



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

Jéssica da Conceição Mendonça


Estudo das infecções por *Streptococcus agalactiae* em modelo murino de diabetes induzida

Rio de Janeiro

2018

Jéssica da Conceição Mendonça

Estudo das infecções por *Streptococcus agalactiae* em modelo murino de diabetes induzida



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

Orientadora: Prof.^a Dra. Prescilla Emy Nagao Ferreira

Rio de Janeiro

2018

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

M539 Mendonça, Jéssica da Conceição.
Estudo das infecções por *Streptococo agalactiae* em modelo murino de diabetes induzida / Jéssica da Conceição Mendonça. – 2018.
67 f.

Orientadora: Prescilla Emy Nagao Ferreira.

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

1. Estreptococos – Teses. 2. *Streptococcus agalactiae*. 3. Diabetes - Teses. 4. Virulência (Microbiologia) - Teses. I. Ferreira, Prescilla Emy Nagao. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 576.851.214

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB7/6382

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

Assinatura

Data

Jéssica da Conceição Mendonça

Estudo das infecções por *Streptococcus agalactiae* em modelo murino de diabetes induzida

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

Aprovada em 27 de fevereiro de 2018

Orientadora: Prof^a Prescilla Emy Nagao Ferreira

Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes – UERJ

Banca Examinadora:

Prof^a. Dra. Verônica Viana Vieira

Fundação Oswaldo Cruz

Prof.^a Dra. Márcia Mattos Gonçalves Pimentel

Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes – UERJ

Prof. Dr. Raphael Hirata Júnior

Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes - UERJ

Rio de Janeiro

2018

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me abençoar e dar forças a cada dia, por guiar os meus passos e por ter me dado a capacidade de estar concluindo mais uma etapa importante na minha vida;

Aos meus pais que são o meu grande suporte, e que dedicam suas vidas para que eu possa realizar os meus sonhos;

A minha orientadora, Dra. Prescilla Emy Nagao Ferreira, por acreditar na minha capacidade e me acolher em seu grupo de pesquisa, sempre me orientando com paciência e carinho e compartilhando seu conhecimento comigo;

Aos membros da banca, Dr. Raphael Hirata, Dra. Verônica Vieira e Dra. Márcia Pimentel. Agradeço por todo aprenizado e pela disponibilidade e atenção dedicada a mim nas aulas ou em colaborações;

Ao Dr. Alexandre Dias, por me receber tão bem em seu laboratório e me ensinar técnicas importantes para a conclusão desse trabalho, além de colaborar com tudo o que precisei;

A Dra. Jemima Fuentes e seu grupo (Victor, Raíssa, dentre outros), que dedicaram seu tempo para me auxiliar em todas as análises histológicas e demais dúvidas que eu pudesse ter, colocando por muitas vezes meu trabalho como prioridade;

A Dra. Patrícia Lisboa e Msc. Deysla Sabino pela colaboração e por todo o auxílio prestado a mim;

À minha família LBMFE (Glenda, Pamella, Priscila, Melissa, Dayane, João, Jéssica Oliveira, Bruna, Renan, Gabriela, Luciene, Mônica, Mariléia), que me ajudou em todos os momentos, seja doando parte do seu tempo para realizar experimentos comigo, seja com palavras de ânimo e momentos felizes. Meus dias se tornaram leves tendo companheiros de trabalho tão especiais;

Em especial gostaria de agradecer a minha parceira de laboratório e amiga, Dayane Rodrigues, por todos os conselhos, por toda a ajuda nos diferentes momentos dentro e fora da UERJ e por me apoiar para chegar até aqui;

Por fim, gostaria de agradecer a todos os amigos que direta ou indiretamente contribuíram para que essa etapa fosse realizada. Sou grata pela vida de todos.

RESUMO

MENDONÇA, Jéssica da Conceição. **Estudo das infecções por *Streptococcus agalactiae* em modelo murino de diabetes induzida**. 2018. 67 f Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Programa de Pós-Graduação em Biologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2018.

Streptococcus agalactiae, também conhecido como estreptococos do Grupo B (EGB), é considerado a causa mais comum de infecções bacterianas em recém-nascidos e adultos imunocomprometidos, sendo classificado em dez diferentes tipos capsulares (Ia, Ib, II-IX). Infecções severas causadas pelo EGB podem afetar adultos não grávidos, particularmente idosos ou indivíduos com condições médicas subjacentes como diabetes, doenças cardiovasculares e câncer. As razões para o aumento da incidência do EGB ainda não são bem compreendidas. Dentre todas as doenças associadas às infecções pelo EGB, a diabetes é a mais comum. A resistência à insulina está associada com o aumento da susceptibilidade às infecções bacterianas invasivas. O objetivo do presente estudo foi investigar os mecanismos de patogênese do EGB utilizando um modelo de diabetes induzido por estreptozotocina em camundongos. Além disso, analisamos sete genes de virulência (*lmb*, *gbs2018* [ST-17], *PI-1*, *PI-2a*, *PI-2b*, *fbsA*, *fbsB* e *hylB*) como biomarcadores genômicos do EGB. Camundongos Swiss webster machos e fêmeas com seis semanas foram divididos em quatro grupos: 1. controle; 2. controle infectado; 3. diabético; 4. diabético infectado. Após três dias, os camundongos foram infectados intranasal com a amostra hipervirulenta GBS90356. Com três e cinco semanas os camundongos foram eutanasiados, e os pulmões e coração foram coletados. Fragmentos pulmonares foram fixados em paraformaldeído 4% para análises histopatológicas e para determinação de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) em placas de ágar base contendo 5% de sangue defibrinado de carneiro. Os fragmentos cardíacos foram submetidos apenas a contagem de UFC/mL. Somente o tecido cardíaco apresentou maior crescimento bacteriano nos camundongos diabéticos ($\sim 10^3$ UFC/mL) quando comparados ao controle. Um maior número de células inflamatórias foi observado (a maioria macrófagos) nos grupos 2 e 4. O grupo 4 apresentou ruptura dos septos alveolares e pontos de hemorragia. Os grupos diabéticos apresentaram maior expressão de colágeno e fibras elásticas. A amostra GBS90356 apresentou todos os genes de virulência, com exceção de *PI-2a*, justificando o potencial invasivo da amostra estudada. Os resultados mostraram que a infecção intranasal foi bem sucedida e sugerem que indivíduos com diabetes podem desenvolver infecções severas por EGB, ativar uma intensa resposta imune e serem mais susceptíveis à infecções pulmonares recorrentes.

Palavras-chave: Estreptococos do grupo B (EGB). Genes de virulência. Diabetes. Modelo murino. Histologia do pulmão.

ABSTRACT

MENDONÇA, Jéssica da Conceição. **Study of *Streptococcus agalactiae* infections in a diabetes induced murine model**. 2018. 67 f Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Programa de Pós-Graduação em Biologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2018.

Streptococcus agalactiae, also known as Group B *Streptococcus* (GBS), is the most common cause of bacterial infections in newborns and immunocompromised adults, and it is classified in ten different GBS capsular types (Ia, Ib, II-IX). Severe GBS infections can also afflict nonpregnant adults, particularly in the elderly and individuals compromised by underlying medical conditions, like diabetes, cardiovascular diseases or cancer. The main reasons for increased incidence of GBS disease is not well understood. Among all diseases associated with GBS infections, diabetes is one of the most common. The insulin resistance is associated with increase susceptibility of invasive bacterial infections. The aim of the present study was to investigate the mechanisms of GBS pathogenesis using streptozotocin-induced diabetic models in mice. In addition, we analyzed seven virulence genes (*lmb*, *gbs2018* [ST-17], *PI-1*, *PI-2a*, *PI-2b*, *fbsA*, *fbsB* e *hylB*) as genomic biomarkers in GBS90356. Six-week-old male and female *Swiss webster* mice were divided in four groups: 1. control; 2. infected control; 3. diabetic; 4. infected diabetic. Three days later, the mice were infected intranasal with hypervirulent GBS90356 strain. After three and five weeks, mice were euthanized and lungs and heart were collected. Lungs fragments were fixed with paraformaldehyde 4% for histopathological analysis and for determining colony-forming units per milliliter (CFU/mL) on blood agar base containing 5 % sheep defibrinated blood. Heart fragments were only submitted to CFU/mL count. Only heart tissues presented higher bacterial growth on diabetic mice ($\sim 10^3$ CFU/mL) when compared to control. A higher number of inflammatory cells were observed (mostly macrophages) in groups 2 and 4. Group 4 presented less thick and ruptured alveolar septa and hemorrhagic points. Diabetic groups presented more collagen and elastic fibers expression. The GBS90356 strain presented all the virulence genes, except *PI-2a*, justifying the invasive potential of the strain studied. The results showed that intranasal GBS infection in mice was successful and suggest that individuals with diabetes can develop severe GBS infections, activate intense immune response and be more susceptible to recurrent lung infections.

