células epiteliais e endoteliais, comprometendo sua função de barreira (Gibson *et al*., 1999: Doran *et al*., 2003). A atividade da β-hemolisina está normalmente associada à superfície bacteriana, sendo pouco detectada no meio extracelular (Liu & Nizet 2004). A β-hemolisina ainda exibe propriedades pró- inflamatórias, invasivas e apoptóticas que contribuem para patogenia da infecção bacteriana (Liu & Nizet 2004). Além disso, a β-hemolisina e componentes da parede celular atuam sinergeticamente induzindo macrófagos a produzir oxido nítrico sintase (INOS), gerando oxido nítrico um potente fator de cascata da sepse (Ring *et al.,* 2000).

Durante a infecção pulmonar, uma resposta imunológica esperada é a ativação da cascata do sistema complemento com posterior quebra do componente C5 (Strunk *et al.,* 1988). C5a é um peptídeo produzido pela clivagem do C5 que recruta leucócitos para o sitio de infecção (Fernandez & Hugli, 1978). A C5a peptidase é uma proteína de superfície dos EGB de 128 kDa que cliva o componente C5a (Hill *et al*.,1988), retardando assim o recrutamento de neutrófilos para o local da infecção (Herbert *et al.,* 2004).

A reação CAMP é nomeada pelas iniciais dos pesquisadores Christie, Atkins and Miunch - Peterson (Christie *et al*., 1944). Essa reação se refere à zona sinérgica de hemólise produzida por colônias de EGB adjacentes a colônias de *Staphylococcus aureus* em placas de ágar sangue (Liu & Nizet 2004). O fator CAMP oligomeriza formando poros nas células hospedeiras (Lang *et al*., 2003) e também se liga fracamente a porção Fc das imunoglobulinas humanas IgG e IgM (Jürgens *et al*., 1987).

A proteína C é uma proteína de superfície dos EGB formada pelos antígenos alfa e beta expressos independentemente (Spelleberg 2000). A proteína C é encontrada em 40 a 60% dos casos clínicos isolados e tem a capacidade de se ligar

inespecificamente a porção Fc da imunoglobulina humanas IgA, prejudicando a fagocitose por opsonização (Jerlstrom *et al*., 1996; Hickman *et al*, 1999).

A perda de integridade da barreira celular é uma importante etapa dentro do processo de estabelecimento de infecções bacterianas e, neste contexto, a hialuronidase exerce um importante papel. Os EGB secretam altos níveis desta enzima que degrada o ácido hialurônico, um componente principal do tecido conjuntivo e do sistema nervoso do hospedeiro. Esta proteína secretada pelos EGB é codificada pelo gen *hylB* e possui o peso molecular de 110 kDa (Li *et al.,* 2000). De forma geral, esta enzima atua na clivagem da ligação glicosídica entre os resíduos de N-acetil-β-D-glicosamina e ácido D-glicurônico, contribuindo para a virulência bacteriana ao facilitar a propagação dos EGB para os tecidos do hospedeiro (Gase *et al*., 1998).

O ácido lipoteicóico (ALT), um componente da superfície bacteriana é um importante indutor da expressão de citocinas (TNF-α, IL-1β e IL-6) em células mononucleadas (Standiford *et al*., 1994). Além disso, alguns estudos vêm associando essa molécula como importante adesina. Contudo, estes dados ainda são questionáveis visto que o ALT não conseguiu inibir a aderência dos EGB às células de epitélio vaginal (Tamura *et al*., 1994; revisto por Spellerberg, 2000).

A capacidade dos EGB invadir a membrana amniótica rica em colágeno tem sido demonstrada *in vitro*. A desorganização das fibrilas de colágeno pelos EGB pode acarretar a ruptura prematura da membrana por diminuir a força tensional e a elasticidade da membrana (Jackson *et al*., 1994; Lin *et al.,* 1996). Devido ao fato da membrana amniótica consistir de várias camadas de fibrilas de colágeno, a atividade colagenolítica dos EGB pode ser um importante fator de espalhamento, permitindo a invasão do patógeno na cavidade amniótica e subseqüente proliferação no fluído amniótico (Matorras *et al*., 1989). Estudos sugerem que proteinases bacterianas medeiam a destruição direta dos tecidos, resultando em dano para o mecanismo de defesa do hospedeiro (Travis *et al*., 1995; Soares *et al.,* 2008).

A exotoxina CM101 produzida pelos EGB está associada com a resposta inflamatória e a hipertensão pulmonar, características das infecções causadas por este patógeno, além de ser responsável pelos danos no endotélio pulmonar e formação de trombos (Hellerqvist *et al*., 1981; Hellerqvist *et al*., 1987; Yakes *et al*., 2000).

A ineficácia dos leucócitos polimorfonucleares e dos macrófagos alveolares pulmonares na eliminação da bactéria do espaço alveolar, e a habilidade dos EGB de aderir às células epiteliais respiratórias são essenciais para o desenvolvimento da pneumonia (Spellerberg, 2000; Farley, 2001). Desta forma, o potencial dos EGB para invadir e sobreviver no interior de células epiteliais respiratórias pode representar um mecanismo pelo qual a bactéria alcance a corrente sanguínea e outros órgãos.

Cultura de células epiteliais respiratórias

Células epiteliais respiratórias em cultura podem servir de modelos *in vitro* para a investigação de mecanismos bioquímicos e genéticos envolvidos nas funções normais desses tipos celulares (Gruenert *et al.*, 1995). Culturas primárias de células epiteliais respiratórias têm sido particularmente importantes para o entendimento dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento de doenças como fibrose cística (Yamaya *et al.*, 1991a), na caracterização de infecções virais do epitélio respiratório (Becker *et al.*, 1992), no avanço e caracterização da inflamação (Tosi *et al.*, 1992) e na progressão neoplásica das vias aéreas (Reddel *et al.*, 1991).

Apesar das culturas primárias de células epiteliais respiratórias desempenharem importante papel na caracterização de funções específicas dessas células, apresenta limitações pelo número de células viáveis que podem ser geradas a partir do tecido disponível. Essa limitação pode ser compensada por repetidas subculturas de culturas primárias, apesar de que passagens subseqüentes são geralmente acompanhadas pela perda ou redução de certas características específicas (Gruenert *et al.*, 1995). Entretanto, através da manipulação das condições de cultura, certas características diferenciadas podem ser restauradas ou mantidas durante as subculturas repetidas (Yamaya *et al.*, 1991).

Visando resolver as limitações encontradas na cultura primária das células epiteliais respiratórias, a maioria dos estudos desenvolvidos com essas células está sendo realizada com o uso de células transformadas, as quais podem ser derivadas de carcinomas das vias aéreas ou geradas através da exposição a agentes virais, químicos ou físicos (transformação *in vitro*). Uma vez transformadas, essas células

passam a apresentar maior habilidade de proliferação, ou seja, células transformadas adotam uma característica de crescimento ilimitado. Isso auxilia no estudo de uma maior quantidade de características dessas células, além daquelas proporcionadas pela cultura primária (Gruenert *et al.*, 1995).

A linhagem humana de células epiteliais respiratórias A549 originada a partir de adenocarcinoma de pulmão humano possui propriedades de células epiteliais alveolares do tipo II (Giard, *et al.,* 1973, Lieber, *et al*., 1976). O tipo II de células epiteliais alveolares possui numerosas organelas em seu citoplasma chamadas de corpos lamelares que estocam surfactante (Foster *et al.,*1998). Além de secretarem surfactante, células alveolares do tipo II também induzem a produção de peptídeos antimicrobianos, citocinas, quimiocinas, e outros metabólicos que dão início ao complexo processo de permeabilidade vascular, recrutamento celular, hipersecreção da mucosa e remodelamento das vias aéreas que caracterizam a inflamação das vias aéreas (Polito & Proud, 1998; Zhang *et al.,* 2001). Estudos demonstram que as células epiteliais A549 cultivadas em monocamadas exibem uma distribuição uniforme de corpos lamelares com morfologia semelhante ao epitélio alveolar, além de expressar genes de mucinas respiratórios (MUC5AC, MUC1 e MUC5B), p53 e citoqueratinas (polipeptídios 7, 8, 18 e 19) (Blobel *et al.,* 1984 Young *et al.,* 1996; Berger *et al.,* 1998; Foster *et al.,* 2008).

Devido a essas características, as células A549 desempenham um importante papel como ferramenta auxiliar nas pesquisas das funções do epitélio respiratório e dos mecanismos de interação celular com microrganismos, como os EGB, os quais normalmente estão associados com o desenvolvimento de pneumonia em recém-nascidos e adultos.

Interação Bactéria-Célula Hospedeira

Os mecanismos de aderência e invasão dos EGB às células hospedeiras ainda não foram totalmente esclarecidos. Ensaios de interação *in vitro* vêm sendo desenvolvidos com diferentes linhagens celulares polarizadas e não polarizadas: células de epitélio vaginal (Teti *et al.,* 1987, Tamura *et al.,* 1994), epitélio bucal-BEC (Teti *et al.,* 1987; Wibawan, Lämmler & Passaribu, 1992; Nagao *et al.,* 1995), epitélio

pulmonar (Tamura *et al.,* 1994; São José *et al.,* 2006), células endoteliais (Kallman *et al.,* 1993; Santos *et al.,* 2005; Soares *et al.,* 2008), macrófagos murinos e humanos (Valentin-Weigand *et al.,* 1997; Winram *et al.,* 1998; Cornacchione, Scaring & Fettucciari, 1998; Peotta *et al.,* 2001; Teixeira *et al.,* 2001).

Pesquisadores descreveram a participação de diferentes adesinas e receptores celulares envolvidos na interação de EGB com células hospedeiras. O tratamento prévio dos microrganismos com proteases sugeriu a participação de proteínas de superfície bacteriana por reduzir a aderência às células eucarióticas (Bulgakova *et al.,* 1986; Miyazaki *et al.,* 1988; Tamura *et al*, 1994). Adesinas de natureza protéica foram demonstradas na superfície de EGB pertencentes aos sorotipos Ia, III e V em ensaios com células epiteliais bucais – BEC (Nagao *et al.,* 1995) e macrófagos murinos (Monteiro *et al*., 2004). Receptores glicoprotéicos foram demonstrados na superfície de BEC (Nagao *et al.,* 1995).

A capacidade de aderência dos EGB também foi descrita para as proteínas da matriz extracelular como: fibrinogênio (Usui *et al.,* 1982), fibronectina (Tamura & Rubens, 1995) e laminina (Spellerberg *et al.,* 1999), bem como para filamentos intermediários (citoqueratina 8) do citoesqueleto (Tamura & Nittayajarn, 2000). A capacidade de translocação dos EGB da região apical para região basolateral em células epiteliais de rim de cão - MDCK I (Kallman & Kihlstrom, 1997) e em células endoteliais microvasculares do sistema nervoso central (Nizet *et al.,* 1997) parece estar envolvida na patogênese da meningite.

O processo de fagocitose de EGB requer a opsonização mediada por anticorpos específicos e/ou complemento e por receptores CR3 via polissacarídeo capsular (Antal *et al.,* 1992). O envolvimento de mecanismos anticorpo-independentes na defesa contra EGB foi demonstrado pela fagocitose de amostras de EGB sorotipo III na ausência de anticorpos tipo-específicos por macrófagos J774. Algumas amostras de EGB foram capazes de invadir e sobreviver no interior de diferentes tipos celulares (Valentin-Weigand *et al.,* 1996). A localização intracelular de EGB em macrófagos pode proteger contra atividade microbicida de polimorfonucleares e ação de antimicrobianos (Gotoff & Boyer, 1985). A sobrevivência bacteriana no interior dos fagócitos sugeriu falha no mecanismo de destruição do EGB por ausência de opsoninas e/ou desenvolvimento de mecanismos de escape (Valentin-Weigand *et al.,* 1996).

Dentre as estratégias contra os mecanismos de fagocitose utilizadas por vários patógenos incluem a inibição da fusão fagossoma-lisossoma e o escape dos fagossomas acidificados no citoplasma da célula hospedeira (Moulder, 1985). A permanência de EGB sorotipo III durante 24h no interior de fagossomas sugeriu uma possível inibição da fusão fagossoma-lisossoma (Finlay & Falkow, 1989; Falkow *et al.,* 1992; Valentin-Weigand *et al.,* 1996). Entretanto, estudos em nosso laboratório demonstraram que amostras de EGB sorotipos Ia, III e V foram incapazes de inibir o processo de fusão fago-lisossoma em macrófagos murinos (Teixeira *et al.,* 2001). Outros pesquisadores utilizando amarelo de Lúcifer - um método indireto de monitoramento da fusão entre vacúolos fagociticos e lisossomos - evidenciaram a fusão de EGB com vacúolos acídicos de macrófagos murinos (Kielian & Cohn, 1980; Teixeira *et al*., 2001).

Outras técnicas também têm sido utilizadas para monitoramento de vacúolos acídicos como a marcação com laranja de acridina, amarelo de Lúcifer e lisotracker que consiste de uma base conjugada fraca usada como marcador de acidificação e maturação fagossomal (Via *et al*., 1998; Toyooka *et al*., 2005).

Várias bactérias patogênicas utilizam à indução da fagocitose em células fagocíticas não profissionais, tais como células epiteliais, como estratégia de sobrevivência, multiplicação e disseminação (Rabinovitch, 1995; Sansonetti, 2001). Células epiteliais são capazes de internalizar bactérias que normalmente são extracelulares, como *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* e *Neisseria gonorrhoeae* **(**LaPenta *et al.,* 1994; Talbot *et al.,* 1996; Sinha *et al.,* 1999; Zenni *et al.,* 2000).

Apesar dos EGB serem internalizados pelas células epiteliais respiratórias, nenhuma pesquisa relacionada com a persistência intracelular e a permanência bacteriana em vacúolos acídicos tem sido realizada para esse tipo celular. Desta forma, estudos que visem analisar os mecanismos que protegem os EGB das defesas do hospedeiro e o monitoramento em vacúolos acídicos tornam-se relevantes.

EGB e morte celular

A capacidade de patógenos de promoverem apoptose pode ser importante para o início da infecção bacteriana, sobrevivência e fuga da resposta imune do hospedeiro (Wyllie *et al.,* 1980; Cohen, 1993). Portanto, a apoptose pode ser uma estratégia vantajosa por evitar o desencadeamento e recrutamento de mecanismos de defesa não específicos (Fettucciari *et al. ,*2000).

A apoptose é caracterizada por alterações morfológicas específicas, incluindo retratibilidade celular e condensação da cromatina, seguido de fragmentação nuclear e citoplasmática. Um dos primeiros eventos em apoptose é a clivagem do DNA em múltiplos de 200 pb de comprimento (Anderson, 1997). Este processo dependente da família de cisteína proteases denominada caspases e de reguladores de apoptose da família de proteínas Bcl-2. As caspases-9 e -8 iniciam a morte celular, enquanto outras, como a caspase-3, são efetores terminais da morte celular. As proteínas Bcl-2, em contrapartida, residem no exterior da membrana mitocondrial, onde promovem sobrevivência celular através da ligação e supressão da atividade dos membros da família Bcl-2 que possuem a finalidade pró-apoptótica, como a Bax e Bak (Reed *et al.,* 1997; Bernardi *et al.,* 1999).

Estudos demonstram que após a internalização e escape dos endossomas os *Staphylococcus aureus* induzem apoptose em células epiteliais, confirmada por três diferentes técnicas: fragmentação do DNA por eletroforese, ensaios de TUNEL e mudanças na morfologia das células infectadas (Bayles *et al.,* 1998). Em outras pesquisas, células epiteliais infectadas com estreptococos do grupo A exibiram dramáticas mudanças morfológicas, condensação da cromatina e segmentação do núcleo, características típicas de apoptose. Além disso, a caspase-1 foi super expressa em células epiteliais humanas após a infecção com estreptococos do grupo A (Tsai *et al.,* 1999).

Outra técnica bastante utilizada para detectar a apoptose é a marcação celular com anexina-V FITC e iodeto de propídio e análise por citometria de fluxo. Células endoteliais infectadas com *Pseudomonas aeruginosa* apresentaram marcação para anexina-V indicando apoptose inicial e anexina-V mais iodeto de propídio que indica apoptose tardia (Valente *et al.,* 2000).

A descoberta que os EGB são citotóxicos para células endoteliais, epiteliais, macrófagos e fibroblastos através da beta-hemolisina (Nizet *et al.,* 1997; Fettucciari *et al . ,*2000; Pritzlaff *et al.,* 2001; Doran *et al.,* 2003; Kapplan *et al.,* 2008) sugere que este microorganismo também possa induzir apoptose nessas linhagens

celulares. A apoptose induzida pelo EGB pode representar uma importante estratégia utilizada pela bactéria para limitar a inflamação durante a infecção e facilitar a sua fuga do sistema imune do hospedeiro.

Alguns estudos demonstraram que amostras de EGB sorotipo III induziram apoptose em macrófagos murinos, confirmada por alterações morfológicas nas células infectadas acompanhada de fragmentação do DNA. A apoptose em macrófagos se mostrou dependente da síntese protéica, mas independente das caspases-1 e -3 (Fettucciarri *et al.,* 2000).

Lehnardt e colaboradores (2007) demonstraram que o EGB foi capaz de promover apoptose em células da microglia, demonstrado por ensaios de TUNEL e confirmado morfologicamente pela marcação com DAPI com a condensação, retração, e fragmentação nuclear. A caspase-8 desempenhou um papel essencial na indução de apoptose, enquanto a caspase-3 foi dispensável.

A externalização de resíduos fosfatidilserina para o exterior da membrana plasmática das células apoptóticas permite a detecção da apoptose através da marcação de anexina-V conjugada com FITC (AV-FITC) em tecidos, células de embriões ou cultivadas (Bossy-Wetzel & Green, 2000). Uma vez que a apoptose está vinculada com a marcação AV-FITC, essas células positivas podem ser visualizadas por microscopia de fluorescência ou por ensaios de citometria de fluxo. A vantagem da marcação com anexina-V é sua sensibilidade (pode detectar apoptose em uma única célula). A desvantagem é que as membranas das células em necrose também são marcadas. A perda de integridade da membrana é uma característica de morte celular por necrose, então células necróticas podem ser marcadas com corantes específicos de ácidos nucléicos impermeáveis a membrana como iodeto de propídio (IP). Desse modo, a integridade da membrana das células apoptóticas pode ser demonstrada pela exclusão destes corantes (Valente *el al.,* 2000; Elmore, 2007; Kaplan *et al.,* 2008).

Devido à alta sensibilidade do método de detecção de apoptose por marcação com AV-FITC e IP com posterior leitura em citometro de fluxo, esta técnica foi escolhida para as análises de detecção de apoptose em células epiteliais respiratórias A549 por amostra de EGB sorotipo III.

1. OBJETIVOS

Dados indicam a grande incidência de EGB em nossa comunidade, tornando relevantes estudos que visem o melhor entendimento da patogenia dos EGB no hospedeiro humano. Como o pulmão é o primeiro órgão a entrar em contato com os EGB, ocasionando principalmente pneumonia em recém-nascidos, o principal objetivo deste trabalho foi analisar os mecanismos de aderência, invasão e persistência intracelular em células epiteliais respiratórias A549, bem como a capacidade citotóxica e apoptótica de amostras de EGB sorotipo III isoladas de paciente e de portados. Para isso foram realizadas as seguintes etapas:

- Análise qualitativa e quantitativa da cinética de aderência e de invasão de duas amostras de EGB pertencentes ao sorotipo III com células epiteliais respiratórias A549;
- Análise de persistência intracelular das amostras de EGB com células epiteliais respiratórias A549;
- Monitoramento de endocitose das amostras de EGB pelas células epiteliais respiratórias por ensaios de microcopia confocal a laser;
- Análise morfológica da interação de EGB por microscopia óptica;
- Efeito citotóxico das amostras de EGB em células A549 pelo método do *Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide* (MTT);
- Análise da indução de apoptose por amostras de EGB através da marcação com Anexina-V e iodeto de propídio.

2. METODOLOGIA

2.1 Amostras bacterianas de EGB

Foram utilizadas duas amostras de EGB pertencentes ao sorotipo III: 80340 (vagina-portador) e 90356 (líquor-paciente), cedidas pelo Dr. Leslie C. Benchetrit, Laboratório de Cocos Patogênicos, Instituto de Microbiologia Professor Paulo Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

2.2 Conservação, cultivo e preparo das suspensões bacterianas

Os microrganismos foram estocados a -20°C em meio líquido *Brain Heart Infusion* (BHI; Difco Laboratories Detroit, MI, USA), contendo glicerol a 20% até a realização dos experimentos. Para os experimentos de interação celular, as amostras foram semeadas em meio base de agar sangue contendo 5% de hemácias de carneiro (BAB; Difco) e incubadas por 24 h a 37°C.

As amostras bacterianas foram cultivadas em meio BHI até atingirem a padronização de 0,4 unidades de densidade ótica (~1,0 x 10^8 UFC/mL) em espectrofotômetro (comprimento de onda de 540 nm). Após o crescimento, as suspensões bacterianas foram centrifugadas 2 vezes lavadas com meio DMEM puro (Dulbecco's modified Eagle's medium; Sigma Chemical Co.,St. Louis, MO, USA) por 10 min a 1100 *g*. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspenso em meio de cultura DMEM (Soares *et al.*, 2008).

2.3 **Manutenção e cultivo da linhagem de células epiteliais respiratórias A549**

A linhagem epitelial A549 foi cedida pelo Professor Dr. André Luís Souza dos Santos, Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo Góes (IMPPG), Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). As células A549 foram mantidas em atmosfera de CO_2 a 5% e temperatura de 37°C em meio DMEM completo (suplementado com 10% de soro fetal bovino [SFB; Cultilab, Campinas, São Paulo, Brasil], fungizona 2,5 µg/mL [Bristol Myers Squibb Brasil, São Paulo, Brasil], estreptomicina 40 µg/mL e penicilina 500 U/mL [Ambas Gibco, BRL, Grand Island, NY, EUA]) em garrafas estéreis de plástico de 25 cm^2 (Corning Inc, NY, USA) ou em microplacas de 24 poços (Soares *et al.,* 2008).

2.4 **Preparação de monocamadas de células epiteliais respiratórias A459**

A partir das garrafas com células A549 confluentes foi realizada a tripsinização do tapete celular através da adição tripsina diluída a 0,025%. Após o descolamento das células, foi adicionado meio DMEM completo para interromper a reação de tripsinização e o material foi submetido à centrifugação por 10 min a 120xg. O sedimento foi ressuspenso em 10 mL de meio DMEM completo e submetido à contagem de células A549 em câmara de Neubauer. Microplacas de 24 poços para cultura de células foram incubadas com 60.000 células/poço para a realização dos ensaios de interação celular (Santos *et al*., 2009).

2.5 **Ensaios de interação de EGB com células epiteliais respiratórias A549**

Monocamadas confluentes de células A549 (10^5 células) aderidas em microplacas de 24 poços foram lavadas 7 vezes com tampão PBS-glicose antes dos ensaios de interação. Após a lavagem, as monocamadas foram infectadas com

amostras bacterianas (10^7 UFC/mL) em meio DMEM puro (Rubens *et al.*¸ 1992), na relação de 1 célula eucariótica para 100 células bacterianas (1:100). A incubação foi realizada em diferentes intervalos de tempo (0 h, 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h e 8h) a 37°C e em ambiente de 5% de CO_2.

Após cada período de incubação foi realizada a lavagem das células A549 infectadas com salina estéril 0,9% para remoção dos microrganismos não aderidos. O tapete celular foi rompido com tampão de lise (Tris 25mM, EDTA 5mM, NaCl 150mM e IgePal 1%; Sigma) e o lisado submetido a diluições seriadas e plaqueado em meio BAB para quantificação do número total de bactérias viáveis (aderidas e internalizadas) em unidades formadoras de colônias (UFC/mL).

Em outra série de poços da microplaca contendo células A549 infectadas foi realizada a incubação com penicilina (5 µg/mL; Sigma) e gentamicina (100 µg/mL; Sigma), após cada intervalo de tempo, por um período de 2 h a 37°C em ambiente de 5% CO_2. Os antibióticos foram utilizados para a quantificação do número de bactérias intracelulares viáveis (UFC/mL). Após incubação, os poços foram lavados com salina estéril a 0,9% e as células eucarióticas lisadas e plaqueadas para obtenção do índice de bactérias intracelulares viáveis (Peotta *et al.,* 2001). O número de aderência das amostras de EGB em células A459 calculado pela seguinte fórmula:

N° de bactérias aderidas = N° total de bactérias viáveis – N° de bactérias intracelulares viáveis

2.6 **Ensaios de persistência intracelular das amostras de EGB sorotipo III com células epiteliais respiratórias A549**

Monocamadas confluentes de células A549 (10^5 células) aderidas em microplacas de 24 poços foram lavadas 7 vezes com tampão PBS-glicose. Após a lavagem, as monocamadas foram infectadas com amostras bacterianas (10^7 UFC/mL) em meio DMEM puro por 4h a 37^0C em ambiente de 5% CO_2, na relação de 1 célula eucariótica para 100 células bacterianas (1:100).

Após o período de incubação foi realizada a lavagem das células A549 infectadas com salina estéril 0,9% para remoção dos microrganismos não aderidos. A monocamada epitelial infectada foi incubada com penicilina (5 µg/mL) e gentamicina (100 µg/mL) por 2 h a 37°C e 5% CO_2. Os antibióticos foram mantidos durante a cinética de persistência intracelular realizada em diferentes intervalos de tempo (0 h, 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 18 h e 24h) a 37°C e em ambiente de 5%CO_2.

O sobrenadante contendo antibiótico foi removido, o tapete celular foi lavado salina estéril 0,9% e rompido com tampão de lise (Tris 25mM, EDTA 5mM, NaCl 150mM e IgePal 1%) e o lisado submetido a diluições seriadas e plaqueado em meio BAB para quantificação do número bactérias intracelulares viáveis em UFC/mL (Cornacchione *et al.,* 1998. Com moficações).

2.7 **Marcação do EGB com isotiocianato de fluoresceína (FITC)**

As bactérias (10^8 UFC/mL) foram centrifugadas por 10mim a 1100g, o sobrenadante removido e o sedimento ressuspenso em tampão carbonato-bicarbonato 0,1M pH 9,6. Posteriormente, foi adicionado 100µg/mL de FITC e a suspensão bacteriana foi mantida em temperatura ambiente durante 1h, sob agitação. As bactérias marcadas foram lavadas em PBS e ressuspensas em DMEM puro (Drevets & Campbell, 1991)

2.8 **Microscopia confocal a laser das células A549 infectadas com amostras de EGB sorotipo III**

A detecção da localização intracelular dos EGB foi realizada com Lysotracker Red DND-99 (Molecular Probes; Oregon, USA) que consiste em uma base conjugada fraca usada como marcador de acidificação e maturação fagosomal (Via *et al.,* 1998).

Células A549 (10^5 células) cultivadas sobre lamínulas foram tratadas com Lysotracker Red DND-99 (75nM) por 2 h e infectadas com EGB (10^8 UFC/mL)

marcado com FITC por 4h a 37°C em ambiente de 5% CO_2 na relação de 1 célula eucariótica para 100 células bacterianas (1:100). Posteriormente, as lamínulas foram montadas em lâminas de microscopia e monitoradas por microscopia confocal a laser em icroscópio Zeiss 310. Aumento 1000X (Toyooka *et al.,* 2005. Com modificações).

2.9 **Microscopia óptica da interação das células epiteliais respiratórias A549 com amostras de EGB sorotipo III**

Garrafas de 25cm^2 contendo monocamadas de células A549 confluentes foram lavadas com tampão PBS-glicose. Após a lavagem, as monocamadas foram infectadas ou não com amostras bacterianas (10^8 UFC/mL) em meio DMEM puro.

Após o período de incubação foi realizada a lavagem das células A549 infectadas com salina estéril 0,9% para remoção dos microrganismos não aderidos. As garrafas contendo células A549 infectadas foram incubada com penicilina (5 µg/mL) e gentamicina (100 µg/mL), por um período de 2 h a 37°C e 5% CO_2. Após a incubação com antibióticos, foi marcado diferentes intervalos de tempo (0 h, 2 h, 4 h, 18 h e 24h) a 37°C e em ambiente de CO_2 a 5%. As células foram monitoradas com microscópio invertido aumento 600X (Kwiecien *et al.,* 1994. Com modificações)

2.10 **Ensaios de citoxidade pelo *Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide* das amostras de EGB sorotipo III em células epiteliais humanas A549.**

Monocamadas de A549 (10^5 células) foram infectadas ou não com EGB (10^7 UFC/mL) durante 2h e 4h a 37^{0}C em ambiente de 5% CO_2, na relação de 1 célula eucariótica para 100 células bacterianas (1:100). Após o período de incubação foi realizada a separação do sobrenadante e o descolamento do tapete celular com tripsina 0,025%. O material proveniente da tripsinização e do sobrenadante foram reunidos, submetido ao tratamento com 1mg/mL de *Thiazolyl Blue Tetrazolium*

Bromide (MTT; Sigma) por 1h a 37°C e ressuspenso em isopropanol para leitura em leitor de ELISA a 595 nm. Como os EGB reduzirem o MTT, a redução bacteriana do MTT foi estimada e descontada. A porcentagem de citotoxicidade foi calculada pela seguinte fórmula: percentagem de citotoxicidade = 100 x (1 – células epiteliais infectadas/células epiteliais não infectadas) (Arakaki *et al.,* 2002).