Keywords: Group B *Streptococcus* (GBS). Virulence genes. Diabetes. Murine model.
Lung histology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estágios da infecção neonatal causada por <i>S. agalactiae</i>	11
Tabela 1 - Lista de genes de virulência da amostra GBS90356.....	31
Tabela 2 - Índices glicêmicos (mg/dL) dos camundongos machos e fêmeas utilizados no modelo experimental.....	32
Figura 2 - Aferição dos níveis de glicemia dos camundongos.....	33
Figura 3 - Avaliação da massa corporal e consumo alimentício dos camundongos machos com três semanas de infecção.....	34
Figura 4 - Avaliação da massa corporal e consumo alimentício dos camundongos fêmeas com cinco semanas de infecção.....	35
Figura 5 - Aparecimento de injúrias na derme dos camundongos diabéticos infectados.....	36
Figura 6 - Comparação do crescimento de <i>S. agalactiae</i> no pulmão de camundongo controle infectado e camundongo diabético infectado...	37
Figura 7 - Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) no pulmão dos animais infectados após cinco semanas de infecção.....	37
Figura 8 - Comparação do crescimento de <i>S. agalactiae</i> no coração de camundongos controle infectado e diabético infectado.....	38
Figura 9 - Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) no coração de animais infectados e diabéticos infectados após cinco semanas.....	38
Figura 10 - Aspectos gerais do parênquima pulmonar dos animais infectados pela amostra GBS90356.....	40
Figura 11 - Quantificação de espessura epitelial, alveolar e número de células inflamatórias nos camundongos infectados ou não por <i>S. agalactiae</i> .	41
Figura 12 - Síntese e deposição de fibras de colágeno no parênquima pulmonar.	42
Figura 13 - Quantificação da expressão de colágeno nos diferentes grupos de estudo no parênquima pulmonar.....	43
Figura 14 - Colônias de <i>S. agalactiae</i> em septos alveolares do pulmão.....	44
Figura 15 - Deposição de fibras elásticas no parênquima pulmonar.....	45
Figura 16 - Quantificação da expressão de fibras elásticas nos diferentes grupos de estudo no parênquima pulmonar.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHI - Infusão cérebro coração

BPD - Displasias bronco-alveolares

CAMP - Técnica para confirmação laboratorial do EGB (sigla corresponde às iniciais Christie, Atkins e Miunch – Peterson)

CDC - *Center for Disease Control and Prevention* (Centro de Controle e Prevenção de Doenças)

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

DM1 - diabetes mellitus do tipo 1

DM2 - diabetes mellitus do tipo 2

DO - densidade ótica

EGB – Estreptococos do Grupo B

FALGPA - 2-furanacryloyl-Leu-Gly-Pro-Ala

Fbs - fibrinogênio

FbsA - proteína ligante ao fibrinogênio A

FbsB - proteína ligante ao fibrinogênio B

HE – hematoxilina e eosina

hyB – gene codificador da hialuronidase

IBRAG – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Ig – imunoglobulina

IVET - *In Vivo Expression Technology*

Lmb - laminina

LVB - Laboratório de Vacinas Bacterianas

MSCRAMMs - moléculas da matriz adesiva

PBS - Phosphate buffer solution; solução de tampão fosfato

PCR - Polymerase Chain Reaction; reação em cadeia da polimerase

PI-1 – ilha pili 1

PI-2a – ilha pili 2-a

PI-1b – ilha pili 2-b

PN – pós-natal

RER - retículo endoplasmático rugoso

ScpB - C5a peptidase de *S. agalactiae*

ST-1 – Sequência-tipo 1

ST-17 – Sequência-tipo 17

UDO - unidades de densidade ótica

UFC/mL – unidades formadoras de colônia por mililitro

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	10
1	OBJETIVOS	22
2	METODOLOGIA	23
2.1	Amostra bacteriana	23
2.2	Detecção dos genes de fatores de virulência por PCR	23
2.3	Comitê de ética	24
2.4	Animais	24
2.5	Grupos de estudo	24
2.6	Indução da diabetes mellitus	25
2.7	Aferição da glicemia	25
2.8	Infecção com amostra de <i>S. agalactiae</i> GBS90356	26
2.9	Eutanásia dos animais	26
2.10	Histologia dos pulmões	27
2.10.1	<u>Coloração hematoxilina e eosina (HE)</u>	28
2.10.2	<u>Coloração Tricrômio de Gomori</u>	29
2.10.3	<u>Coloração de Weigert</u>	29
2.11	Quantificação e análise estatística	30
3	RESULTADOS	31
3.1	Detecção de genes de fatores de virulência da amostra GBS90356 ..	31
3.2	Glicemia	31
3.3	Massa corporal e consumo alimentar	33
3.4	Manifestação clínica da infecção por <i>S. agalactiae</i> em camundongos	35
3.5	Contagem das unidades formadoras de colônia (UFC/mL)	36
3.6	Coloração hematoxilina e eosina	39
3.7	Coloração Tricrômio de Gomori	41
3.8	Coloração de Weigert	44
4	DISCUSSÃO	47
	CONCLUSÃO	55
	REFERÊNCIAS	56

INTRODUÇÃO

Características gerais

Streptococcus agalactiae, também conhecidos como Estreptococos do grupo B (EGB), descritos inicialmente por Lancefield e Hare (1935), são cocos patogênicos pertencentes à família *Streptococcaceae* e caracterizados por serem Gram-positivos, encapsulados, beta-hemolíticos, anaeróbicos facultativos, catalase e oxidase negativos, hipurato e CAMP positivos. Possuem o antígeno do grupo B de Lancefield constituído por resíduos de ramnose e N-acetilglicosamina (Lancefield, 1933).

Até o ano de 1935, o *S. agalactiae* era considerado como agente etiológico apenas de mastite bovina. A mastite é responsável pela maior perda econômica para a indústria de laticínios (Erskine, 1992; Keefe, 1997). A qualidade do leite e a prevalência de mastite são considerados fatores determinantes para a análise de rentabilidade da produção de leite e derivados (Reneáu, Packard, 1991).

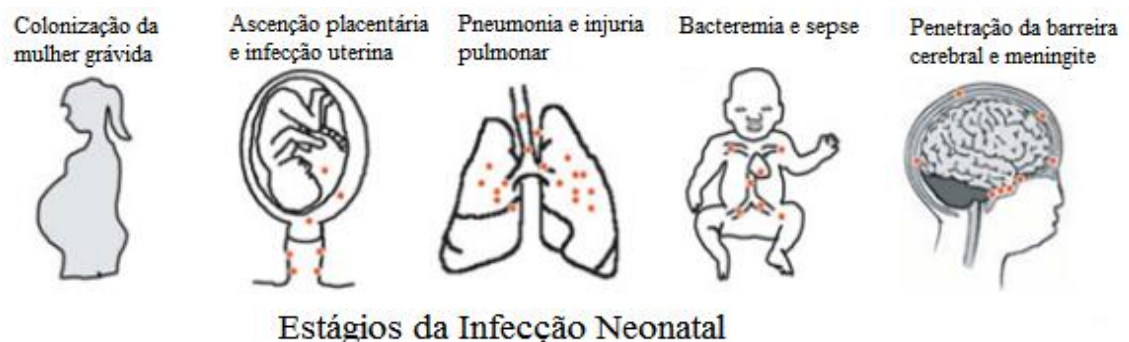
Na década de 70 esse patógeno passou a ser reconhecido como pertencente à microbiota anfibiótica dos tratos respiratório, gastrointestinal e urogenital de pessoas saudáveis (Levent et al., 2010; Dutra et al., 2014). São considerados patobiontes, ou seja, colonizadores patogênicos que normalmente residem no intestino coexistindo com o hospedeiro, mas que podem causar doenças severas locais ou sistêmicas (Landwehr-Kenzel, Henneke, 2014). São também causa predominante de infecções invasivas em neonatos, considerado um dos maiores agentes causadores de sepse, meningite e pneumonia em recém-nascidos, atingindo 3 casos a cada 1.000 nascimentos (Glaser et al., 2002). O *S. agalactiae* é a primeira espécie bacteriana a entrar em contato com o feto, por colonizar o canal vaginal de 10-30% das mulheres grávidas (Wennekamp, Henneke, 2008). Em países desenvolvidos, a incidência de *S. agalactiae* em neonatos é altamente variável (Heath et al., 2004; Johri et al., 2006). Em algumas áreas da África, o *S. agalactiae* vem emergindo como uma das causas mais importantes de sepse e meningite neonatal com incidência geral superior a 1,8/1.000 nascimentos, enquanto as taxas de mortalidade chegam a ser maiores do que 33% (Schuchat, 1997; Osrin, Vergano, Costello, 2004).

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

A infecção neonatal a partir desse patógeno oportunista pode se apresentar de duas formas: de início precoce ou de início tardio. Em casos de início precoce, a bactéria é transferida da mãe para o feto no útero, a partir da infecção ascendente das membranas placentares ou durante a passagem pelo canal vaginal através da aspiração dos fluidos vaginais infectados durante o parto normal (Figura 1). A infecção de início precoce se manifesta entre as primeiras horas ou até 3 dias de vida, apresentando quadros de pneumonia ou falha respiratória que pode progredir para sepse e choque séptico (Doran, Nizet, 2004).

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

Figura 1 - Estágios da infecção neonatal causada por *S. agalactiae*



Fonte: Doran, Nizet, 2004.

São considerados fatores de risco para infecções por *S. agalactiae* a prematuridade, o baixo peso no nascimento, o rompimento prolongado das membranas, a febre intraparto, a corioamnionite, a etnia materna (mães negras e

hispânicas possuem maior risco comparado às mães caucasianas) e a endometriose (Law et al., 2005; Heath, Jardine, 2010).

S. agalactiae é também responsável por elevada taxa de mortalidade e morbidade em adultos não-grávidos, particularmente em idosos e adultos com doenças subjacentes (Schuchat, 1997; Farley, 2001). Mesmo havendo uma diminuição de casos fatais atribuídos às infecções por *S. agalactiae*, nas últimas duas décadas a mortalidade por sepse dentre adultos não-grávidos permanece considerável (Edwards, Baker, 2005). Cerca de 1 a cada 20 (5%) adultos não-grávidos com infecções causadas por *S. agalactiae* são levados a óbito. A taxa de doenças invasivas é de aproximadamente 25 casos a cada 100.000 adultos com mais de 65 anos (*Centers for Disease Control and Prevention*, 2016).

Noventa por cento dos pacientes com infecções invasivas causadas por *S. agalactiae* apresentam pelo menos uma doença crônica debilitante, particularmente diabetes mellitus, cirrose hepática, falha renal crônica, falha no coração, doenças pulmonares ou qualquer tipo de imunossupressão (Batista, Ferreira, 2015). Contudo, a diabetes mellitus, provavelmente devido à disfunção associada aos leucócitos é a mais prevalente nos casos de infecções por *S. agalactiae* (Rajagopalan, 2005; Edwards, Baker, 2005; Turan et al., 2008).