2.11 **Análise da apoptose através das marcações com Anexina V-FITC e Iodeto de Propídio por citometria de fluxo**

Um dos primeiros indícios de apoptose é a translocação da fosfatidilserina da hemicamada intracelular para a extracelular da membrana plasmática. Uma vez exposta ao ambiente extracelular, a fosfatidilserina fica disponível para Anexina V (AV), uma proteína Ca^{2+} dependente com alta afinidade para a fosfatidilserina. Contudo, a marcação com iodeto de propídio (IP) foi realizada para verificar fases posteriores da apoptose ou necrose, pois o IP se liga a ácidos nucléicos após a perda da integridade da membrana plasmática (Kaplan, 2008).

Células A549 cultivadas até a confluência em garrafas apropriadas de $25cm^2$ foram lavadas duas vezes e infectadas com a amostra 90356-líquor (10^8 UFC/mL) 6h e 12h a 37ºC e 5% de CO_2. Como controle positivo, células A549 foram tratadas com 10mM de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em DMEM puro. Posteriormente, as células epiteliais presentes no sobrenadante foram recolhidas e as células aderidas foram descoladas do substrato com tripsina 0,025% (contendo EDTA) e colocadas em DMEM contendo 10% de SFB. Em seguida, estes dois grupos de células - as que estavam no sobrenadante e àquelas liberadas da placa de cultivo - foram reunidos em uma mesma suspensão, centrifugados a 120xg por 10mim e ressuspensos em PBS-Ca^{2+} 0,1M gelado. Após, 10^6 células foram ressuspensas em tampão de ligação à AV, segundo recomendação do fabricante do kit (BD Pharmigen). Alíquotas de 100 mL foram incubadas com 5µL de AV-FITC e 5µL de IP por 15mim em temperatura ambiente no escuro.

As células foram submetidas ao FACScalibur (Becton & Dikison) em no máximo 1h após incubação com AV/IP. Os seguintes controles foram realizados: células não marcadas, células marcadas apenas com AV-FITC, células marcadas

apenas com PI e células duplamente marcadas (AV/IP), analisando-se 10000 eventos para cada condição. O sinal emitido pela AV-FITC foi lido em filtro FL1 e o sinal emitido pelo PI através do FL2 (Valente *et al*., 2000).

2.12 **Análise estatística**

Os resultados dos ensaios de interação EGB-células epiteliais A549 foram analisados pelo teste *t* de Student. $P \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3. RESULTADOS

3.1 **Análise da interação de EGB com células epiteliais respiratórias A549.**

Os resultados da cinética de aderência celular das duas amostras de EGB do sorotipo III estão apresentados na **Figura 1**. Ambas as amostras apresentaram pico máximo de aderência após 6h de incubação. A amostra 90356-líquor isolada de paciente apresentou maior capacidade de aderir (1,67 x 10^7 UFC/mL; $P \leq 0,05$) em relação à amostra 80340-vagina isolada de portador (7,00 x 10^6 UFC/mL; $P \leq 0,05$).

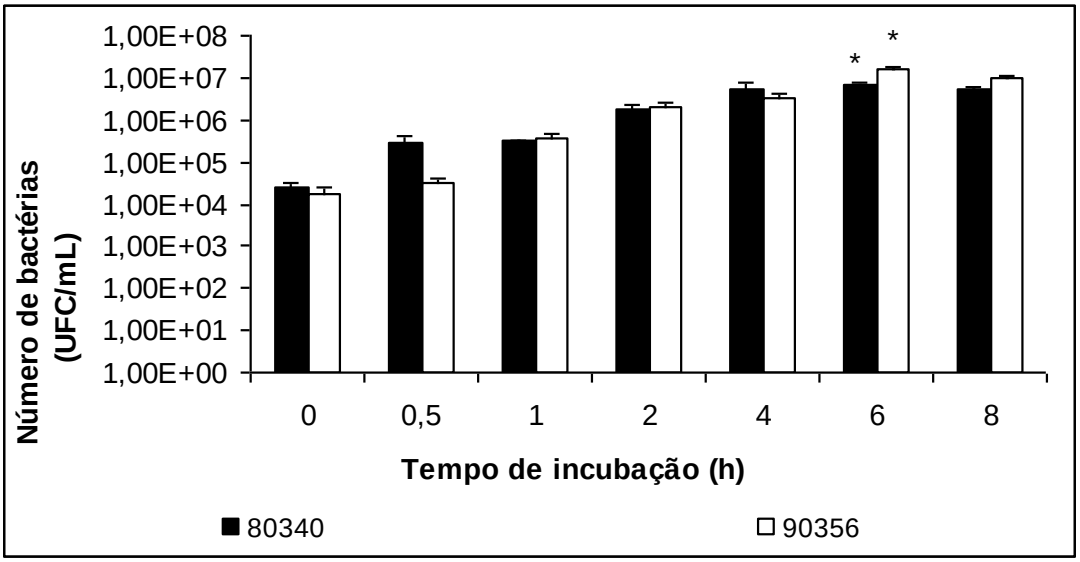


Figura 1: Aderência das amostras de EGB sorotipo III com células epiteliais respiratórias**.** Cada resultado corresponde à média ± desvio padrão de quatro experimentos. *$P \leq 0,05$.

Os resultados referentes à cinética de invasão celular das amostras de EGB sorotipo III estão mostrados na **Figura 2.** Ambas as amostras apresentaram capacidade de invadir as células epiteliais respiratórias A549. No entanto, a amostra 90356-líquor também demonstrou maior capacidade invasiva em relação à amostra de portador 80340-vagina em 4h de incubação (2,06 x 10^3 UFC/mL; $P \leq 0,05$). Após 8h de interação a amostra 80340-vagina foi mais invasiva (1,38 x 10^3 UFC/mL; $P \leq 0,05$).

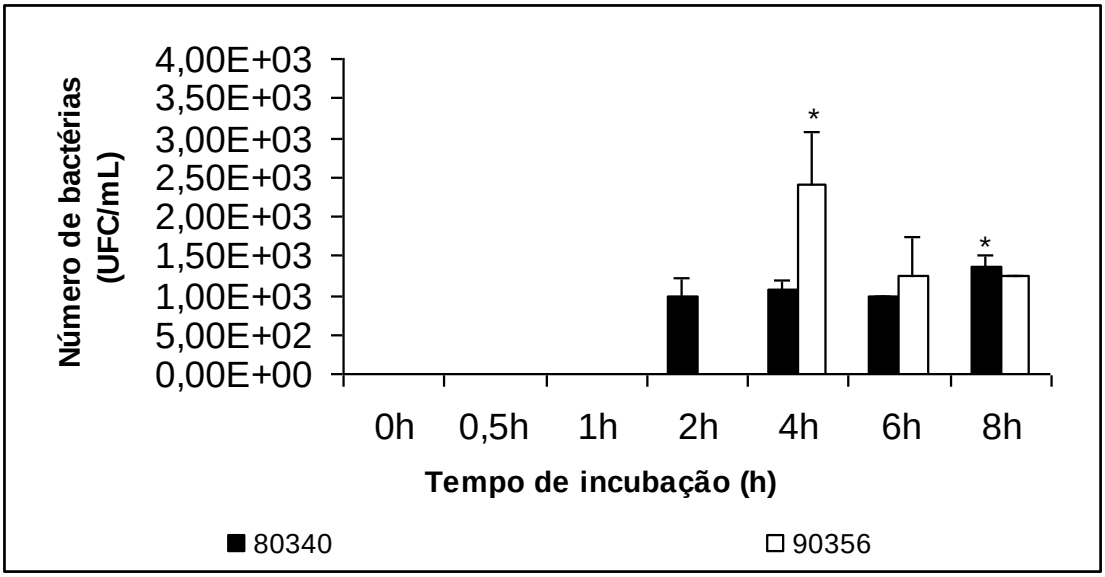
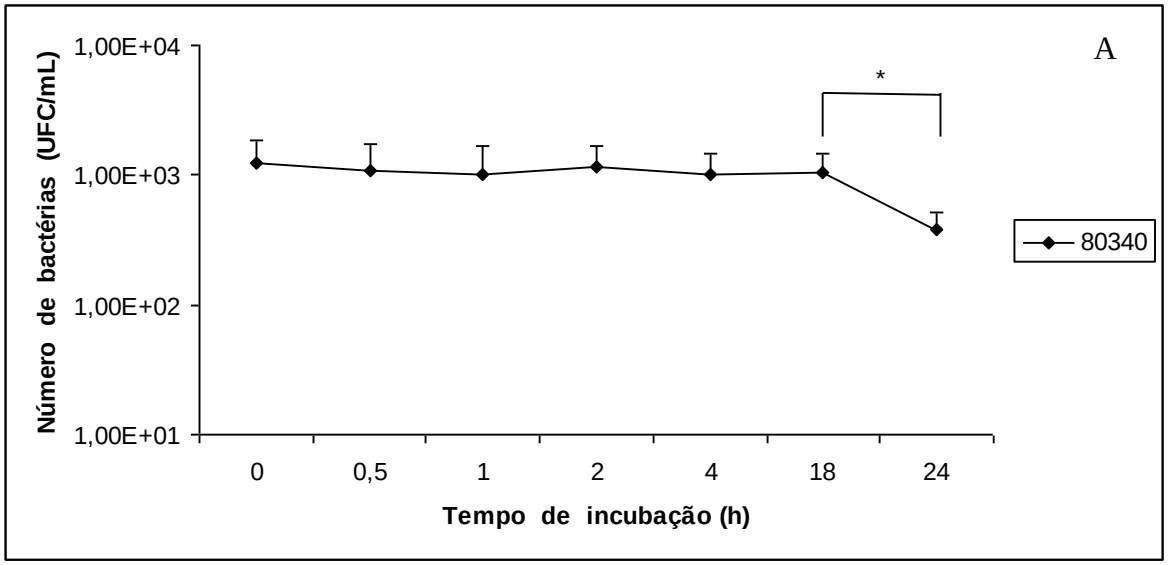


Figura 2: Invasão das amostras de EGB sorotipo III em células epiteliais respiratórias. Cada resultado corresponde à média ± desvio padrão de quatro experimentos. *$P \leq 0,05$.

Nas **Figuras 3ª-B** observamos a persistência intracelular das amostras de EGB sorotipo III com células A549. As duas amostras apresentaram persistência intracelular sem replicação no epitélio respiratório até 24h de interação. A amostra 80340-vagina demonstrou queda significativa na contagem de UFC/mL entre 18h e 24h de interação ($P \leq 0,05$). Em contraste, a amostra 90356-líquor apresentou queda significativa entre os tempos de 0h a 0,5h e de 2h a 4h de interação ($P \leq 0,05$). Após 24h de incubação as duas amostras apresentaram persistência intracelular similar sem diferenças significativas.



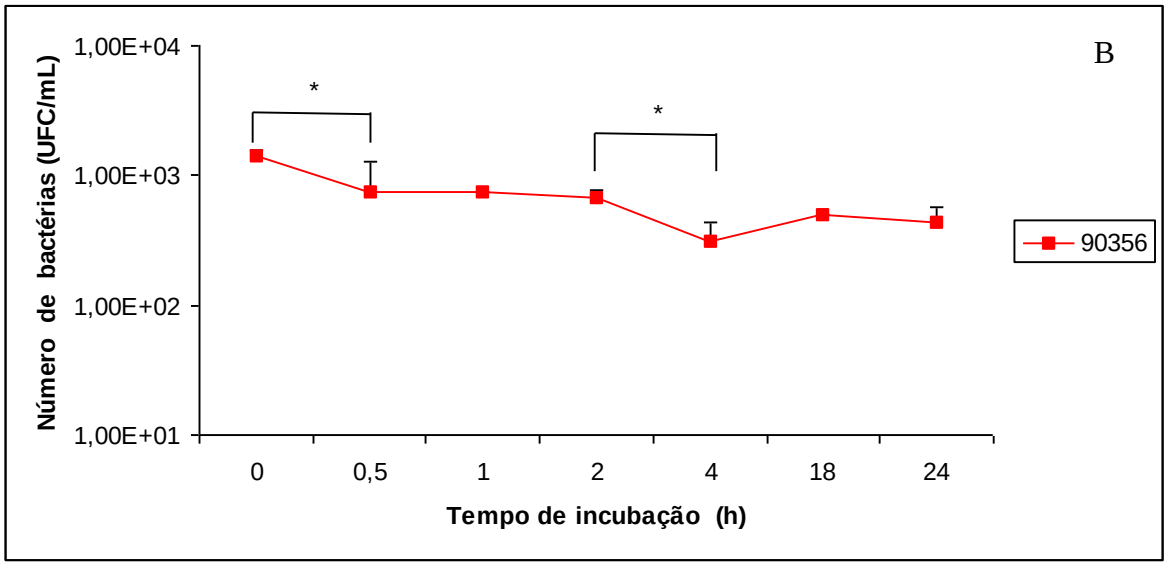


Figura 3. Persistência intracelular das amostras de EGB sorotipo III em células epiteliais respiratórias. (A) Amostra 80340; (B) Amostra 90356. O tempo de incubação começou a ser marcado após o pico de invasão celular (4h), acrescido de 2h de incubação com antibióticos para eliminar as bactérias

extracelulares. Cada resultado corresponde à média ± desvio padrão de quatro experimentos. *$P \leq 0,05$.

3.2 **Análise da presença de EGB em vacúolos acídicos das células epiteliais A549**

Com a finalidade de monitorarmos a endocitose das diferentes amostras de EGB pelas células epiteliais respiratórias, monocamadas confluentes foram marcadas com lisotracker vermelho, infectadas com as amostras bacterianas marcadas com FITC durante 4h a 37°C e 5% de CO_2 e analisadas por microscopia confocal a laser. Na **Figura 4** observamos a presença de EGB-FITC em vacúolos acídicos marcados com lisotracker, demonstrando fusão do fagossoma com lisossoma.

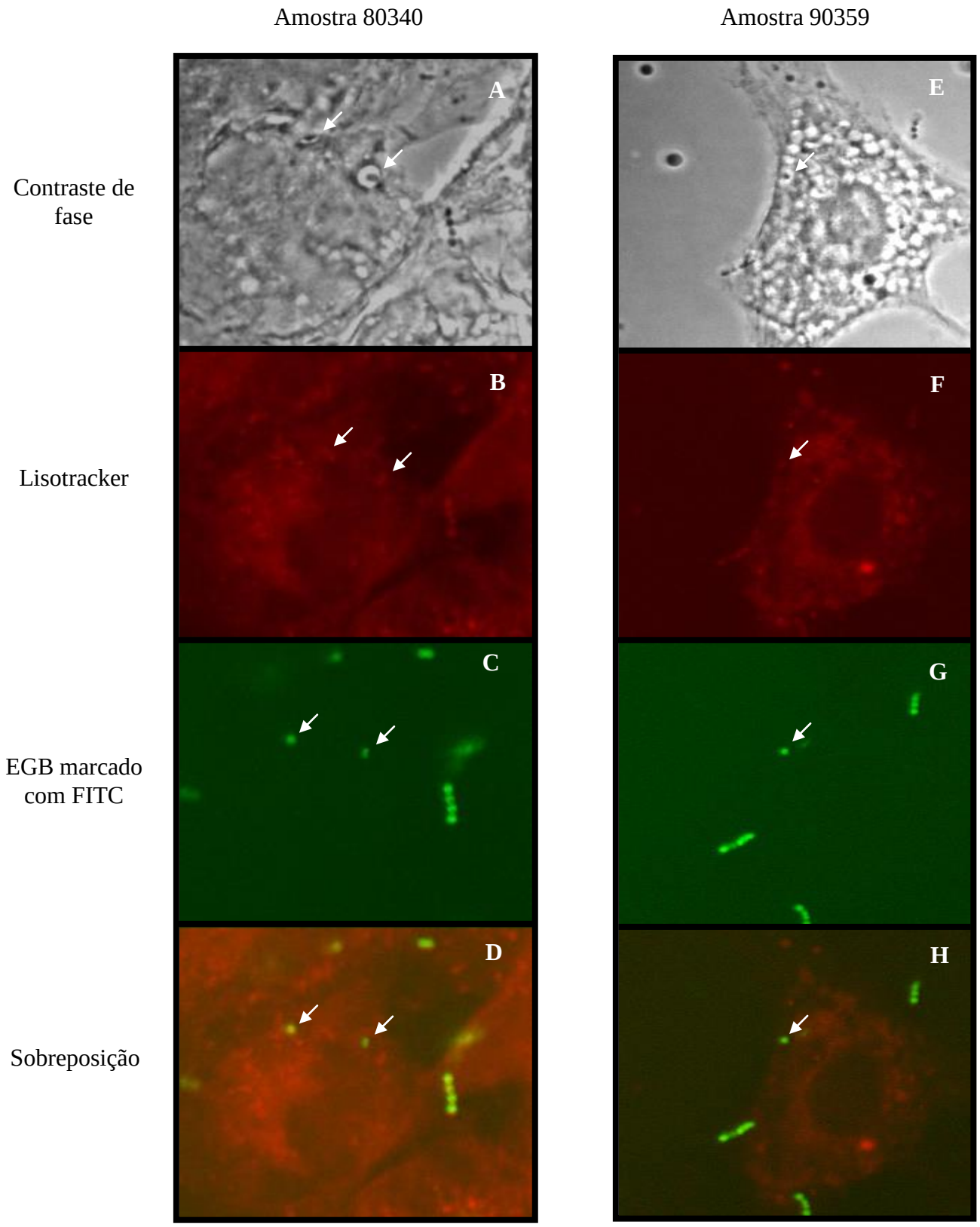


Figura 4: Microscopia confocal a laser das células A549 infectadas com amostras de EGB sorotipo III após 4h de infecção. (A-D) A549 + EGB-III 80340-vagina (E-H) A549 + EGB-III 90356-líquor. Setas indicam a localização das amostras bacterianas estudadas. Aumento 1000X

3.3 **Análise morfológica da interação de EGB com células epiteliais respiratórias A549.**

Na **Figura 5** observamos as micrografias ópticas da análise morfológica da interação EGB-células epiteliais respiratórias A549. Nossos dados mostram que as amostras 80340-vagina e 90356-líquor promovem a vacuolização das células epiteliais em relação ao controle, em todos os tempos testados. A amostra 90356-líquor demonstrou maior capacidade de gerar vacuolização que a amostra 80340-vagina.

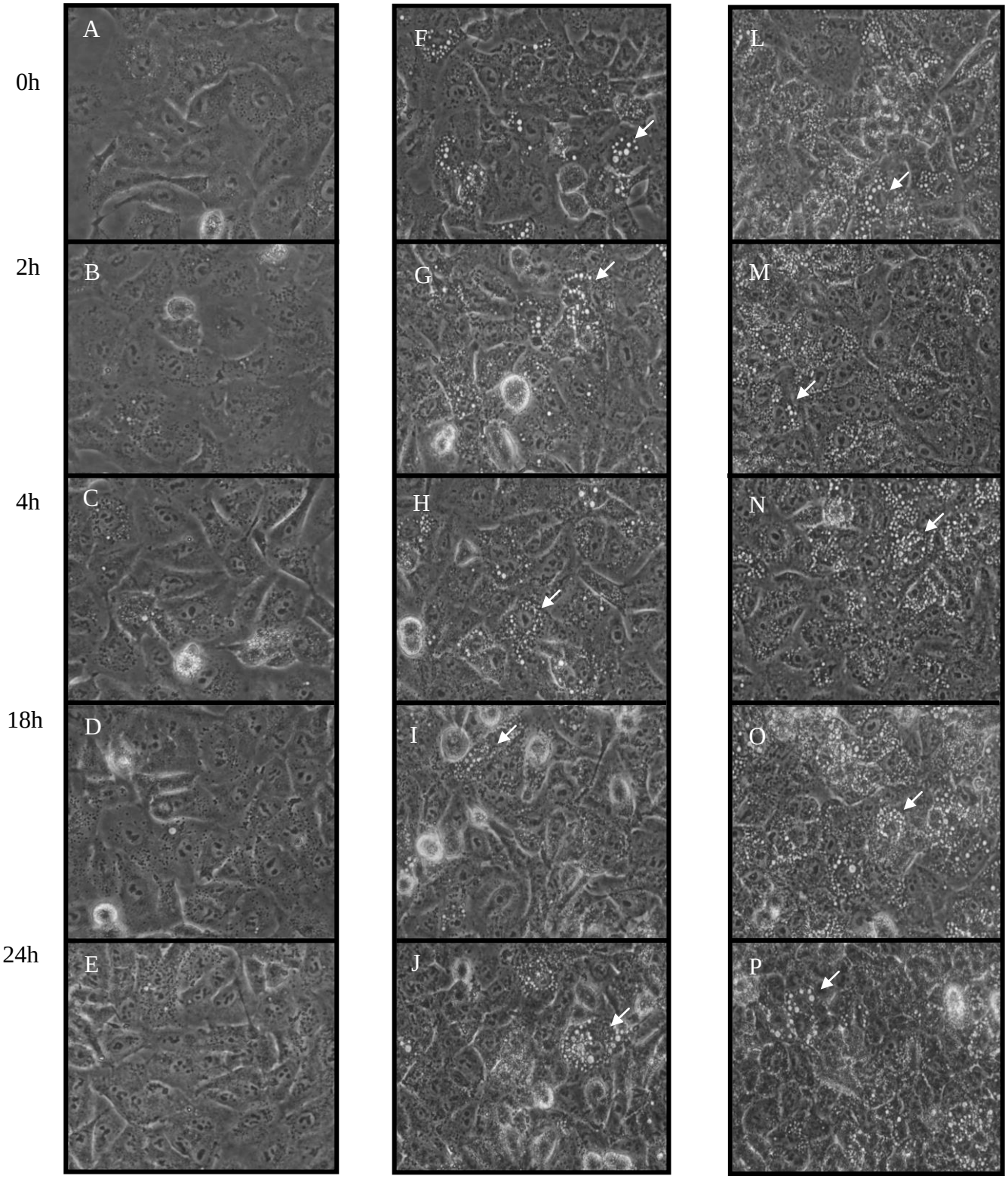
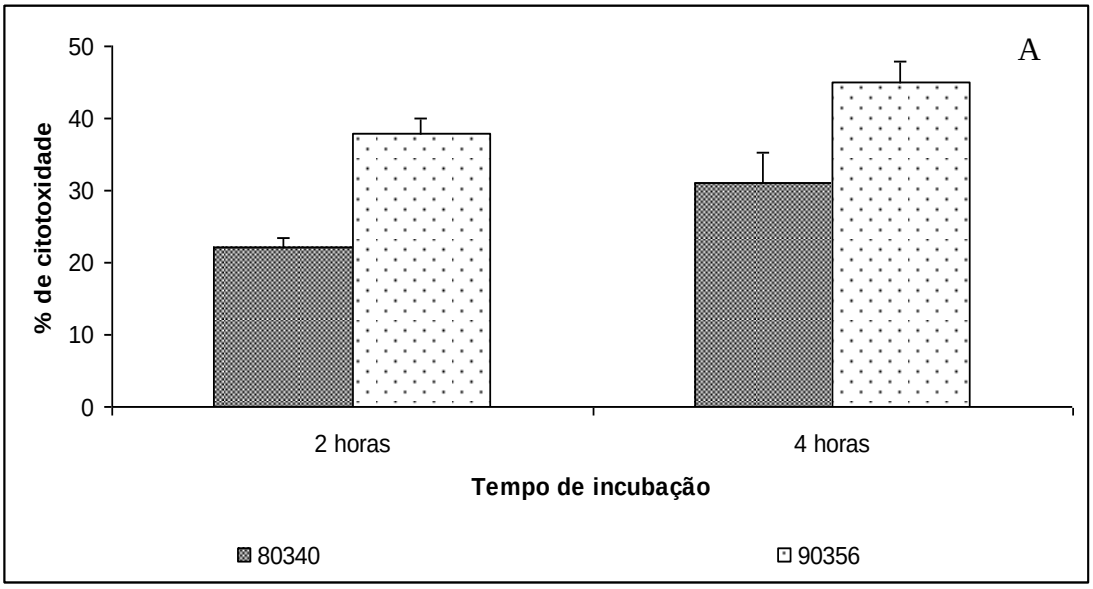


Figura 5. Microscopia óptica da interação ou controle das células epiteliais respiratórias A549 com amostras de EGB do sorotipo III 80340-vagina e 90356-liquor. (A) controle 0h; (B) controle 2h. (C) controle 4h; (D) Controle 18h; (E) Controle 24h; (F) 80340 0h; (G) 80340 2h (H) 80340 4h; (I) 80340 18h; (J) 80340 24h; (L) 90356 0h; (M) 90356 2h; (N) 90356 4h; (O) 90356 18h e (P) 90356 24h. Aumento 600X. As setas indicam padrão de vacuolização.

3.4 **Potencial citotóxico das amostras de EGB**

Os EGB são considerados a principal causa de infecção bacteriana fatal em recém-nascidos. A infecção de inicio precoce é resultada por pneumonia e injúria pulmonar. Nossos resultados demonstraram que os EGB são citotóxico para as células epiteliais (**Figura 6A**). Células infectadas por amostras de EGB apresentaram 22% e 38% de citoxicidade após 2h de interação para os isolados 80340-vagina e 90356-líquor, respectivamente. A citotoxicidade aumentou após 4h de incubação com percentuais de 31% para a amostra de vagina e 45% para amostra de líquor. Quando comparamos esses valores com a citotoxicidade do H_2O_2 – controle positivo -verificamos que o potencial da amostra de paciente após 2h de infecção com a célula epitelial, equivale ao tratamento da célula eucariótica com 12,5mM de H_2O_2 (~ 40%; Figura 6B) e em 4h com a concentração de 25mM de H_2O_2 (~45%; Figura 6B). A amostra de vagina apresentou citotoxicidade próxima de 5mM do tratamento com H_2O_2 (~ 33%; Figura 6B) após 4h de interação com a A549.



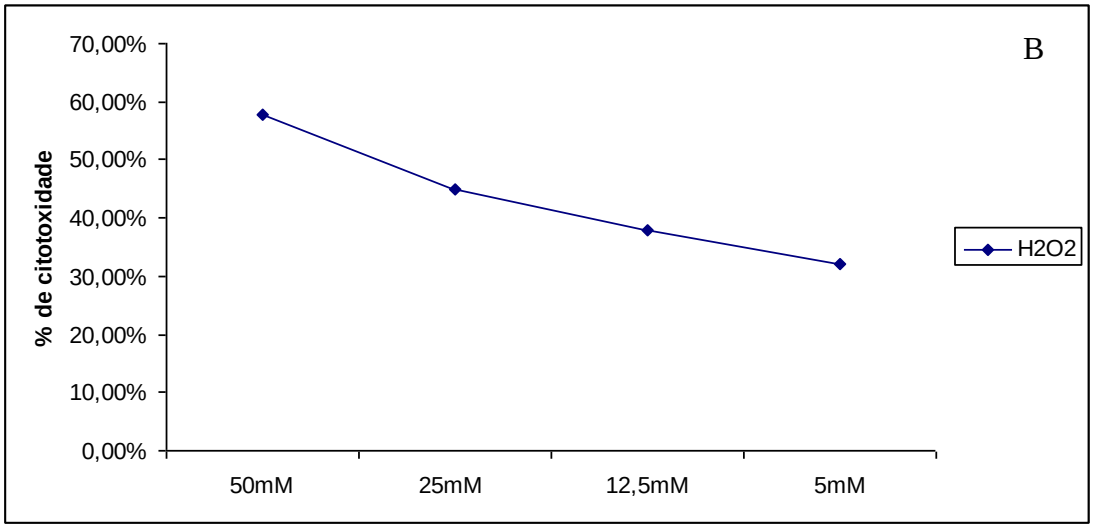


Figura 6. Percentual de citotoxicidade das amostras de EGB sorotipo III com células epiteliais respiratórias A549 (A) e Curva de citotoxicidade do peróxido de hidrogênio (H_2O_2; B).

3.5 **Indução de apoptose por amostras de EGB**

A amostra 90356-liquor foi escolhida para realização dos experimentos de detecção de apoptose por apresentar maior potencial invasivo e citotóxico ao epitélio. A apoptose foi evidenciada pelas células Anexina-V positivas e a necrose por iodeto de propídio positivo. Nossos resultados demonstram que a amostra 90356-liquor é capaz de induzir morte celular por apoptose em 6h e 12h de interação demonstrando uma marcação protuberante para anexina –V nos tempos testados. Após 6h de infecção bacteriana, as células A549 apresentaram 8,61% de morte celular (**Figura 7 A-B**) que foi aumentada para 50,27% (**Figura7 D-E**) após 12h de incubação. A percentagem de células marcadas com iodeto de propídio não foi significativa em relação ao controle, em ambos os tempos de interação. Na F**igura 7-E** as células foram tratadas com H_2O_2 como controle positivo do experimento.