O aumento dos casos de infecções por *S. agalactiae* pode ser atribuído à expansão populacional de adultos e ao aumento da expectativa de vida, mesmo em portadores de doenças crônicas (Farley, 2001). A prevalência da diabetes (44,4%) dentre os pacientes colonizados com *S. agalactiae* é superior se comparado ao restante da população não diabética. Além disso, a prevalência de adultos diagnosticados com diabetes e obesidade dobrou desde a década de 80 nos Estados Unidos (Skoff et al., 2009).

Manifestações clínicas de infecções por *S. agalactiae* em adultos são variadas e podem ocorrer na pele, tecidos moles, além de infecções no trato urinário, sepse, pneumonia, artrite e endocardite (Rajagopal, 2009).

A colonização e infecção dos tecidos alvo por *S. agalactiae* requer a capacidade do patógeno de aderir e invadir as superfícies da mucosa epitelial (Rosini, Margerit, 2015). *S. agalactiae* é capaz de aderir uma série de células humanas incluindo o epitélio vaginal, membranas placentárias, epitélio do trato respiratório e a barreira endotelial hemato-encefálica (Tamura et al., 1994). As interações de maior afinidade do *S. agalactiae* com células hospedeiras são

mediadas por uma série de proteínas hidrofóbicas de superfície (Wibawan et al., 1992).

O tratamento indicado para infecções causadas pelo *S. agalactiae* continua sendo com antibióticos, sendo a penicilina e a ampicilina os de primeira escolha. Em casos mais graves recomenda-se a utilização de um aminoglicosídeo, geralmente a gentamicina. Clindamicina e eritromicina são antibióticos também recomendados em casos de pacientes alérgicos à penicilina (*Centers for Disease Control and Prevention*, 2010; Lopardo et al., 2003; Villar, Jugo, 2013). Um aumento nas taxas de resistência a estes antibióticos está sendo detectado em diversas regiões do mundo, incluindo Europa, Ásia e Américas do Norte e do Sul (Dutra et al., 2014).

Distribuição dos isolados de *S. agalactiae*

Polissacarídeos capsulares são reconhecidos como tendo um papel fundamental dentre os fatores de virulência e são um alvo importante para o desenvolvimento de estratégias de vacinas. Os polissacarídeos capsulares de *S. agalactiae* possuem diferenças químicas e antigênicas que são capazes de subdividir essa espécie em dez tipos capsulares distintos denominados Ia, Ib, II-IX (Slotved et al., 2007).

A distribuição epidemiológica dos tipos capsulares de *S. agalactiae* pode variar de acordo com uma série de aspectos tais como a região geográfica, o perfil da população estudada e a fonte do isolado bacteriano (Dogan et al., 2005). Quatro tipos capsulares (Ia, II, III e V) são frequentemente isolados nos Estados Unidos e em alguns países europeus (Luan et al., 2005; Gherardi et al., 2007), enquanto os tipos VI-IX são raramente descritos. Os isolados do tipo III são associados à meningite neonatal (Alves et al., 2015) e o tipo V o mais comum em adultos não-grávidos (Blumberg et al., 1996). Estudo realizado na Argentina demonstrou uma distribuição similar entre adultos, com exceção do tipo II, que foi o mais frequente entre jovens adultos (Lopardo et al., 2003).

No Brasil a ocorrência dos tipos Ia, Ib, II, III, IV e V tem sido descrita em estudos com isolados de todas as regiões do país (Dutra et al., 2014, Pimentel et al., 2016). Cerca de 68,2% dos isolados brasileiros são predominantemente provenientes do trato vaginal de mulheres grávidas. Em Curitiba, o tipo IV foi

identificado em 13,1% das amostras coletadas de infecções invasivas graves, enquanto os tipos Ib (34,9%) e Ia (25,6%) foram predominantes em grávidas infectadas pelo vírus HIV e em pacientes com câncer (Palmeiro et al., 2010; Souza et al., 2013; Dutra et al., 2014).

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

Fatores de virulência

Assim como diversas bactérias patogênicas, o *S. agalactiae* codifica uma série de fatores de virulência que são críticos na definição de sua capacidade de causar doenças (Rajagopal, 2009). A virulência do *S. agalactiae* é complexa e multifatorial, onde uma série de fatores determinantes estão envolvidos na adesão e invasão das células hospedeiras, assim como na evasão do sistema imune. Componentes de superfície, incluindo a cápsula polissacarídica e proteínas de ligação aos componentes da matriz extracelular, além de enzimas (como a C5 peptidase) e toxinas/citólisinases têm sido associadas com a virulência desse microrganismo (Maisey, Doran & Nizet, 2009). Estudos recentes mostraram que cepas pertencentes à sequência tipo ST-17 e mais recentemente à sequência ST-1 são consideradas hipervirulentas (Lartigue et al., 2011).

Durante a infecção sistêmica, o *S. agalactiae* emprega uma série de estratégias para evitar seu reconhecimento pelo sistema imune do hospedeiro. Dois importantes fatores medeiam a adesão do patógeno à matriz extracelular: proteínas ligantes ao fibrinogênio (Fbs) e proteínas ligantes à laminina (Lmb) (Landwehr-Kenzel, Henneke, 2014). Enquanto a proteína ligante ao fibrinogênio A (FbsA) promove a adesão, a proteína ligante ao fibrinogênio B (FbsB) medeia a invasão de *S. agalactiae* às células hospedeiras (Schubert et al., 2002; Jacobsson, 2003). Segundo Spellerberg e colaboradores (1999), a associação bacteriana à matriz extracelular via Lmb parece ser importante para a translocação do *S. agalactiae* pelo

epitélio intestinal e pela barreira hemato-encefálica (Landwehr-Kenzel, Henneke, 2014)

Um outro fator de virulência importante é a β -hemolisina/citolisina, uma toxina formadora de poros responsável pelas características fenotípicas beta-hemolíticas de *S. agalactiae* nas placas de ágar sangue (Facklam et al., 1974). A expressão da β -hemolisina/citolisina está correlacionada com a severidade da doença em modelos murinos de administração intranasal e intravenosa, consistente com sua capacidade de produzir injúria tanto nos glóbulos vermelhos quanto nas células epiteliais pulmonares e endoteliais (Carlin, Lewis, Varki, Nizet, 2007). Estudos também demonstraram o papel da β -hemolisina/citolisina durante a aderência no epitélio pulmonar e na indução da expressão da citocina quimioatrativa interleucina 8 (IL-8) (Doran et al., 2002).

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

Estudos relataram a presença de pequenos apêndices na superfície de *S. agalactiae* denominados pili (Lauer et al., 2005; Dramsi et al., 2006). Os pili são capazes de mediar a resistência aos peptídeos catiônicos antimicrobianos (PCA) e também facilitar a adesão de *S. agalactiae* em células do hospedeiro (Dramsi et al., 2006, Maisey et al., 2007, Pezzicoli et al., 2008; Maisey et al., 2009). Apesar de o mecanismo pelo qual os pili permitem que *S. agalactiae* resistam aos peptídeos catiônicos antimicrobianos não ser compreendido, amostras de *S. agalactiae* que apresentavam deficiência na proteína acessória PI-1b demonstraram diminuição na virulência e aumento na suscetibilidade à fagocitose e PCA (Maisey et al., 2007; Maisey et al., 2009). Foram descritos dois tipos de pili, os que são codificados pela ilha pili 1 (PI-1) e ilha pili 2-a (PI-2a), localizados em *locus* distintos (PI-1 e PI-2) (Lauer et al., 2005). Os pili têm sido relatados como mediadores na adesão em células epiteliais humanas (Rosini et al., 2006, Dramsi et al., 2006, Konto-Ghiorgi et al., 2009), na adesão e invasão de células endoteliais microvasculares cerebrais

(Maisey *et al.*, 2007) e na promoção da migração transepitelial (Pezzicoli *et al.*, 2008). Outros estudos comprovam o envolvimento dos pili na aderência e invasão de *S. agalactiae* em células eucarióticas A549. Amostras mutantes deficientes em pili pertencentes aos sorotipos Ia, III e VII exibiram uma redução significativa na aderência, e no caso da amostra do sorotipo VII uma redução também na invasão (Sharma *et al.*, 2013).

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

A C5a peptidase de *S. agalactiae* (ScpB) é uma protease serina que facilita o patógeno na evasão do sistema imune hospedeiro. ScpB, codificado pelo gene *scpB*, é capaz de clivar e inativar o componente C5a do sistema complemento humano. Como C5a é fundamental no recrutamento dos neutrófilos ao sítio da infecção, a clivagem feita por ScpB impede o recrutamento dos neutrófilos. ScpB também pode promover a ligação de *S. agalactiae* às células epiteliais humanas e à fibronectina (Hull *et al.*, 2007; Okumura, Nizet, 2014).

A hialuronidase funciona como importante fator de propagação (Lin *et al.*, 1994), sendo uma proteína de 110 kDa que promove a degradação do ácido hialurônico, principal componente do tecido conjuntivo e do sistema nervoso. É encontrado em altas concentrações na placenta, no líquido amniótico e no pulmão, sendo também secretada pela bactéria e codificada pelo gen *hyB* (Gase *et al.*, 1998; Li, Jedrzejewski, 2001; Rajagopal, 2009). A hialuronidase facilita a propagação dos *S. agalactiae* pelos tecidos do hospedeiro por clivar a ligação glicosídica entre os resíduos de N-acetil- β -D-glicosamina e ácido D-glicurônico do ácido hialurônico (Pritchard *et al.*, 1994). Amostras de *S. agalactiae* isoladas de sangue apresentam altos níveis desta enzima, demonstrando que estas amostras podem ser mais invasivas (Kjems *et al.*, 1980; Pritchard *et al.*, 1994).