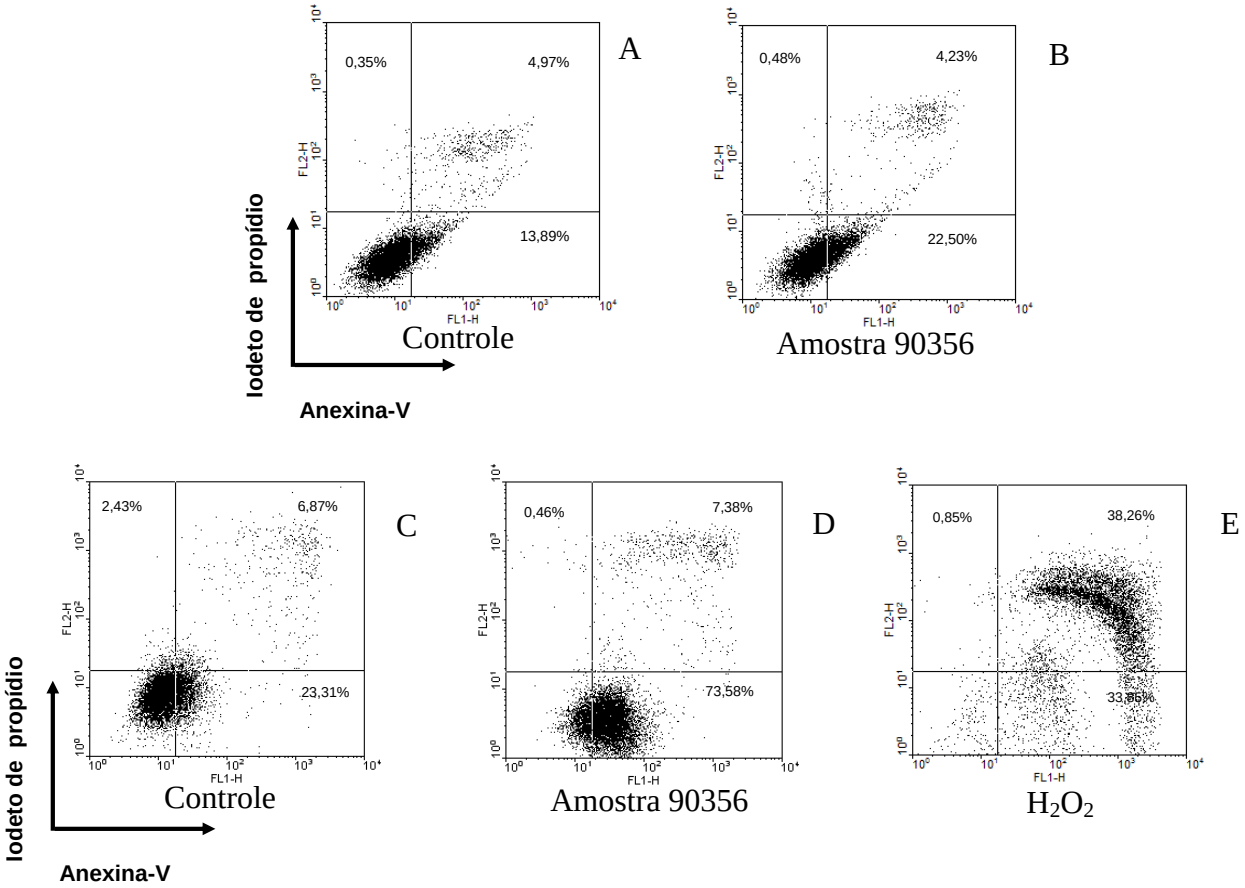


Figura 7: Células A549 infectadas com EGB amostra 90356-liquor por 6h (A e B) e 12h (C-D). Controle 6h (A); Amostra 90356 após 6 h (B); Controle 12h (C); Amostra 90356 após 12h (D) e, Células tratadas com H_2O_2 (E).

4. DISCUSSÃO

A capacidade dos EGB em sobreviver e se multiplicar em vários compartimentos do hospedeiro requer a expressão e regulação coordenada de múltiplos fatores de patogenicidade (Tenenbaum *et al*, 2005). Várias moléculas importantes para virulência dos EGB têm sido analisadas juntamente com os mecanismos celulares e moleculares. Contudo, até o presente momento, a base molecular das interações EGB-células eucarióticas é pouco compreendida, principalmente àquelas relacionadas com injúria tecidual e acesso ao sistema nervoso central.

Neste trabalho demonstramos que as amostras de EGB 90356-líquor/paciente e 80340-vagina/portador possuem capacidade de aderir e invadir o epitélio respiratório. Diferenças observadas na capacidade adesiva entre amostras do mesmo sorotipo podem estar relacionadas com a expressão de adesinas, composição protéica e/ou polissacarídica da superfície dos EGB, espessura da cápsula e modulação de fatores de virulência (Gibson *et al*., 1993; Cornacchione *et al*., 1998). Neste contexto, estudos realizados por Krishnan e colaboradores (2007) demonstraram que o pili GBS52 (cepa selvagem 2603 V/R) funciona como uma adesina dos EGB em células epiteliais respiratórias, uma vez que a aderência bacteriana foi reduzida drasticamente com a cepa NY_3 mutante. Proteínas de superfície como a Rib e a Srr-1, expressas na maioria de isolados invasivos de EGB, também estão envolvidas na aderência às células epiteliais (Stalhammar-Carlemalm *et al*., 1999; Samen *et al*., 2007). Além disso, em nosso laboratório, verificamos pelo método colorimétrico que a amostra 80340-vagina possui maior conteúdo capsular que a amostra de 90356-líquor e quando desialiladas apresentaram uma diminuição da aderência em macrófagos murinos, demonstrando a importância da composição da cápsula polissacarídica dos EGB durante a interação com células eucarióticas (Monteiro *et al.,* 2004; Lione, 2007).

A beta-hemolisina dos EGB tem sido correlacionada com a adesão e invasão em células epiteliais pulmonares. Isso se deve ao fato da toxina estar associada à superfície bacteriana e possuir um domínio de reconhecimento ao epitélio. Células pulmonares em resposta à beta-hemolisina formam poros na membrana, podendo

dessa forma internalizar um maior número de bactérias (Platt, 1995; Doran *et al.,* 2002).

A cinética de invasão bacteriana com células A549 demonstrou que as amostras de portador 80340-vagina e de paciente 90356-líquor foram capazes de invadir as células epiteliais a partir de 2h e 4h, respectivamente (**Figura 2**). A amostra de paciente apresentou maior pico de invasão em 4h de incubação ($2,42x10^3$ UFC/mL) e a amostra de portador após 8h de interação ($1,38x10^3$ UFC/mL). Nossos resultados estão de acordo com dados obtidos no laboratório utilizando outras linhagens celulares, onde a amostra 80340-vagina apresentou menor capacidade adesiva e invasiva que a amostra 90356-líquor em monócitos humanos, células endoteliais e epiteliais 16 HBE 14o- (Peotta *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2003; São José *et al*., 2006). Resultados obtidos por Valentin-Weigand & Chhatwall (1995) também verificaram que amostras de EGB de pacientes (provenientes de infecção invasiva de neonatos e adultos) foram significativamente mais invasivas em células epiteliais respiratórias do que amostras de EGB de portadores (provenientes de vagina de mulheres colonizadas e de neonatos colonizados sem sintomas clínicos). Contudo, torna-se importante a análise dos mecanismos de interação de amostras de portadores com outras linhagens celulares para comprovar o potencial patogênico dessas amostras.

Neste trabalho, verificamos também que a amostra 80340-vagina apresentou aumento na invasão entre 4h e 8h de interação (Figura 2), sugerindo que essa cepa foi capaz de: (a) modular diferentes moléculas durante a interação celular e/ou, (b) romper junções celulares com conseqüente exposição de proteínas basolaterais. A interação de amostras de EGB sorotipo III com moléculas da região basolateral de células endoteliais ECV 304, como cadeias β1 de integrinas, demonstrou a capacidade dos EGB em utilizar vários sistemas receptor-ligante para invasão bacteriana (Lione *et al.,* 2005). Bactérias Gram-positivas como *Listeria monocytogenes* invadem preferencialmente células Caco-2 através de receptores basolaterais expostos após tratamento com quelantes de Ca^{2+} (Gallard *et al.,* 1996). Em outro estudo de interação entre *Shigella Flexneri* e células Caco-2 observou-se que poucas bactérias interagiam com a superfície apical. Em contraste, evidenciou-se aumento da capacidade invasiva através do domínio basolateral da célula hospedeira (Mounier *et al*., 1992). Contudo, novos ensaios tornam-se necessários para comprovar a abertura das junções celulares pelos EGB.

Diferentemente, a amostra 90356-líquor apresentou uma diminuição da invasão entre 4h e 8h nas células epiteliais, podendo sugerir transcitose. Pesquisas demonstraram que amostras de EGB pertencentes aos sorotipos Ia e III foram capazes de realizar transcitose em células epiteliais de córion e cervicais humanas nas primeiras 4h e 2h de interação, respectivamente (Winram *et al.,* 1998; Bolduc *et al.,* 2002).

Ensaios de invasão bacteriana realizados em nosso laboratório também demonstraram que a entrada dos EGB está relacionada com reorganização do citoesqueleto de actina. A invasão da amostra 90356-liquor em células de epitélio respiratório 16 HBE 14o- foi altamente bloqueada com a inibição da polimerização do citoesqueleto. Em contraste, a cepa 80340-vagina foi capaz de invadir a célula hospedeira mesmo após a inibição da polimerização da actina (São José *et al.,* 2006).

Outro estudo de invasão bacteriana com células epiteliais HeLa 229 mostraram que os EGB requerem a sinalização de PI3K/Akt para sua entrada, pois o tratamento com inibidores de PI3K e Akt reduziram a invasão desse patógeno em 75% e 50%, respectivamente. Adicionalmente, a sinalização de PKC não foi requerida para entrada da bactéria em células epiteliais, pois a invasão não foi alterada após tratamento com inibidor de PKC (Burnham *et al.,* 2007). Dados em andamento em nosso laboratório evidenciaram que após a inibição da PKC, as amostras de EGB 80340-vagina e 90356-líquor aumentaram o número de UFC/mL no interior de células epiteliais A549 após 2h de interação, sugerindo possível inibição da produção de espécies reativas de oxigênio pela célula epitelial. Dosagens de óxido nítrico (NO) e lactato desidrogenase (LDH) estão sendo realizadas após infecção das células A549 com amostras de EGB. Dados preliminares sugerem alterações, principalmente na liberação de LDH, um importante marcador de injúria tecidual.

A capacidade do EGB de sobreviver dentro do hospedeiro humano e contornar os mecanismos de defesa sugerem que a espécie tem desenvolvido estratégias eficazes de sobrevivência. Contudo, a maioria dos trabalhos publicados por diferentes autores relata somente a capacidade invasiva do microrganismo (Rubens *et al.*, 1992; Valentin-Weigand & Chhatwal, 1995). A análise do perfil de persistência de amostras de EGB no interior de células epiteliais pode fornecer dados importantes do comportamento deste patógeno no ambiente intracelular.

No presente trabalho, os ensaios de persistência intracelular demonstraram resultados bastante interessantes. Ambas as amostras foram capazes de sobreviver no interior das células A549 por um longo período (24h; **Figura 3**). A permanência do patógeno no interior das células eucarióticas é um importante fator de virulência, conferindo ao microrganismo proteção contra antibióticos e anticorpos, bem como propiciando um ambiente favorável para sua multiplicação (tempo de geração dos EGB é de ~ 20 min), transcitose e disseminação para os demais órgãos e tecidos. Cabe ressaltar que não encontramos replicação intracelular no epitélio respiratório em todos os tempos testados. Nossos dados estão de acordo com a literatura, uma vez que estudos realizados *in vitro* com metodologia similar demonstraram a capacidade dos EGB em sobreviver dentro de macrófagos por mais de 24h (Cornacchione *et al.,* 1998).

A persistência intracelular das amostras de EGB também foi confirmada pelo ensaio com lisotracker, um corante acidotrópico que é usado como um marcador de acidificação e maturação fagossomal (Via *et al.,* 1998), e (**Figuras 4**). Observamos nestes ensaios a presença das duas amostras de EGB em vacúolos acídicos indicando a fusão fagolisossomo. Estudos realizados em nosso laboratório durante a interação EGB-células endoteliais, utilizando laranja de acridina e amarelo de Lúcifer também mostraram a formação de compartimentos acídicos e a fusão com lisossomos para as amostras 90356-líquor/sorotipo III, 88641-vagina/sorotipo V e 90186-sangue/sorotipo V. Todas as amostras estudadas foram encontradas no interior de endossomas endoteliais positivos para Rab-7 e LAMP-1 (Lione, 2007).

No entanto, o fato da bactéria se encontrar em vacúolos acídicos não indica que ela será degradada, pois para que ocorra a morte do microrganismo é necessário o amadurecimento desses compartimentos, que envolve além da acidificação, a aquisição de marcadores endossomais (Vieira *et. al.,* 2001). Desta forma, estudos utilizando marcadores de endossomas precoces (Rab 5, EEA-1 [*Early Endosome Antigen 1*]) e tardios (Rab 7 e LAMP-1) estão em andamento para verificarmos se ocorre aquisição de marcadores endossomais pelos vacúolos epiteliais.

A presença dos EGB em vacúolos acídicos e a persistência por 24h no interior das células epiteliais A549 sugerem que o microrganismo possa ter desenvolvido mecanismos de escape da degradação lisossomal. Bactérias intracelulares como *Mycobacterium tuberculosis* e *Listeria monocytogenes* previnem

a maturação endossomal impedindo a aquisição de enzimas lisossomais com a catepsina D (Alvarez-Dominguez *et al.,* 1997; Roberts *et al.,* 2006). Ensaios realizados *in vitro* com células endoteliais microvasculares do sistema nervoso central (HBMEC) evidenciaram que cepas de EGB sorotipo III foram capazes de invadir e sobreviver em vacúolos intracelulares por mais de 20h (Huang *et al*., 2000), o que corrobora nossos dados, já que ambas as amostras do sorotipo III mantiveram-se viáveis até o período de 24h no interior das células A549.

O monitoramento da interação EGB-A549 por microscopia óptica demonstrou que as amostras 90356-líquor e 80340-vagina promoveram formação de vacúolos nas células A549 (**Figura 5**), podendo ser considerada um indicador precoce de citotoxidade. Estudos com cepas patogênicas de *H. pylori* que secretam uma citotoxina de vacuolização (VacA) demonstraram a formação de grandes vacúolos intracelulares em células epiteliais gástrica tanto *in vitro* como *in vivo*, possivelmente causando um defeito no tráfico vesicular (Marshall & Warren, 1984; Catrenichm & Chestnut, 1992; Papine *et al.,* 2001).

Vários trabalhos têm descrito injúrias em células epiteliais com dano pulmonar, seguida de disseminação pela corrente sangüínea (Nizet *et al.,*1996; Doran *et al.,* 2002). Nossos resultados mostraram que os EGB podem ser citotóxicos para células epiteliais, apresentando 45% de citotoxicidade após 4h de interação. Recentemente, Hensler e colaboradores (2008) utilizando amostras de EGB do sorotipo V mostraram que a bactéria é citotóxica para cardiomiócitos, prejudicando sua função e ocasionando perda de viabilidade dessas células. O efeito citotóxico promovido pelos EGB no epitélio respiratório pode constituir um importante passo para disseminação do patógeno na corrente sanguínea e posterior colonização de múltiplos órgãos.

Resultados similares foram encontrados por Arakaki e colaboradores (2002) onde *Legionella longbeachae* foi citotóxica para macrófagos humanos com toxicidade máxima de 74,3% em 48h de interação. Adicionalmente, utilizando *Pseudomonas aeruginosa,* outros pesquisadores também observaram redução da viabilidade de células endoteliais em até 40%, após 24h de interação, utilizando ensaios de citotoxicidade com MTT (Valente *et al.,* 2000; De Assis *et al.,* 2004).

Pesquisas demonstraram também que amostras de EGB sorotipo III foram citotóxicas para células endoteliais e epiteliais promovendo uma série de mudanças morfológicas tais como vacuolização, perda de conteúdo citoplasmático, retração do

citoplasma, rompimento de membrana, dilatação da mitocôndria, divisão da membrana nuclear e aglutinação da cromatina nuclear indicando injúria celular causada pelo patogéno, não sendo confirmado apoptose nestes trabalhos (Gibson *et al.,* 1993; Nizet *et al.,* 1996; Gibson *et al.,* 1999).

Estudos realizados por Searle e colaboradores (1982) têm indicado duas fases distintas para a apoptose: inicialmente a condensação nuclear seguida da fragmentação citoplasmática que levam à formação de corpos apoptóticos; enquanto a segunda consiste na fagocitose e digestão destes fragmentos pelas células adjacentes. Apesar disto, para que a fagocitose ocorra é necessário que a fosfatidilserina se transloque do lado interno para o lado externo da membrana celular, sinalizando então para as células que deverão ser fagocitadas (Fadok *et al.,* 2001). Desta forma, neste trabalho células epiteliais A549 apoptóticas foram analisadas através da proteína anexina - a qual possui afinidade para fosfatidilserina expostos na superfície da membrana plasmática - e iodeto de propídio para identificar necrose celular através da perda da integridade de membrana É importante ressaltar que apoptose em células epiteliais por EGB ainda não foi descrita na literatura.

Apoptose induzida por EGB tem sido relatada em macrófagos infectados com EGB sorotipo III. Nestes trabalhos, a bactéria foi capaz de promover mudanças morfológicas, como encolhimento celular, condensação da cromatina, fragmentação nuclear, vacuolização citoplasmática e preservação da estrutura das organelas (Fettucciari *et al.,* 2000; Ulett *et al.,* 2003). Outro trabalho demonstrou que amostra de EGB 874391 do sorotipo III foi capaz de promover apoptose em macrófagos murinos com ativação de caspase-3 e caspase-9 sugerindo o envolvimento da via intrínseca mitocondrial e de desencadear a liberação de citocromo c e modificações no potencial de membrana mitocondrial (Askenazi *et al.,* 1998; Adams *et al.,* 1998; Ulett *et al.,* 2005).

Na apoptose induzida por *Staphylococcus aureus* a fragmentação nuclear pelo método de eletroforese em gel de agarose pôde ser observada a partir de 1h de interação com células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC) (Menzies *et al*., 1998). Por outro lado, a fragmentação nuclear induzida pelos *Streptococcus pneumoniae* foi detectada pelo método de eletroforese de campos alternados após 12h de interação com células endoteliais de microvasculatura cerebral (BMEC) (Bermpohl *et al*., 2005). A capacidade dos *S. aureus* de induzir apoptose em HUVEC

e células mamárias humanas (HMEC) também foi detectada por Esen (2001), após 30min de interação, através da marcação com anexina V. Neste mesmo período observaram a liberação de citocromo c pela célula e a ativação do mecanismo de sinalização da apoptose pela via JNK. Esses dados demonstram que a indução da apoptose depende da linhagem celular, do patógeno e da técnica empregada para sua avaliação

Leib e colaboradores (1996) demonstraram que a indução de espécies reativas de oxigênio estimuladas por EGB contribuiu para apoptose e necrose neuronal em modelo de meningite bacteriana realizada em ratos neonatos. A apoptose em monócitos também foi observada através do influxo de cálcio ocasionado pela formação de poros na membrana celular induzida pela □□hemolisina, mecanismo este independente de caspase-1 e -3 (Fettuciari *et al*., 2000). No entanto, foi observada em estudo posterior apoptose em macrófagos □□hemolisina independente (Ulett *et al*., 2003). Mais recentemente, foi demonstrado por Kaplan *et al*. (2008) que a apoptose de fibroblastos e trofoblastos ocorre -- através da estimulação com extrato de EGB e que a □□hemolisina desempenha um papel chave na toxicidade do EGB para estes tipos celulares. Entretanto, a apoptose induzida por EGB no epitélio respiratório e os mecanismos que desencadeiam este processo merecem destaque para estudos posteriores.

Nossos resultados relatam pela primeira vez que a amostra do sorotipo III 90356-liquor foi capaz de levar morte celular por apoptose nas células epiteliais A549 após 6h e 12h de infecção. Nossas observações foram semelhantes aos estudos realizados com amostras de estreptococos do grupo A (EGA) que induziram apoptose em células de epitélio, sendo demonstrado que 20% das células A549 e 13% das células HEp-2 sofreram apoptose após 20h de interação (Tsai *et al.,* 1999).

Fetucciari e colaboradores (2000) descreveram que a apoptose induzida por EGB não necessita da internalização do patógeno pela célula hospedeira, o que indica que a bactéria é capaz de promover apoptose através da aderência à superfície celular. Diferentemente, ensaios feitos com amostras de EGA descrevem que para induzir a apoptose em células A549 a bactéria deve estar dentro da célula hospedeira (Tsai *et al.,* 1999). Ensaios utilizando amostras de EGB mortas, extrato celular ou sobrenadante da cultura bacteriana (meio condicionado) estão em

andamento para verificar a indução da apoptose independente de invasão bacteriana.

Desta forma, nossos resultados indicam que o EGB pode ser citotóxico, persistir dentro de vacúolos ácidos e promover apoptose em células epiteliais respiratórias A549, demonstrando o desenvolvimento de estratégias importantes pelos EGB para limitar a inflamação durante a infecção e a evasão da resposta imune do hospedeiro.

5.**CONCLUSÕES**

- As amostras do sorotipo III (90356-liquor isolada de paciente e 80340-vagina isolada de portador assintomático) demonstraram capacidade de aderir, invadir e persistir no interior do epitélio respiratório.
- As duas amostras apresentaram persistência intracelular sem replicação no epitélio pulmonar, após 24h de interação.
- As amostras bacterianas foram capazes de induzir a formação de vacúolos, sendo esse resultado mais evidente para a amostra 90356-líquor.
- As amostras de EGB foram citotóxicas ao epitélio após 2h e 4h de interação, sendo a amostra de paciente (90356-líquor) mais citotóxica que a de portador (80340-vagina).
- Ambas as amostras de EGB foram capazes de permanecer viáveis em vacúolos acídicos.
- A amostra 90356-líquor foi capaz de induzir apoptose nas células epiteliais A549 após 6h e 12h de infecção.
- Os resultados demonstram que amostras de portadores possuem potencial patogênico não devendo ser subestimadas.

REFERÊNCIAS

- Adams, J. M., and S. Cory. 1998. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. Science 281: 1322_1326.

- Anderson, P. 1997. Kinase cascades regulating entry into apoptosis. Microbiol Mol. Biol. Rev. 61: 33–46.

- Adderson E.E., Takahashi S & Bohnsack J.F. 2000. Bacterial genetics and immunity to group B streptococci. Mol Genet Metab. 71:451-454.

- Adriaanse AH, Lagendijk I, Muytjens HL, Nijhuis JG, Kollée LA. Neonatal early onset group B streptococcal infection. A nine-year retrospective study in a tertiary care hospital. J Perinat Med. 1996;24(5):531-8.

- Alvarez-Dominguez, C., A. M. Barbieri, W. Beron, A. Wandinger-Ness, and P. D. Stahl. 1996. Phagocytosed live. Listeria monocytogenes influences Rab5-regulated in vitro phagosome-endosome fusion. J. Biol. Chem. 271

- Antal JM, Cunningham JV, Goodrum KJ. Opsonin-independent phagocytosis of group B streptococci: role of complement receptor type three. Infect Immun. 1992 Mar;60(3):1114-21.

- Arakaki N, Higa F, Koide M, Tateyama M, Saito A. Induction of apoptosis of human macrophages in vitro by Legionella longbeachae through activation of the caspase pathway.J Med Microbiol. 2002 Feb;51(2):159-68.

- Ashkenazi, A., and V. M. Dixit. 1998. Death receptors: signaling and modulation.Science 281: 1305_1308.

- Baker C.J. & Edwards M.S. Infectious diseases of the fetus and the newborn infant. In Remington JS, Klein JO (eds.). W. B. Saunders Co., Philadelphia 1995; pp. 980-1054.

- Baker CJ, Paoletti LC, Wessels MR, Guttormsen HK, Rench MA, Hickman ME, Kasper DL. Safety and immunogenicity of capsular polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccines for group B streptococcal types Ia and Ib. J Infect Dis. 1999 Jan;179(1):142-50.

- Baker C.J. and Edwards, M.S. Group B streptococcal infections. In Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant. Remington J.S. & Klein J.O. (eds). Philadelphia, PA: W.B. Saunders 2001; pp. 1091–1156.

- Bayles KW, Wesson CA, Liou LE, Fox LK, Bohach GA, Trumble WR Intracellular Staphylococcus aureus escapes the endosome and induces apoptosis in epithelial cells. Infect Immun. 1998 Jan;66(1):336-42.

- Becker S, Soukup J, Yankaskas JR. Respiratory syncytial virus infection of human primary nasal and bronchial epithelial cell cultures and bronchoalveolar macrophages. Am J Respir Cell Mol Biol. 1992 Apr;6(4):369-74

- Bermpohl D, Halle A, Freyer D, Dagand E, Braun JS, Bechmann I, Schröder NW, Weber JR. Bacterial programmed cell death of cerebral endothelial cells involves dual death pathways. J Clin Invest. 2005 Jun;115(6):1607-15. Epub 2005 May 2.

- Benchetrit L.C., Fracalanzza S.E.L., Peregrino H., Camelo A.A. & Sanches L.A. Carriage of Streptococcus agalactiae in women and neonates and distribution of serological types: a study in Brazil. J Clin Microbiol 1982; 15:787-790.

- Beraldo C., Brito A.S.J., Saridakis H.O. & Matsuo T. Prevalência da Colonização Vaginal e Anorretal por Estreptococos do Grupo B em Gestantes do Terceiro Trimestre. Ver Bras Ginecol Obstet 2004; 26 (7): 543-549.
-
- Berger JT, Horger T, Voynow JA, et al: Respiratory carcinoma cell lines express MUC5/5AC mRNA and secrete MUC5/5AC mucins. 5th International Workshop on Carcinoma Associated Mucins, Cambridge, UK. 1998.

- Bernardi, P., L. Scorrano, R. Colonna, V. Petronilli, and F. Di Lisa. 1999. Mitochondria and cell death: mechanistic aspects and methodological issues. Eur. J. Biochem. 264: 687–701.

- Bertini G, Dani C, Cianciulli D, Rubaltelli FF, Nicoletti P. J A trial of preventing early- and late-onset Group B streptococcal sepsis with combined intrapartum chemoprophylaxis and universal neonatal screening Perinat Med. 2006;34(5):420-4.

- Bolduc GR, Baron MJ, Gravekamp C, Lachenauer CS, Madoff LC. The alpha C protein mediates internalization of group B Streptococcus within human cervical epithelial cells. Cell Microbiol. 2002 Nov;4(11):751-8.

- Bossy-Wetzel E, Green DR. Detection of apoptosis by annexin V labeling. Methods Enzymol. 2000;322: 15-8.

- Blondel M, Defoort S, Guerouaou D, Bouchez B, Lesoin F, Viaud C, Arnott G [Dissociated supranuclear paralysis of the upward gaze. Manifestation of frontocallosal tumor invading the internal capsule on both sides] Rev Otoneuroophtalmol. 1984 Jul-Dec;56(4-5):401-8. French. No abstract available.

- Bulgakova TN, Grabovskaya KB, Rýc M, Jelínková J.The adhesin structures involved in the adherence of group B streptococci to human vaginal cells. Folia Microbiol (Praha). 1986; 31(5):394-401.

- Burnham CA, Shokoples SE, Tyrrell GJ. Invasion of HeLa cells by group B streptococcus requires the phosphoinositide-3-kinase signalling pathway and modulates phosphorylation of host-cell Akt and glycogen synthase kinase-3. Microbiology. 2007 Dec;153(Pt 12):4240-52.

- Catrenich, C. E., and Chestnut, M. H. J. Character and origin of vacuoles induced in mammalian cells by the cytotoxin of Helicobacter pylori. Med. Microbiol. (1992) 37, 389-395.

- Cheng Q., Carlson B., Pillai S., Eby E.L., Olmsted S.B. & Cleary P. Antibody against surface-bound C5a peptidase is opsonic and initiates macrophage killing of group B streptococci. Infect Immun 2001; 69:2302-2308.

- Christie R., Atkins N.E. & Munch-Petersen E. A note on a lyticphenomenon shown by group B streptococci. Aust J Exp Biol Med Sci 1944; 22:197–200.

- Cohen, J. J. 1993. Apoptosis. Immunol. Today 14:126.

- Cornacchione P., Scaringi L., Fettucciari K., Rosati E., Sabatini R., Orefici G., von Hunolstein C., Modesti A., Modica A., Minelli F. & Marconi P. Group B streptococci persist inside macrophages. Immunol 1998; 93: 86-95.