Resposta imune desencadeada por bactérias gram-positivas

O sistema imune inato compreende a interação de células e moléculas efetoras capazes de nos defender contra infecções após exposição a algum patógeno. Além das barreiras físicas da pele e mucosa epitelial, mecanismos mais sofisticados permitem ao hospedeiro reconhecer padrões moleculares de microrganismo, levando à ativação das respostas inflamatórias. De grande importância, leucócitos especializados como neutrófilos e macrófagos são responsáveis por migrar para o sítio de infecção, realizar fagocitose e produzir compostos microbicidas eficientes na eliminação do patógeno antes que ele consiga avançar para outros tecidos (Okumura, Nizet, 2014; Abbas, Litchman, Pillai, 2015).

Falhas na imunidade inata causadas por imunodeficiência devido à genética, imaturidade e senescência das funções imunes, má nutrição ou doenças crônicas podem gerar sérias infecções. Patógenos Gram-positivos como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus* do grupo A e *Streptococcus agalactiae* são capazes de produzir infecções invasivas que podem levar ao óbito (Okumura, Nizet, 2014).

A fagocitose bacteriana pelos neutrófilos e macrófagos é aumentada após sua ligação com o anticorpo específico, permitindo a adsorção pelo receptor Fc. Uma estratégia utilizada pelas bactérias Gram-positivas para evitar que os receptores Fc e C1q do hospedeiro reconheçam as imunoglobulinas (Ig) ligadas ao antígeno é a reorientação do anticorpo, que passa então a ligar-se à própria região Fc do patógeno, inibindo por competição as funções efetoras das células imunes (Kim et al., 2012; Okumura, Nizet, 2014).

Os patógenos Gram-positivos também são capazes de fazer com que a protease do plasminogênio do hospedeiro adquira a capacidade de degradar os anticorpos. A estafiloquinase ativa o plasminogênio em plasmina, que é então capaz de clivar as imunoglobulinas de superfície, bem como C3b (Okumura, Nizet, 2014). Outras bactérias Gram-positivas possuem proteases ativadores de plasminogênio, contudo, ainda não foi demonstrada a capacidade de diferenciação em plasmina e posterior degradação de anticorpos (Ly et al., 2014; Wiles et al., 2010).

Mesmo que o anticorpo consiga obter sucesso ligando-se ao alvo antigênico, esses patógenos foram capazes de desenvolver mecanismos adicionais capazes de

impedir as funções efectoras do receptor Fc. Componentes de superfície de *S. aureus* que reconhecem moléculas da matriz adesiva (MSCRAMMs) podem se ligar ao receptor Cq1 de forma que todo o complexo Cq seja inativado, e então a bactéria utiliza esse receptor para aderir às células epiteliais e endoteliais, concomitantemente prevenindo sua interação com outras proteínas do complemento. (Agarwal et al., 2013; Kang et al., 2013).

Uma característica em comum das bactérias Gram-positivas é a elaboração de citotoxinas capazes de danificar a membrana de vários tipos de células do hospedeiro, sendo importante na penetração das barreiras endoteliais e epiteliais. Como células fagocíticas (neutrófilos e macrófagos) são comumente vulneráveis à essa atividade citotóxica, outro mecanismo de evasão da imunidade inata é a morte da célula fagocítica antes que a bactéria seja totalmente combatida (Maisey et al., 2008; Okumura, Nizet, 2014). Contudo, a resposta de *S. agalactiae* às defesas do hospedeiro precisa ser melhor investigada.

Alterações histológicas causadas pela infecção por *S. agalactiae*

Estudos histopatológicos fornecem uma melhor visualização da doença e dos seus efeitos nos tecidos, preservando sua arquitetura durante o processo de preparação (Gurcan et al., 2009). Infecções bacterianas promovem alterações teciduais que podem ser observadas a partir de metodologias histológicas, sugerindo aspectos de sua patogenicidade e metabolismo, além de auxiliar no diagnóstico da doença.

Alguns trabalhos com o gênero *Streptococcus*, particularmente com *S. pneumoniae* relataram alterações significativas em órgãos de camundongos como rins e bexiga. Brown e colaboradores (2014) identificaram lesões microscópicas durante a doença invasiva pneumocócica causada por esse patógeno.

Rubens e colaboradores (1991) realizaram inoculação de *S. agalactiae* em *Macaca nemestrina* e demonstraram a presença do microrganismo nos tecidos pulmonares, dentro de vacúolos ligados na membrana do epitélio alveolar dos tipos I e II e também em fibroblastos intersticiais. Em invasões bacterianas do parênquima pulmonar causada por cocos, incluindo *S. agalactiae*, foi observado edemas pulmonares e redução da defesa alveolar, principalmente relacionada aos

macrófagos residentes com consequente fagocitose comprometida (Rubens et al., 1991).

Jackson e colaboradores (1994) demonstraram que *S. agalactiae* possui atividade colagenolítica. Estudo prévio demonstrou que camundongos diabéticos possuem defasagem na secreção de colágeno (82%) se comparados aos camundongos saudáveis (Ferreira et al., 2017). Ainda não se sabe se a associação entre infecções causadas pelo *S. agalactiae* e a diabetes são capazes de diminuir ou aumentar a produção de colágeno, fator relacionado à capacidade de regeneração tecidual.

Diabetes

A homeostasia da glicose se dá pela regulação de mecanismos neuro-humorais, controlados por um grupamento de células pancreáticas identificadas por Paul Langerhans em 1869. Essas células não se relacionavam com o sistema de ácinos e ductos do pâncreas exócrino, e deveriam então representar o pâncreas endócrino (Aires, 2008). As então chamadas ilhotas pancreáticas foram subdivididas em pelo menos quatro tipos celulares, onde a mais relevante para esse estudo são as ilhotas β pancreáticas, produtoras e secretoras de insulina (Silverthorn, 2015).

A insulina é um hormônio peptídico constituído por duas cadeias de resíduos de aminoácidos. Sua síntese se inicia no retículo endoplasmático rugoso (RER), onde a primeira molécula formada (pré-proinsulina) é transportada através do complexo de Golgi para ser empacotada na forma de grânulo e posteriormente a proinsulina da origem à insulina e ao peptídeo C (peptídeo conector das cadeias A e B). A insulina permanece armazenada até que algum estímulo a faça ser secretada do grânulo. A regulação da secreção da insulina é feita fundamentalmente pela glicose circulante, onde o aumento do nível de glicose no plasma sanguíneo causa elevação da secreção de insulina, que irá elevar o transporte de glicose para diferentes tecidos do organismo, diminuindo a glicemia. Quando a glicemia diminui, não há mais o estímulo para a secreção da insulina. Esse mecanismo regulatório é fundamental para a homeostasia (Aires, 2008; Berne e Levy, 2009).

A diabetes é então uma doença caracterizada pela resistência à insulina, que por sua vez está associada com o aumento da susceptibilidade às infecções

bacterianas invasivas (Kenzel et al., 2012). Essa doença pode ser classificada em diabetes mellitus do tipo 1 (DM1), diabetes mellitus do tipo 2 (DM2) e diabetes gestacional. No DM tipo 1 ocorre uma destruição crônica das células β pancreáticas através de mecanismos autoimunes, mediados por células como linfócitos T e macrófagos (Ferreira, Saviolli, Valenti, Abreu, 2011). A DM do tipo 2 é caracterizada pela insensibilidade à insulina resultante da resistência à insulina, declínio na produção de insulina, e eventual falha nas células beta-pancreáticas (Robertson, 1995). Esses fatores ocasionam na diminuição do transporte da glicose para o fígado, células musculares e células de gordura. A diabetes do tipo 2 é resultado de interações entre fatores de risco genéticos, do ambiente e de comportamento (Olokoba, Obateru, Olokoba, 2012). A diabetes gestacional é classificada a partir de qualquer grau de intolerância à glicose durante a gravidez (American Diabetes Association, 2011). A diabetes diagnosticada e a obesidade têm duplicado entre adultos desde o início da década de 80 (Langley et al., 2016). É estimado que 366 milhões de pessoas possuíam diabetes mellitus em 2011; e que em 2030 esse número aumente para 552 milhões (International Diabetes Federation, 2011).

A diabetes mellitus é a comorbidade mais comum, tipicamente presente em 20% - 25% dos adultos não-grávidos colonizados por *S. agalactiae*. Em Atlanta, mais de 40% dos jovens e adultos (18-64 anos) com infecções invasivas por *S. agalactiae* possuíam diabetes (Farley, 2001). Outras condições incluindo obesidade, cirrose, histórico de derrame, câncer de mama, ulcera de decúbito e bexiga neurogênica têm sido associadas com o risco aumentado de infecções invasivas pelo *S. agalactiae* (Jackson et al., 1995).

Adultos com diabetes mellitus podem desenvolver múltiplas anormalidades em relação à função dos fagócitos, além de alterações na aderência dos leucócitos e na quimiotaxia. O sistema antioxidante envolvido na atividade bactericida das células imune também pode ser afetado (Joshi et al., 1999; Rajagopalan, 2005). A ativação persistente de um pequeno número de neutrófilos em associação com a hiperglicemia ou a presença dos produtos finais da glicosilação podem modificar a resposta dos neutrófilos (Delamaire et al., 1997; Rajagopalan, 2005). Além disso, a diabetes vem sendo associada com uma redução na resposta das células T e com desordens na imunidade humoral (Geerlings, Hoepelman, 1999; Casqueiro, Casqueiro, Alves, 2012). Conseqüentemente, a diabetes mellitus aumenta a susceptibilidade às infecções e complicações como hipoglicemia e cetoacidose.

A diabetes também pode predispor um paciente aos danos musculares. Modificações microangiopatogênicas e aterosclerose estão associados com microinfartos (Nielsen et al., 2017). A subsequente diminuição do fornecimento sanguíneo e hipóxia local pode aumentar o risco de infecções e formação de abscessos. Membranas densamente espessadas nos capilares já foram notadas em diabéticos e são capazes de inibir a migração dos neutrófilos (Panikkath et al., 2016).