- Costa AL, Lamy Filho F, Chein MB, Brito LM, Lamy ZC, Andrade KL. Prevalence of colonization by group B Streptococcus in pregnant women from a public maternity of Northwest region of Brazil. Rev Bras Ginecol Obstet. 2008. 30 (6):274-80. Portuguese.

- De Assis MC, Saliba AM, Vidipó LA, De Salles JB, Plotkowski MC. Pseudomonas aeruginosa-induced production of free radicals by IFNgamma plus TNFalpha-activated human endothelial cells: mechanism of host defense or of bacterial pathogenesis? Immunol Cell Biol. 2004 Aug;82(4):383-92.

- Domingo P, Barquet N, Alvarez M, Coll P, Nava J, Garau J.Group B streptococcal meningitis in adults: report of twelve cases and review. Clin Infect Dis. 1997 Nov;25(5):1180-7. Review.

- Doran K.S., Chang J.C.W., Benoit V.M., Eckmann L. & Nizet V. Group B Streptococcal b-Hemolysin/Cytolysin Promotes Invasion of Human Lung Epithelial Cells and the Release of Interleukin-8. J Infect Dis 2002; 185:196–203.

- Doran KS, Liu GY, Nizet V. Group B streptococcal beta-hemolysin/cytolysin activates neutrophil signaling pathways in brain endothelium and contributes to development of meningitis. J Clin Invest 2003; 112:736–44.

- Doran KS, Nizet V. Molecular pathogenesis of neonatal group B streptococcal infection: no longer in its infancy. Mol Microbiol 2004; 54: 23–31.

- Drevets DA, Campbell PA. Macrophage phagocytosis: use of fluorescence microscopy to distinguish between extracellular and intracellular bacteria. J Immunol Methods. 1991 Aug 28; 142(1):31-8.

- Edwards M.S., Wessels M.R., Baker C.J. Capsular polysaccharide regulates neutrophil complement receptor interactions with type III group B streptococci. Infect Immun 1993; 61:2566-2871.

- Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol Pathol. 2007;35(4):495-516.

- Esen M, Schreiner B, Jendrossek V, Lang F, Fassbender K, Grassmé H, Gulbins E Mechanisms of Staphylococcus aureus induced apoptosis of human endothelial cells. Apoptosis. 2001 Dec;6(6):431-9.

- Fadok VA, Xue D, Henson P. If phosphatidylserine is the death knell, a new phosphatidylserine-specific receptor is the bellringer. Cell Death Differ. 2001 Jun;8(6):582-7. Review.

- Falkow S, Isberg RR, Portnoy DA The interaction of bacteria with mammalian cells. Annu Rev Cell Biol. 1992;8:333-63.

- Farley M.M. Group B streptococcal disease in nonpregnant adults. Clin Infect Dis 2001; 33:556-61.

- Fernandez HN, Hugli TE. Primary structural analysis of the polypeptide portion of human C5a anaphylatoxin. Polypeptide sequence determination and assignment of the oligosaccharide attachment site in C5a. J Biol Chem. 1978 Oct 10;253(19):6955-64.

- Fettucciari K, Rosati E, Scaringi L, Cornacchione P, Migliorati G, Sabatini R, et al. Group B streptococcus induces apoptosis in macrophages. J Immunol 2000;165:3923–33.

- Finlay BB, Falkow S. Common themes in microbial pathogenicity. Microbiol Rev. 1989 Jun;53(2):210-30.

- Foster KA, Oster CG, Mayer MM, Avery ML, Audus KL. Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism. Exp Cell Res. 1998 Sep 15;243(2):359-66

- Gallard J.L., Finlay B.B. 1996. Efect of cell polarization and differentiation on entry of Listeria monocytogenes into the enterocyte-like Caco-2 cell line. Infect Immun. 64:1299-1308.

- Gase K., Ozegowski J. & Malke H. The Streptococcus agalactiae hylB gene enconding hyaluronate lyase: completion of the sequence and expression analysis, Biochim Biophys Acta 1998; 1398:86-98.

- Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, et al: In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. J Natl Cancer Inst 51:1417-1423, 1973.

- Gibbs RS, Schrag S, Schuchat A Perinatal infections due to group B streptococci.. Obstet Gynecol. 2004; Nov; 104(5 Pt 1):1062-76. Review.

- Gibson RL, Lee MK, Soderland C, Chi EY, Rubens CE. 1993. Group B streptococci invade endothelial cells: type III capsular polysaccharide attenuates invasion. Infect Immun. 61:478-485.

- Gibson RL, Nizet V, Rubens CE. Group B streptococcal beta-hemolysin promotes injury of lung microvascular endothelial cells. Pediatr Res 1999;45: 626–34.

- Gotoff SP, Boyer KM. Cellular and humoral aspects of host defense mechanisms against GBS. Antibiot Chemother. 1985;35:142-56.

- Grimwood K, Stone PR, Gosling IA, Green R, Darlow BA, Lennon DR. Late antenatal carriage of group B Streptococcus by New Zealand women. Aust N Z J Obstet Gynaecol. 2002; 42 (2) :182-6.

- Gruenert DC, Finkbeiner WE, Widdicombe JH. 1995. Culture and transformation of human airway epithelial cells. Am Physiol Soc. 268 (Lung Cell Mol Physiol 12):L347-360.

- Hager WD, Schuchat A, Gibbs R, Sweet R, Mead P, Larsen JW. Prevention of perinatal group B streptococcal infection: current controversies. Obstet Gynecol. 2000 Jul; 96 (1):141-5.

- Hakansson S, Källén K.Impact and risk factors for early-onset group B streptococcal morbidity: analysis of a national, population-based cohort in Sweden 1997-2001. BJOG. 2006 Dec;113(12):1452-8

- Harrison LH, Elliott JA, Dwyer DM, Libonati JP, Ferrieri P, Billmann L, Schuchat A. Serotype distribution of invasive group B streptococcal isolates in Maryland: implications for vaccine formulation. Maryland Emerging Infections Program. J Infect Dis. 1998 Apr; 177(4):998-1002.

- Hellerqvist CG, Rojas J, Green RS, Sell S, Sundell H, Stahlman MT. Studies on group B beta-hemolytic Streptococcus. I. Isolation and partial characterization of an extracellular toxin.Pediatr Res. 1981 Jun;15(6):892-8.

- Hellerqvist CG, Sundell H, Gettins P. Molecular basis for group B beta-hemolytic streptococcal disease.Proc Natl Acad Sci U S A. 1987 Jan;84(1):51-5.

- Hensler ME, Miyamoto S, Nizet V. Group B streptococcal beta-hemolysin/cytolysin directly impairs cardiomyocyte viability and function. PLoS ONE. 2008 Jun 18; 3(6):e2446.

- Herbert M.A., Catriona J.E., Beveridge & Saundersb N.J. Bacterial virulence factors in neonatal sepsis: group B streptococcus. Curr Opin Infect Dis 2004; 17:225–229.

- Hickman M., Rench M., Ferrierie P. & Baker C. Changing epidemiology of group B streptococcal colonization. Pediatr 1999; 104:203-209.

- Hill HR, Bohnsack JF, Morris EZ, Augustine NH, Parker CJ, Cleary PP, Wu JT. Group B streptococci inhibit the chemotactic activity of the fifth component of complement. J Immunol. 1988;141(10):3551-6.

- Huang S.H., Stins F.M. & Kim S.K. Bacterial penetration across the blood-brain barrier during the development of neonatal meningitis. Microbes Infect 2000; 2: 1237-1244.

- Jackson RJ, Dao ML, Lim DV.Cell-associated collagenolytic activity by group B streptococci. Infect Immun. 1994 Dec; 62(12):5647-51.

- Jerlström P., Talay S., Valentin-Weigand P., Timmis K.,Chhatwal G., Identification of an immunoglobulin A binding motif located in the β-antigen of the c-protein complex of groupBstreptococci, Infect. Immun. 64 (1996) 2787–2793.

- Jurgens D, Sterzik B, Fehenbach FJ.. Unspecific binding of group B streptococcal cytolysin (CAMP-factor) to immunoglobulins and its possible role in pathogenicity. J Exp Med. 1987;165:720-732.

- Källman J, Schollin J, Håkansson S, Andersson A, Kihlström E. Adherence of group B streptococci to human endothelial cells in vitro. APMIS. 1993 May;101(5):403-8.

- Källman J, Kihlström E. Penetration of group B streptococci through polarized Madin-Darby canine kidney cells. Pediatr Res. 1997 Dec;42(6):799-804.

- Kaplan A, Chung K, Kocak H, Bertolotto C, Uh A, Hobel CJ, Simmons CF, Doran K, Liu GY, Equils O. Group B streptococcus induces trophoblast death. 2008 Sep; 45(3):231-5. Epub 2008 Jul 2.

- Katzenstein AL, Davis C, Braude A.Pulmonary changes in neonatal sepsis to group B beta-hemolytic Streptococcus: relation of hyaline membrane disease. J Infect Dis. 1976 Apr;133(4):430-5.

- Kielian MC, Cohn ZA.Phagosome-lysosome fusion. Characterization of intracellular membrane fusion in mouse macrophages. J Cell Biol. 1980 Jun;85(3):754-65.

- Kong F, Lambertsen LM, Slotved HC, Ko D, Wang H, Gilbert GL. Use of phenotypic and molecular serotype identification methods to characterize previously nonserotypeable group B streptococci. J Clin Microbiol. 2008 Aug;46(8):2745-50. Epub 2008 Jun 18.

- Kogan G, Uhrin D, Brisson JR, Paoletti LC, Blodgett AE, Kasper DL, Jennings HJ. 1996. Structural and immunochemical characterization of the type VIII group B streptococcus polysaccharide. J Biol Chem. 271: 8786-8790.

- Krishnan V, Gaspar AH, Ye N, Mandlik A, Ton-That H, Narayana SV. An IgG-like domain in the minor pilin GBS52 of Streptococcus agalactiae mediates lung epithelial cell adhesion. Structure. 2007 Aug;15(8):893-903.

- La Penta D, Rubens C, Chi E, Cleary PP. Group A streptococci efficiently invade human respiratory epithelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Dec 6;91(25):12115-9.

- Lachenauer CS, Kasper DL, Shimada J, Ichiman Y, Ohtsuka H, Kaku M, Paoletti LC, Ferrieri P, Madoff LC. Serotypes VI and VIII predominate among group B streptococci isolated from pregnant Japanese women. J Infect Dis. 1999 Apr;179(4):1030-3.

- Lancefield, R.C. A serological differentiation of specific types of bovine hemolytic streptococci (group B). J Exp Med 1934; 59:441-458.

- Lang S. & Palmer M. Characterization of Streptococcus agalactiae CAMP Factor as a Pore-forming Toxin. J Biol Chem 2003; 278(40):38167–38173.

- Law MR, Palomaki G, Alfirevic Z, Gilbert R, Heath P, McCartney C, Reid T, Schrag S. The prevention of neonatal group B streptococcal disease: a report by a working group of the Medical Screening Society. J Med Screen. 2005; 12 (2):60-8.

- Lehnardt S, Wennekamp J, Freyer D, Liedtke C, Krueger C, Nitsch R, Bechmann I, Weber JR, Henneke P. TLR2 and caspase-8 are essential for group B Streptococcus-induced apoptosis in microglia. J Immunol. 2007 Nov 1;179(9):6134-43.

- Leib SL, Kim YS, Chow LL, Sheldon RA, Täuber MG Reactive oxygen intermediates contribute to necrotic and apoptotic neuronal injury in an infant rat model of bacterial meningitis due to group B streptococci. J Clin Invest. 1996 Dec 1;98(11):2632-9.

- Li S., Kelly S.J., Lamani E., Ferraroni M. & Jedrzejas M.J. EMBO J 2000; 19:1228-1240.

- Lieber,M., Smith,B., Szakal,A., Nelson-Rees,W. and Todaro,G. (1976) A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. Int. J. Cancer, **17**, 62–71

- Lin B, Averett WF, Novak J, Chatham WW, Hollingshead SK, Coligan JE, Egan ML, Pritchard DG. Characterization of PepB, a group B streptococcal oligopeptidase. Infect Immun. 1996 Aug;64(8):3401-6.

- Lione V.O., Santos G.S., Hirata R. Jr., Mattos-Guaraldi A.L., Nagao P.E. Involvement of intercellular adhesion molecule-1 and beta1 integrin in the internalization process to human endothelial cells of group B Streptococcus clinical isolates. Int J Mol Med 2005; 15(1):153-7.

- Lione V. O. Análise de Fatores de virulência, Íons divalentes e Temperatura durante a interação de Estreptococos do Grupo B com células endoteliais humanas. [Tese de Doutorado]. Rio de Janeiro, RJ: Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2007; 118pp.

- Liu GY, Nizet V. Extracellular virulence factors of group B Streptococci. Front Biosci. 2004 May 1; 9: 1794-802. Review

- Marques M.B., Kasper D.L., Pangburn M.K. & Wessels. Prevention of C3 deposition by capsular polysaccharide is a virulence mechanism of type III group B streptococci. Infect Immun 1992; 14:3986-3993.

- Marshall, B. J., and Warren, J. R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration Lancet 1 (1984), 1311-1315.

- Matorras R, Garcia-Perea A, Usandizaga JA, Omeñaca F. Natural transmission of group B Streptococcus during delivery. Int J Gynaecol Obstet. 1989 Oct;30(2):99-103.

- Menzies BE, Kourteva I. Internalization of Staphylococcus aureus by endothelial cells induces apoptosis. Infect Immun. 1998 Dec;66(12):5994-8

- Miura E, Martin MC. Group B streptococcal neonatal infections 26. in Rio Grande do Sul, Brazil. Rev Inst Med Trop São Paulo. 2001;43(5):243-6.

- Mocelin C.O, Carvalho D.A.A.F. & Brites C. Isolamento de Streptococcus agalactiae de gestantes na região Londrina-PR. Rev Bras Ginec Obstet 1995; 17:915-918.

- Monteiro S.T.C.G., Hirata R. Jr., Andrade A.F., Mattos-Guaraldi A.L. & Nagao P.E. Surface carbohydrates as recognition determinants in non-opsonic interactions and intracellular viability of group B Streptococcus strains in murine macrophages. Int J Mol Med 2004; 13:175-180.

- Moulder JW. Comparative biology of intracellular parasitism. Microbiol Rev. 1985 Sep;49(3):298-337.

- Mounier J., Vasselon T., Hellio R., Lesourd M. & Sansonetti P.J. Shigella flexneri Enters Human Colonic Caco-2 Epithelial Cells through the Basolateral Pole. Infect Immun 1992; 60(1):237-248.