Estudos com modelos animais demonstram que a maneira ideal para a indução à diabetes mellitus é utilizando a droga estreptozotocina. Essa droga é isolada de *Streptomyces achromogenes* var. *streptozoticus* e possui propriedades citotóxicas que causam danos irreversíveis às células beta-pancreáticas (Edwards, Fuselier, 1983).

Modelos de infecção utilizando microrganismos Gram-negativos como *Acinetobacter baumannii*, *Escherischia coli* e *Klebisiella pneumoniae* em camundongos diabéticos demonstraram que a diabetes causa danos excessivos ao hospedeiro através de uma inflamação hiperativa da imunidade inata, indicando a necessidade de compreender melhor os mecanismos inflamatórios das infecções promovidas por microrganismos patogênicos (Nielsen et al., 2017). Contudo, ainda é necessária uma maior investigação em relação à diabetes e bactérias Gram-positivas, em especial o *S. agalactiae* que não possui estudos similares, mesmo sendo a diabetes o fator de risco mais comum.

Sendo um dos maiores problemas mundiais de saúde atualmente, tanto em termos de número de pessoas afetadas como de custos envolvidos no seu controle e no tratamento de suas complicações, o diabetes e sua susceptibilidade às infecções bacterianas precisam ser melhor investigadas. Dessa forma, interações em modelos *in vivo* são necessárias para melhor compreensão dos mecanismos patogênicos do *S. agalactiae* e das alterações histológicas provocadas nos diferentes tecidos-alvo. Visamos com os dados do presente estudo contribuir no tratamento e na prevenção de infecções por *S. agalactiae* em pacientes debilitados pela diabetes.

1 OBJETIVOS

Objetivo Geral

Streptococcus agalactiae vem emergindo como um dos principais microrganismos causadores de infecções invasivas como a sepse, meningite, pneumonia e endocardite em adultos imunocomprometidos, principalmente por diabetes mellitus. As razões para o aumento da incidência da doença por *S. agalactiae* entre adultos não gestantes não são bem compreendidos. Sendo assim, estudos que possam contribuir para o esclarecimento dos mecanismos que o *S. agalactiae* utiliza para o desenvolvimento da patogênese e, conseqüentemente, para o tratamento e a redução da mortalidade envolvida nas infecções invasivas são relevantes.

Objetivos Específicos

- a) Identificar os genes dos fatores de virulência presentes na amostra GBS90356 tipo capsular III;
- b) Induzir a diabetes mellitus em camundongos *Swiss Webster* utilizando a droga estreptozotocina;
- c) Realizar a infecção via intranasal dos animais diabéticos e controles com *Streptococcus agalactiae*;
- d) Avaliar a evolução de massa corporal, níveis glicêmicos e consumo alimentar nos animais diabéticos e controles;
- e) Analisar a disseminação bacteriana em órgãos-alvo como pulmão e coração;
- f) Analisar histopatologicamente os pulmões de camundongos diabéticos e não diabéticos infectados com *S. agalactiae*;
- g) Quantificar as fibras de colágeno por Tricrômio de Gomori e as fibras elásticas por coloração de Weigert.

2 METODOLOGIA

2.1 Amostras bacterianas

Foi utilizada nos experimentos a amostra de *S. agalactiae* GBS90356, pertencente ao tipo capsular III e sequência-tipo 17, isolada de líquido de paciente recém-nascido. O microorganismo foi identificado e tipado de acordo com a metodologia descrita por Poyart e colaboradores (2007).

A cultura bacteriana foi armazenada a -70°C em alíquotas de meio líquido *Brain Heart Infusion* (BHI; Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) contendo 20% de glicerol. Para a realização dos experimentos, a amostra foi crescida em placas de Agar Müeller-Hinton contendo 5% de hemácias de carneiro (Plast Labor LTDA, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e, posteriormente em meio BHI para padronização para uma densidade ótica (DO) de 0,2 unidades de densidade ótica (UDO) em $\lambda = 540\text{nm}$ ($\sim 1 \times 10^5$ unidades formadoras de colônia por mililitro [UFC/mL])

2.2 Detecção dos genes de fatores de virulência por PCR

Os seguintes genes de virulência para a amostra GBS90356 foram verificados por PCR: *Imb*, *gbs2018*, *PI-1*, *PI-2a*, *PI-2b*, *fbsA*, *fbsB*, *hylB*. No termociclador (VERITI 96 WELL THERMAL CYCLER, AppliedBio), 50 μL de reação final (200 μM cada dNTP, 5u/ μL de GoTaq polimerase, tampão GoTaq 5x e 50ng DNA) foram utilizado, seguindo os padrões utilizados anteriormente na tipagem. As temperaturas e tempos utilizados para desnaturação, anelamento e amplificação foram, respectivamente: 96°C por 1 min, 45°C por 1 min e 72°C por 45 seg, por 35 ciclos. Um total de 10 μL de cada produto de PCR foi separado por eletroforese num gel de agarose para confirmar a amplificação bem sucedida.

2.3 Comitê de Ética

Os estudos realizados com animais estiveram de acordo com a aprovação do Comitê de Ética para o cuidado e uso de animais experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (CEUA – IBRAG), registrado pelo número 47/2016.

2.4 Animais

No presente trabalho foram utilizados 76 camundongos, entre machos e fêmeas, da linhagem *Swiss webster*. Os animais foram cedidos pelo Dr. Alexandre Dias do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Departamento de Imunologia, Laboratório de Vacinas Bacterianas (LVB) – Fundação Oswaldo Cruz/RJ, com peso variando entre 30-40 gramas. Todos os animais foram submetidos à dieta padrão do LVB e tiveram acesso livre à água e ração. Os dados de consumo e massa corporal foram aferidos a partir de uma escala realizada a cada quatro dias e, posteriormente analisados estatisticamente utilizando o one-way ANOVA e o pós teste Newman-Keuls no GraphPad Prisma.

2.5 Grupos de estudo

Para realização do estudo os camundongos foram divididos em quatro grupos:

Grupo 1 – Controle: 19 animais (6 machos e 13 fêmeas) não infectados com a amostra GBS90356 e com acesso livre à água e ração.

Grupo 2 – Infectado: 19 animais (6 machos e 13 fêmeas) infectados com a amostra GBS90356 e com acesso livre à água e ração.

Grupo 3 – Controle Diabético: 19 animais (6 machos e 13 fêmeas) tratados com estreptozotocina, não infectados com a amostra GBS90356 e com acesso livre à água e ração.

Grupo 4 – Diabético Infectado: 19 animais tratados (6 machos e 13 fêmeas) com estreptozotocina, infectados com a amostra GBS90356 e com acesso livre à água e ração.

Foram dois os tempos de infecção: três semanas e cinco semanas. No experimento piloto, realizado em três semanas, as fêmeas foram resistentes à dose administrada de estreptozotocina. Sendo assim, apenas machos foram utilizados. Nos demais experimentos obtivemos acesso apenas a camundongos fêmeas, dessa forma, no modelo padronizado de cinco semanas de infecção, baseado no trabalho de Hulstijn e colaboradores (2011), foram utilizados apenas camundongos fêmeas. Os animais resistentes à droga não foram utilizados no estudo, assim como os animais que morreram em decorrência da diabetes.

2.6 Indução da diabetes mellitus

A indução da diabetes nos camundongos da linhagem *Swiss webster* foi realizada utilizando 180 mg/kg de estreptozotocina (Sigma-Aldrich) diluída em tampão citrato via intraperitoneal. A aferição de peso de todos os animais foi feita 2h antes da indução. Os animais controle foram tratados com tampão citrato puro. Após a indução, os animais receberam durante um dia água com adição de açúcar, além da ração já utilizada, com o intuito de evitar hipoglicemia.

2.7 Aferição da glicemia

A glicemia foi aferida 2h antes da indução da diabetes com a estreptozotocina e 48h após a indução à diabetes, com o auxílio de um monitor de glicemia *AccuCheck Active* e fitas glicêmicas. Os animais foram previamente pesados e marcados com uma caneta permanente para identificação. Para a dosagem

glicêmica, os animais foram momentaneamente imobilizados e submetidos a um pequeno corte na ponta da cauda, o sangue foi retirado e colocado nas fitas glicêmicas para leitura pelo aparelho. Foi considerado diabético o animal com o índice glicêmico acima de 200 mg/dL, seguindo o parâmetro de Kasap e colaboradores (2017). A confirmação dos níveis de glicose foi realizada novamente ao final dos experimentos.

2.8 Infecção com amostra de *S. agalactiae* GBS90356

Os camundongos foram inicialmente administrados com o anestésico (0,17 mL xylazina, 2,83 mL solução salina, 0,33 mL ketamina) via intraperitoneal. Cada animal recebeu entre 0,10 mL e 0,15 mL do anestésico. Posteriormente, os animais foram infectados com 30 μ L da suspensão bacteriana crescida em meio BHI e 0,2 UDO ($\sim 1 \times 10^5$ UFC/mL) via intranasal. Os grupos infectados foram mantidos em caixas separadas, cerca de 3 a 4 animais por caixa, até o momento da eutanásia.

2.9 Eutanásia dos animais

No modelo piloto, os animais foram mantidos com a infecção por 21 dias. Contudo, verificamos em publicações com outros patógenos que a infecção mantida por 5 a 7 semanas apresentava dados histológicos mais expressivos. Sendo assim, 35 dias após a infecção, os animais foram novamente anestesiados, imobilizados e cerca de 200 μ L de sangue foram retirados de cada animal com o auxílio de pipetas Pasteur de vidro. O sangue foi armazenado em tubos de 1,5 mL devidamente identificados. Em seguida, os tubos de 1,5 mL foram centrifugados a 1200 rpm por 3 min a 4°C. O plasma sanguíneo foi retirado e armazenado em criotubos a -10°C para estudos posteriores.

Os animais foram sacrificados em câmaras de CO₂ e necropsiados para a retirada dos órgãos alvo: pulmões e coração. Os órgãos reservados para análises

histológicas foram reservados a 4°C em tubos cônicos (50 mL) contendo paraformaldeído 4%. Os demais órgãos foram colocados separadamente em tubos de vidro contendo solução salina e macerados utilizando um macerador de vidro. Foi utilizada a diluição 1:1000 em solução salina 0,9% e 100 µL da última diluição foi adicionado a uma placa de ágar acrescida com 5% de hemácias de carneiro. As placas foram colocadas em estufa de crescimento por 24h para realização da contagem bacteriana em unidades formadoras de colônia (UFC/mL).

As placas de ágar sangue contendo 5% de hemácias de carneiro foram retiradas da estufa para contagem bacteriana (UFC/mL), de forma que só foram realizadas as contagens das placas contendo entre 250-300 colônias. As placas com um número de colônias superior a 300 foram descartadas para evitar erros de contagens, conforme recomendação do CDC - *Centers for Disease Control and Prevention* (2016). Foram contadas as colônias características de *S.agalactiae*, com aspectos descritos pela Anvisa (2008): colônias lisas, pequenas, brilhantes, côncavas e em meio acrescido com 5% de hemácias de carneiro, as colônias são circundadas por um halo de β- hemólise. As placas que apresentaram contaminação por outro microrganismo foram descartadas. Os grupos sem inóculo foram igualmente plaqueados para verificar uma possível contaminação.

Para certificar de que se tratava da amostra de *S. agalactiae*, as colônias recuperadas dos órgãos dos animais foram submetidas aos testes de identificação bacteriana e tipagem capsular por PCR.

2.10 Histologia dos pulmões

Para os ensaios histológicos, foram utilizados apenas os pulmões dos camundongos. Após a eutanásia dos animais, os pulmões foram retirados com o auxílio de pinças e tesouras estéreis. Cada lado do pulmão foi colocado separadamente em tubos cônicos (15 mL) previamente identificados com os seguintes volumes de paraformaldeído 4%: 5 mL para os tubos contendo os pulmões (direito e esquerdo separados) e 10 mL para os tubos com o coração. Em todos os

tubos foi adicionada gaze estéril para que o órgão ficasse em contato direto com o paraformaldeído e foram reservados a 4°C até o processamento.

Para o processamento e microscopia dos pulmões foram utilizados os lóbulos médio e inferior dos lados esquerdo e direito do pulmão. Os lóbulos foram separados após a retirada do paraformaldeído em placas de petri com tampão PBS. Cada lóbulo cortado então foi inserido dentro de um cassete nomeado e estes foram lavados em água corrente por 1h, em álcool 70% por 1h, em álcool 90% por 1h, e mais duas lavagens em álcool 100% por 1h cada. Em seguida os cassetes foram submetidos a duas lavagens com xilol por meia hora cada e o material foi banhado na parafina por duas vezes, 40 minutos cada. Por último, foi realizada a inclusão definitiva em parafina e os cortes foram realizados com o auxílio de um micrótomo. Os cortes foram feitos com a espessura de 5µm e em seguida foram fixados à laminas de vidro. Para cada lado do pulmão foram feitas duas lâminas para coloração com hematoxilina e eosina (HE), duas lâminas para coloração tricrômio de Gomori e duas lâminas para coloração Weigert. As lâminas coradas foram analisadas em diferentes aumentos no microscópio óptico e fotografadas em 4x, 10x, 20x e 40x. Os itens a serem identificados foram quantificados utilizando o programa Image-ProPlus e os dados estatísticos foram obtidos utilizando o one-way ANOVA no GraphPad Prism e o pós teste Newman-Keuls.

2.10.1 Coloração hematoxilina e eosina (HE)

Essa coloração foi iniciada com os blocos colocados na estufa de 58°C durante 5 minutos e em seguida desparafinados e hidratados passando pelas etapas de lavagem com xilol 1, 2, 3, álcool 100%, álcool 90%, álcool 70% e água destilada por 2 minutos cada. O material foi então corado com hematoxilina por 3 minutos, lavado em água corrente por mais 3 minutos e corado com eosina por 7 minutos com posterior lavagem em água corrente por 2 minutos. O passo seguinte foi a desidratação com álcool 70%, 90%, 100%, xilol 4, 5 e 6 por 2 minutos cada e posterior diafanização. Por fim foram montadas as lâminas.

Nas imagens obtidas pelo microscópio os núcleos ficam corados de azul ou roxo enquanto o tecido conjuntivo, citoplasma e fibras extracelulares em geral ficam corados de vermelho ou rosa.

2.10.2 Coloração Tricrômio de Gomori

Para essa coloração os blocos foram inicialmente colocados na estufa de 58°C durante 5 minutos e em seguida desparafinados e hidratados passando novamente pelas etapas de lavagem com xilol 1, 2 e 3, álcool 100%, 90%, 70% e água destilada por 2 minutos cada. Os blocos foram corados com hematoxilina por 2 minutos e corados com o Gomori por 5 a 20 minutos. O material em seguida foi diferenciado em água ácida (solução de água destilada com ácido acético à 2%) durante 30 segundos e lavado em água destilada. Por fim os cortes foram desidratados e diafinizados passando pelo álcool 70%, 90%, 100%, xilol 4, 5 e 6 por 2 minutos cada. A última etapa foi a montagem das lâminas.

Nas imagens obtidas pelo microscópio o colágeno fica corado em azul/verde, as células epiteliais em vermelho e os núcleos são corados em roxo.

2.10.3 Coloração de Weigert

Também é conhecida como Resorcina Fucsina de Weigert sem oxidação. Inicialmente as lâminas foram colocadas na estufa de 58°C durante 5 minutos e em seguida foram desparafinadas e hidratadas passando pelas lavagens com xilol 1, 2 e 3, álcool 100%, 90%, 70% e água destilada por 2 minutos cada. O material foi corado com resorcina fucsina por 1 hora, lavado com álcool 90% por 30 segundos, com álcool 70% por 30 segundos e em água destilada por 30 segundos. Os cortes foram então desidratados e diafinizados passando pelo álcool 70%, 90%, 100%, xilol 4, 5 e 6 por 2 minutos em cada e as lâminas foram montadas.

Nas imagens obtidas pelo microscópio as fibras elásticas ficam coradas em marrom/preto enquanto as colágenas e o epitélio ficam com a coloração amarela.

2.11 Quantificação e análise estatística

A quantificação dos resultados referentes às colorações por hematoxilina e eosina, tricrômio de Gomori e Weigert foi realizada utilizando o programa ImagePro Plus. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o GraphPad Prisma, com o emprego do teste one-way ANOVA e o pós-teste Newman-Keuls.

3 RESULTADOS

3.1 Detecção de genes de fatores de virulência da amostra GBS90356

Os resultados da análise dos genes de virulência de *S. agalactiae* através da técnica de PCR convencional estão representados na **Tabela 1**. Os dados demonstraram que a amostra GBS90356 tipo capsular III apresenta todos os fatores analisados, com exceção de *PI-2a*.

Tabela 1 - Lista de genes de virulência da amostra GBS90356

Fatores de virulência da amostra GBS90356	
<i>Imb</i>	+
<i>gbs2018</i>	+
<i>PI-1</i>	+
<i>PI-2a</i>	-
<i>PI-2b</i>	+
<i>fbsA</i>	+
<i>fbsB</i>	+
<i>hylB</i>	+

(+) gene presente; (-) não apresentou o gene

3.2 Glicemia

A glicemia de todos os animais do estudo foi aferida: (i) antes dos experimentos; (ii) após a indução da diabetes e, (iii) no dia da eutanásia. Todas as aferições foram realizadas após seis horas de jejum (**Tabela 2**).

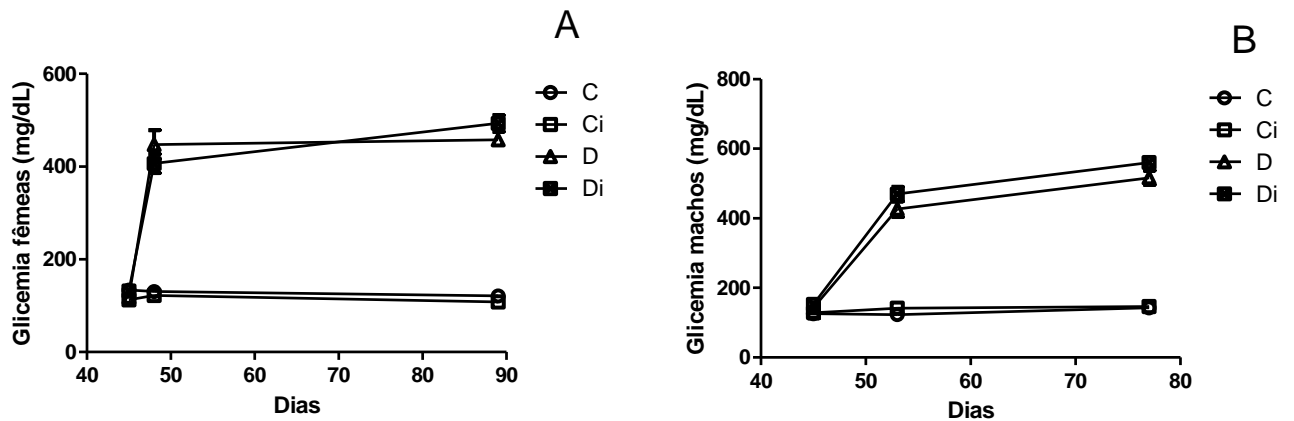
A totalidade dos animais (machos e fêmeas) utilizados no experimento foram considerados diabéticos, apresentando dosagem glicêmica acima de 200 mg/dL, conforme demonstrado na **Figura 2** e na **Tabela 2**. Os animais resistentes à insulina foram descartados.