- Nagao PE, Silva-Filho FC, Benchetrit LC, Barrucand L. 1995. Cell surface hydrophobicity and the net eletric surface charge of group B streptococci: the role played in micro-organism-host cell interaction. Micróbios. 65: 5074-5081.

- Nizet V., Gibson R., Chi E., Framson P., Hulse M. & Rubens C. Group B streptococcal beta-hemolysin expression is associated with injury of lung epithelial cells. Infect Immun 1996; 64:3818-3826.

- Nizet, V; Kim, KS; Stins, M; Jonas, M; Chi, EY, et al. Invasion of brain microvascular endothelial cells by group B streptococci. Infect Immun. 1997;65:5074–5081.

- Nomura ML, Passini Júnior R, Oliveira UM. Group B streptococcus 21. colonization in preterm labor and preterm premature rupture of membranes. Int J Gynaecol Obstet. 2005; 91 (1): 69-70.

- Paoletti L.C., Ross R.A. & Johnson K.D. Cell growth rate regulates expression of group B streptococcus type III capsular polysaccharide. Infect Immun 1996; 64:1220-1226.

- Papini, E., Zoratti, M., and Cover, T. L. In search of the Helicobacter pylori VacA mechanism of action. Toxicon (2001)39, 1757-1767

- Platt MW. In vivo hemolytic activity of group B streptococcus is dependent on erythrocyte-bacteria contact and independent of a carrier molecule. Curr Microbiol. 1995 Jul;31(1):5-9.

- Peotta VA, Ribeiro FL, Arnholdt ACV, Nagao PE. 2001. Human monocytes and monocyte-derived macrophages phagocytosis of serotype III group B streptococci strains. Curr Microbiol. 43: 64-68.

- Pettersson K. Perinatal infection with Group B streptococci. Fetal & Neonatal Medicine 2007; 12:193-197.

- Plotkowski MC, Bentzmann S, Pereira SHM, Zahm JM, Bajolet-Laudinat O, Roger P, Puchelle E. Pseudomonas aeruginosa internalization by human epithelial respiratory cells depends on cell differentiation, polarity, and junctional complex integrity. Am J Resp Cell Mol Biol. 1999; 20: 880-890.

- Pogere A, Zoccoli CM, Tobouti NR, Freitas PF, d´Acampora J, Zunino JN. Prevalência da colonização pelo estreptococo do grupo B em gestantes

atendidas no ambulatório de pré-natal. Rev Bras Ginecol Obstet. 2005;27(4):174-80.

- Polito, A. J., Proud, D., J. Allergy Clin. Immunol. 1998, 102,714–718.
- Pritzlaff CA, Chang JC, Kuo SP, Tamura GS, Rubens CE, Nizet V. Genetic basis forthe beta-haemolytic/cytolytic activity of group B streptococcus. Mol Microbiol2001;39:236–47
- Rabinovitch, M. R**.** 1995. Professional and non-professional phagocytes: an introduction. Trends Cell Biol. 5:85-87
- Radetsky M. Pediatric infectious disease emergencies. Curr Opin Pediatr. 1994 Jun; 6 (3):310-6. Review.
- Reed, J. C. 1997. Double identity for proteins of the Bcl-2 family. Nature 387: 773–776.
- Reddel RR, Hsu IC, Mass MJ, Hukku B, Gerwin BI, Salghetti SE, Somers AN, Galati AJ, Gunning WT III, Harris CC, et al. A human bronchial epithelial cell strain with unusual in vitro growth potential which undergoes neoplastic transformation after SV40 T antigen gene transfection. Int J Cancer. 1991 Jul 9;48(5):764-73.
- Ring A., Johann S.B., Nizet V., Wolfgang S. & Jerry L.S. Group B streptococcal β hemolysin induces nitric oxide production in murine macrophages. J Infect Dis 2000, 182:150-157.
- Roberts EA, Chua J, Kyei GB, Deretic V. Higher order Rab programming in phagolysosome biogenesis. J Cell Biol. 2006 Sep 25; 174(7):923-9. Epub 2006 Sep 18.
- Rubens CE, Smith S, Hulse M, Chi EY, van Belle G: Respiratory epithelial cell invasion by group B streptococci. Infect Immun 1992, 60:5157-5163.
- Sa de Sao Jose A., Miyazaki N.H., Hirata R.Jr, Mattos-Guaraldi A.L. & Nagao P.E. Intracellular viability in human non-polarized respiratory epithelial 16 HBE 14o- cells by group B Streptococcus serotype III clinical isolates presenting 162-kb and 183-kb virulence markers. Int J Mol Med 2006; 17:533-538.
- Samen U, Eikmanns BJ, Reinscheid DJ & Borges F. The Surface Protein Srr-1 of Streptococcus agalactiae Binds Human Keratin 4 and Promotes Adherence to Epithelial HEp-2 Cells. Infection and immunity, 2007, 5405–5414.
- Sansonetti, P. 2001. Phagocytosis of bacterial pathogens: implications in the host response. Semin Immunol 13:381-90.

- Santos G.S., Miyazaki N.H., Mattos-Guaraldi A.L. & Nagao P.E. The effects of interferon-gamma and transforming growth factor-bet on adherence and survival of group B Streptococcus type III strains in ECV304 cells. Int J Mol Med 2003; 11:401-406.

- Santos G.S., Lione V.O., Costa E., Silva Filho F., Nagao P.E. 2005. Signal transduction in human endothelial cells induced by their interaction with group B Streptococci. Int J Mol Med. 15:859-863.

- Schuchat A. 1999. Group B streptococcus. Lancet. 353: 51-56.

- Searle J, Kerr JF, Bishop CJ. Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. Pathol Annu. 1982;17 Pt 2:229-59.

- Shet A, Ferrieri P. Neonatal & maternal group B streptococcal infections: a comprehensive review. Indian J Med Res. 2004 Sep;120(3):141-50. Review.

- Sinha B, François PP, Nüsse O, Foti M, Hartford OM, Vaudaux P, Foster TJ, Lew DP, Herrmann M, Krause KH. Fibronectin-binding protein acts as Staphylococcus aureus invasin via fibronectin bridging to integrin alpha5beta1. Cell Microbiol. 1999 Sep;1(2):101-17.

- Spellerberg B, Rozdzinski E, Martin S, Weber-Heynemann J, Schnitzler N, Luttiken R, Podlbielski A. 1999. Lmb, a protein with similarities to the Lral adhesion family, mediates attachment of Streptococcus agalactiae to human laminin. Infect Immun. 67: 871-878.

- Spellerberg B. Pathogenesis of neonatal Streptococcus agalactiae infections. Micro Infect 2000; 2:1733-1742.

- Soares GC, da Silva BA, Dos Santos MH, da Costa AF, Dos Santos AL, Morandi V, Nagao PE. Metallopeptidases produced by group B Streptococcus: influence of proteolytic inhibitors on growth and on interaction with human cell lineages. Int J Mol Med. 2008 Jul;22(1):119-25.

- Stalhammar-Carlemalm, M., Areschoug, T., Larsson, C.,and Lindahl, G. (1999) The R28 protein of Streptococcus pyogenes is related to several group B streptococcal surface proteins, confers protective immunity and promotes binding to human epithelial cells. Mol Microbiol **33:** 208–219.

- Standiford TJ, Arenberg DA, Danforth JM, Kunkel SL, VanOtteren GM, Strieter RM Lipoteichoic acid induces secretion of interleukin-8 from human blood monocytes: a cellular and molecular analysis. Infect Immun. 1994 Jan;62(1):119-25.

- Strunk RC, Eidlen DM, Mason RJ. Pulmonary alveolar type II epithelial cells synthesize and secrete proteins of the classical and alternative complement pathways. J Clin Invest. 1988 May; 81(5):1419-26.

- Talbot UM, Paton AW, Paton JC. Uptake of Streptococcus pneumoniae by respiratory epithelial cells. Infect Immun. 1996 Sep;64(9):3772-7.

- Teixeira CF, Azevedo NL, Carvalho TMU, Fuentes J, Nagao PE. 2001. Cytochemical study of Streptococcus agalactiae and macrophage interaction. Microsc Res Tech. 54: 254-259.

- Tamura, G. S., and C. E. Rubens. 1994. Pathogenesis of group B streptococcal infections. Curr. Opin. Infect. Dis. **7:**317–322.

- Tamura G. S., Kuypers J. M., Smith S., Raff H., Rubens C. E. Adherence of group B streptococci jto cultured epithelial cells: roles of environmental factores and bacterial surface components. Infect. Immun. 1994. 62:2450-2458.

- Tamura GS, Rubens CE. 1995. Group B streptococci adhere to a variant of fibronectina attached to a solid phase. Mol Microbiol. 15: 581-589.

- Tamura GS, Nittayajarn A. 2000. Group B streptococci and other gram-positive cocci bind to cytokeratin 8. Infect Immun. 68:2129-2134.

- Tenenbaum T, Bloier C, Adam R, Reinscheid DJ, Schroten H. Adherence to and invasion of human brain microvascular endothelial cells are promoted by fibrinogen-binding protein FbsA of Streptococcus agalactiae. Infect Immun. 2005 Jul; 73(7):4404-9.

- Teti G, Tomasello F, Chiofalo MS, Orefici G, Mastroeni P. Adherence of group B streptococci to adult and neonatal epithelial cells mediated by lipoteichoic acid. Infect Immun. 1987 Dec;55(12):3057-64.

- Toyooka K, Takai S, Kirikae T. Rhodococcus equi can survive a phagolysosomal environment in macrophages by suppressing acidification of the phagolysosome. J Med Microbiol 54 (2005), 1007-1015

- Travis J, Potempa J, Maeda H. Are bacterial proteinases pathogenic factors? Trends Microbiol. 1995 Oct;3(10):405-7. Review.

- Tsai PJ, Lin YS, Kuo CF, Lei HY, Wu JJ. Group A Streptococcus induces apoptosis in human epithelial cells. Infect Immun. 1999 Sep;67(9):4334-9.

- Tosi MF, Hamedani A A rapid, specific assay for superoxide release from phagocytes in small volumes of whole blood. Am J Clin Pathol. 1992 Apr;97(4):566-73.

- Ulett GC, Bohnsack JF, Armstrong J, Adderson EE. Beta-hemolysin-independent induction of apoptosis of macrophages infected with serotype III group B streptococcus. J Infect Dis. 2003 Oct 1;188(7):1049-53. Epub 2003 Sep 15.

- Ulett GC, Maclean KH, Nekkalapu S, Cleveland JL, Adderson EE. Mechanisms of group B streptococcal-induced apoptosis of murine macrophages. J Immunol. 2005 Aug 15; 175(4):2555-62.

- Usui Y, Yoshida K, San Clemente CL. Characterization of partially purified group B streptococcal clumping factor. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A]. 1982 Jul;252(3):299-309.

- Valente E, Assis MC, Alvim IM, Pereira GM, Plotkowski MC. Pseudomonas aeruginosa induces apoptosis in human endothelial cells. Microb Pathog. 2000 Dec; 29(6):345-56.

- Valentin-Weigand, P., Benkel, P., Rhode, M. & Chhatwal, G. S. (1996). Entry and intracellular survival of group B streptococci in J774 macrophages. Infect Immun 64, 2467-2473.

- Valentin-Weigand P. & Chhhatwal G.S. Correlation of epithelial cell invasiveness of group B streptococci with clinical source of isolation. Microb Pathog 1995; 19: 83-91.

- Valentin-Weigand P, Jungitz H, Zock A, Rohde M, Chhatwal S. 1997. Characterization of group B streptococcal invasion in Hep-2 epithelial cells. FEMS Microbiol Lett. 147: 69-74.

- Via LE, Fratti RA, McFalone M, Pagan-Ramos E, Deretic D, Deretic V.Effects of cytokines on mycobacterial phagosome maturation. J Cell Sci. 1998 Apr;111 (Pt 7):897-905.

- Vieira, O. V., R. J. Botelho, L. Rameh, S. M. Brachmann, T. Matsuo, H. W. Davidson, A. Schreiber, J. M. Backer, L. C. Cantley, and S. Grinstein**.** 2001. Distinct roles of class I and class III phosphatidylinositol 3-kinases in phagosome formation and maturation. J. Cell Biol. **155:**19-25.

- Vollman J.H., Smith W.L., Ballard E.T. & Light I.J. Early onset group B streptococcal disease: clinical, roentegenonographic, and pathologic features. J Pediatr 1976; 89:199-203.

- Weisner AM, Johnson AP, Lamagni TL, Arnold E, Warner M, Heath PT, Efstratiou A. Characterization of group B streptococci recovered from infants with invasive disease in England and Wales. Clin Infect Dis. 2004 May 1;38(9):1203-8. Epub 2004 Apr 14.

- Wibawan W. T., Lämmler C., Pasaribu F. H., 1992. Role of hydrophobic surface protins in mediating adherence of group B streptococci to epithelial cells. J. Gen. Microbiol. 138:1237-1242.

- Winram SB, Jonas M, Chi E, Rubens CE. Characterization of group B streptococcal invasion of human chorion and amnion epithelial cells In vitro. Infect Immun. 1998 Oct; 66 (10):4932-41.

- Wyllie A. H., J. F. R. Kerr, and A. R. Currie. 1980. Cell death: the significance of apoptosis. Int. Rev. Cytol. 68:251.

- Yakes FM, Wamil BD, Sun F, Yan HP, Carter CE, Hellerqvist CG CM101 treatment overrides tumor-induced immunoprivilege leading to apoptosis. Cancer Res. 2000 Oct 15; 60 (20):5740-6.

- Yamaya M, Finkbeiner WE, Widdicombe JH. Altered ion transport by tracheal glands in cystic fibrosis. Am J Physiol. 1991 Dec; 261(6 Pt 1):L491-4.

- Young LR, Wang Y, Voynow J: Neutrophil elastase up-regulates MUC5AC gene expression, 4th International Workshop on Carcinoma-Associated Mucins, Cambridge, UK., 1996.

- Zaleznik D.F., Rench M.A., Hiller S., Krohn M.A., Platt R., Lee M.T, Flores A.E., Ferrierie P. & Baker C.J. Invasive disease due to group B streptococcus in pregnant women and neonatos from diverse population groups. Clin Infect Dis 2000; 30:276-281.

- Zenni, M. K., P. C. Giardina, H. A. Harvey, J. Shao, M. R. Ketterer, D. M. Lubaroff, R. D. Williams, and M. A. Apicella. 2000. Macropinocytosis as a mechanism of entry into primary human urethral epithelial cells by Neisseria gonorrhoeae. Infect. Immun. 68:1696-1699.

- Zhang, Y. Luxon, B. A., Casola, A., Garofalo, R. P. et al., J.Virol. 2001, 75, 9044–9058.