Tabela 2 - Índices glicêmicos (mg/dL) dos camundongos machos e fêmeas utilizados no modelo experimental

<i>Taxa glicêmica (mg/dL)</i>								
<i>Machos</i>	PN45	PN49	PN77		Fêmeas	PN45	PN49	PN89
C1 ♂	132	152	132		C1 ♀	129	140	124
C2 ♂	110	141	149		C2 ♀	144	132	99
C3 ♂	109	89	159		C3 ♀	177	165	144
C4 ♂	152	111	128		C4 ♀	116	123	124
CI5 ♂	119	147	131		C5 ♀	101	97	104
CI6 ♂	127	160	132		C6 ♀	131	131	102
CI7 ♂	95	137	162		C7 ♀	129	124	127
CI8 ♂	173	122	160		C8 ♀	143	133	145
D9 ♂	148	447	555		CI9 ♀	123	134	118
D10 ♂	130	424	520		CI10 ♀	136	144	103
D11 ♂	146	470	532		CI11 ♀	119	135	88
D12 ♂	144	395	419		CI12 ♀	132	127	130
DI13 ♂	139	473	534		CI13 ♀	93	100	105
DI14 ♂	165	473	540		CI14 ♀	94	108	99
DI15 ♂	135	416	580		CI15 ♀	99	95	90
DI16 ♂	170	517	586		CI16 ♀	101	134	131
					D17 ♀	144	432	461
					D18 ♀	114	491	470
					D19 ♀	144	557	479
					D20 ♀	114	469	493
					D21 ♀	110	465	446
					D22 ♀	98	496	489
					D23 ♀	120	256	403
					D24 ♀	103	413	420
					DI25 ♀	145	411	409
					DI26 ♀	138	295	559
					DI27 ♀	155	469	542
					DI28 ♀	154	475	430
					DI29 ♀	127	306	426
					DI30 ♀	117	430	564
					DI31 ♀	104	417	490
					DI32 ♀	118	448	521
					DI33 ♀	143	359	506
					DI34 ♀	118	458	484

Legenda: C: Controle; CI: Controle infectado; D: Diabético; DI: Diabético infectado; PN: Pós-Natal.
Fonte: A autora, 2018.

Figura 2 - Aferição dos níveis de glicemia dos camundongos



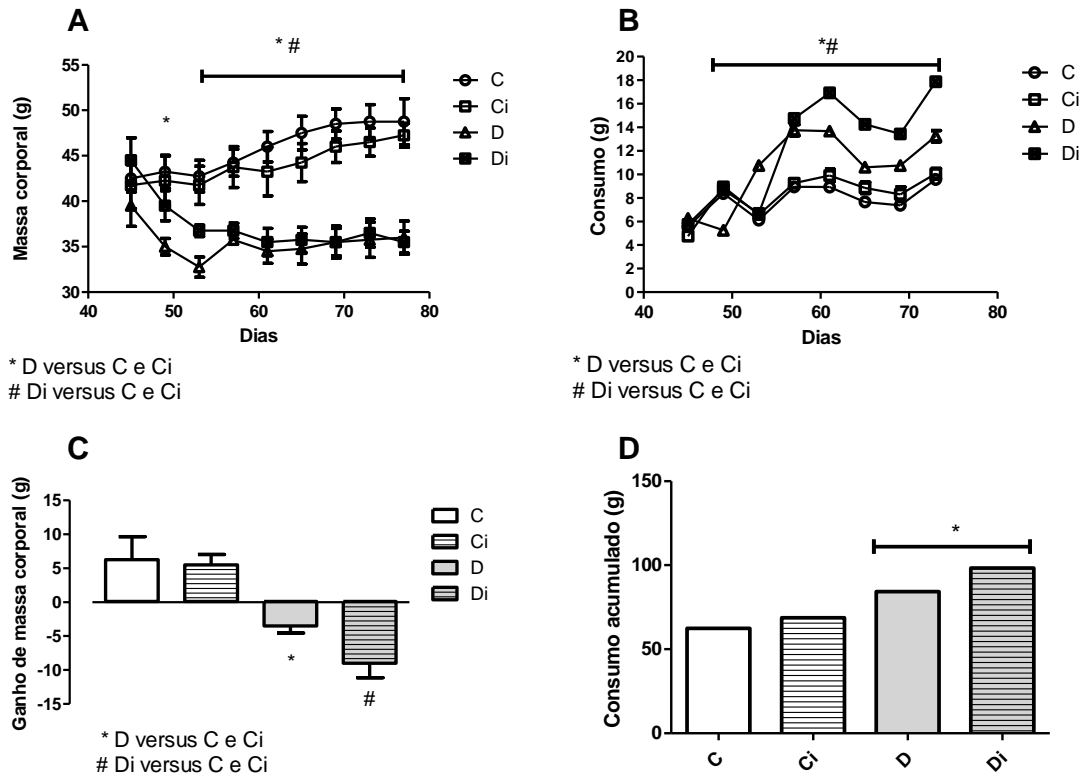
Legenda: (A) Glicemia das fêmeas nos dias 45, 47 e 89. (B) Glicemia dos machos nos dias 45, 47 e 77. C – controle; Ci – controle infectado; D – diabético; Di – diabético infectado.

3.2 Massa corporal e consumo alimentar

A massa corporal e o consumo alimentar foram monitorados durante todo o experimento a cada quatro dias. Como indicado na **Figura 3A** e **3C**, a partir de 49 dias pós-natal (PN49) os animais machos diabéticos passaram a apresentar uma redução significativa no peso em relação aos animais controle e controle infectado ($P < 0,0389$). Da mesma forma, a partir de PN53 os animais diabéticos infectados apresentaram redução no peso em relação aos animais controle e controle infectado ($P < 0,0017$). Ao final dos experimentos, ambos os grupos diabéticos tiveram massa corporal reduzida ($P < 0,0002$), enquanto os grupos controle tiveram aumento de massa corporal em comparação aos valores iniciais ($P < 0,0002$).

Durante todo o experimento o consumo alimentar entre os animais diabéticos foi superior aos demais grupos controle e controle infectado ($P < 0,0001$).

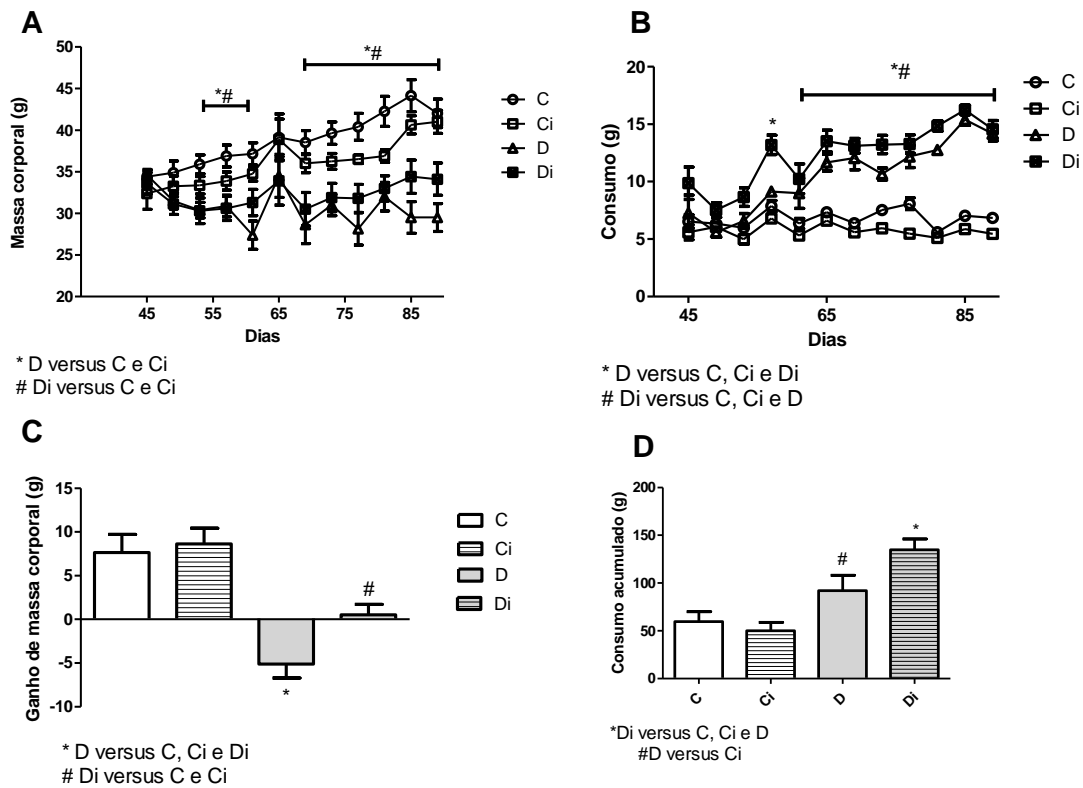
Figura 3 - Avaliação da massa corporal e consumo alimentício dos camundongos machos com três semanas de infecção



Legenda: (A) Massa corporal dos quatro grupos investigados em relação ao tempo de experimento; (B) Consumo alimentar dos animais diabéticos e diabéticos infectados; (C) Expressão do ganho/perda de massa corporal dos animais controle, controle infectado, diabéticos e diabéticos infectados (*# $P < 0,0009$); (D) Consumo acumulado durante todo o experimento pelos quatro grupos de animais estudados ($P < 0,0019$).

Em relação à massa corporal, as fêmeas apresentaram o mesmo padrão dos animais machos (**Figura 4A e 4C**). O consumo alimentar do grupo diabético mostrou-se superior aos demais em PN57 e PN65 até o final do estudo. Da mesma forma, o grupo diabético infectado apresentou um aumento significativo no consumo a partir de PN65 em relação aos grupos controle e controle infectado ($P < 0,0001$). Apesar da massa corporal reduzida em relação aos controles, houve um pequeno aumento de peso nos animais diabéticos infectados, enquanto no grupo apenas diabético houve perda de massa corporal.

Figura 4 - Avaliação da massa corporal e consumo alimentício dos camundongos fêmeas com cinco semanas de infecção



Legenda: (A) Massa corporal dos quatro grupos investigados em relação ao tempo de experimento, onde entre PN53 e PN61, e posteriormente a partir de PN69 há a redução do peso dos animais diabéticos e diabéticos infectados comparados ao controle e controle infectado ($P < 0.095$); (B) Consumo alimentar aumentado em PN57 nos animais diabéticos e a partir de PN65 nos animais diabéticos e diabéticos infectados; (C) Expressão do ganho de massa corporal dos animais controle, controle infectado e perda de massa corporal dos animais diabéticos e diabéticos infectados; (D) Consumo acumulado durante todo o experimento pelos quatro grupos. *# $P < 0,0001$.

3.3 Manifestação clínica da infecção por *S. agalactiae* em camundongos

Após cinco semanas de infecção, os camundongos machos e fêmeas do grupo diabético infectado apresentaram na região ilíaca injúrias na derme, como observado na **Figura 5**.

Figura 5 - Aparecimento de injúrias na derme dos camundongos diabéticos infectados



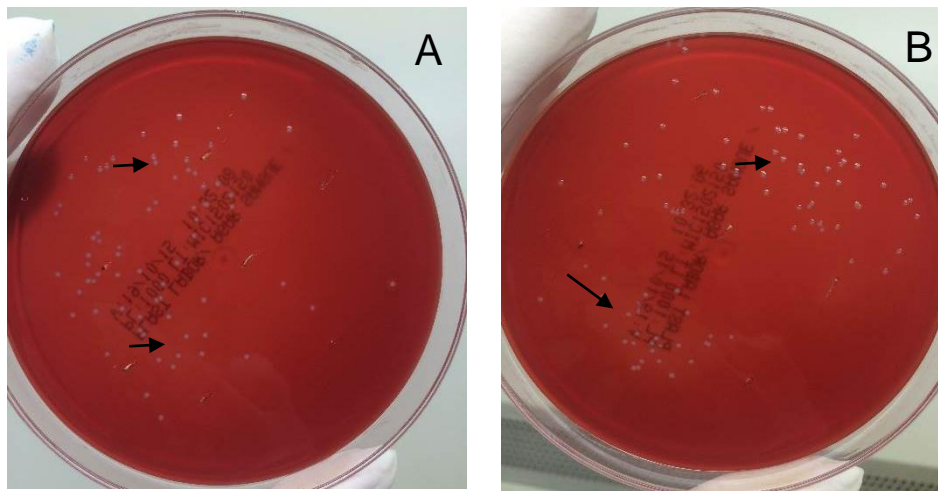
Legenda: Manifestação clínica causada pela infecção por *Streptococcus agalactiae* após cinco semanas em camundongos induzidos à diabetes.

3.4 Contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFC/mL)

A inoculação da amostra GBS90356 realizada por via intranasal obteve sucesso, e em todos os animais infectados houve crescimento em diferentes órgãos.

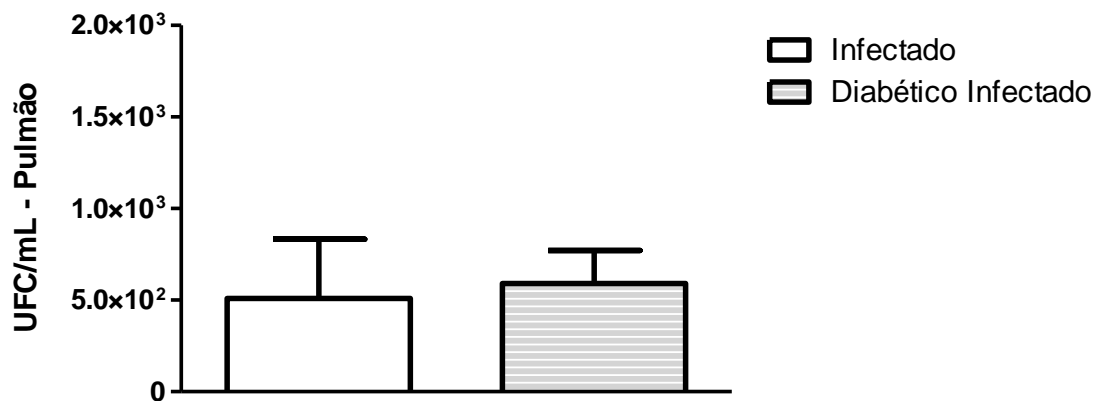
As contagens de unidades formadoras de colônia provenientes dos macerados pulmonares e cardíacos foram realizadas para determinar a efetividade da infecção intranasal e a capacidade de dispersão através da corrente sanguínea. Não houve crescimento bacteriano nos grupos sem inóculo bacteriano. Nos camundongos controle infectados e diabéticos infectados a diferença no número de bactérias viáveis não foi significativo, como demonstrado nas **Figuras 6 e 7**, após 3 e 5 semanas.

Figura 6 - Comparação do crescimento de *S. agalactiae* no pulmão de camundongo controle infectado e camundongo diabético infectado



Legenda: Crescimento bacteriano no pulmão exemplificado por dois maceramentos distintos da amostra GBS90356 em (A) camundongo infectado e (B) diabético infectado. Setas indicam colônias de *S. agalactiae*.

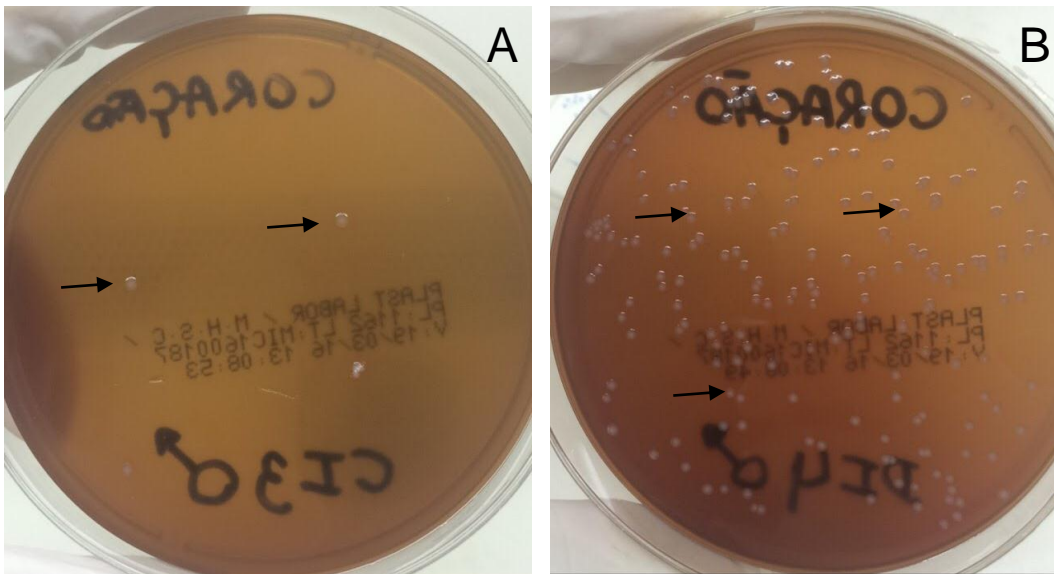
Figura 7 – Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) no pulmão dos animais infectados após cinco semanas de infecção



Legenda: Quantificação das unidades formadoras de colônia no pulmão de camundongos diabéticos infectados e controles infectados. Não houve diferença significativa entre os dois grupos.

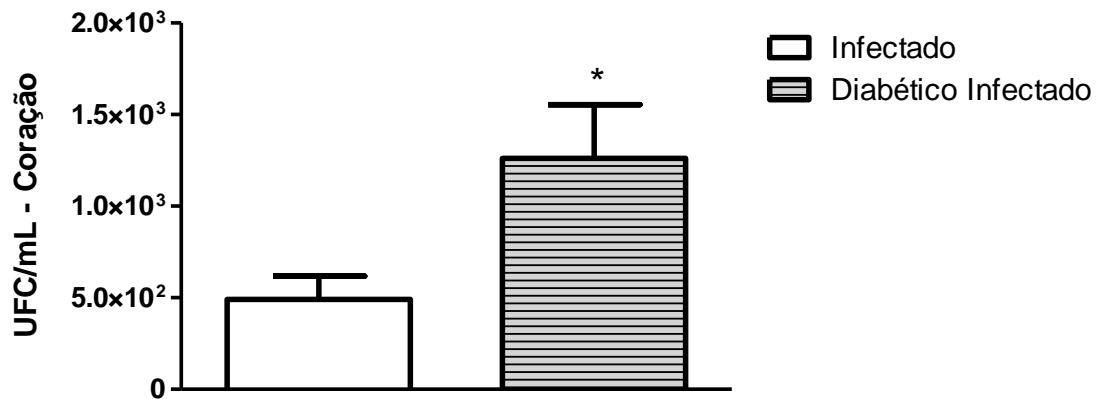
Contudo, a diferença na proliferação bacteriana foi estatisticamente significativa ($P < 0.05$) na contagem de UFC/mL no coração, como demonstrado nas **Figuras 8 e 9**. O grupo diabético infectado mostrou maior crescimento bacteriano ($1,26 \times 10^3$ UFC/mL) se comparado ao grupo controle infectado ($4,9 \times 10^2$ UFC/mL).

Figura 8 - Comparação do crescimento de *S. agalactiae* no coração de camundongos controle infectado e diabético infectado



Legenda: Crescimento bacteriano no coração exemplificado em dois maceramentos distintos da amostra GBS90356 em (A) camundongo infectado e (B) diabético infectado. Setas indicam colônias de *S. agalactiae*.

Figura 9 - Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) no coração de animais infectados e diabéticos infectados após cinco semanas



Legenda: Quantificação das unidades formadoras de colônia no coração de camundongos diabéticos infectados e controles infectados. Nos animais diabéticos houve um maior crescimento quando comparado aos animais controle infectados. $P < 0,05$

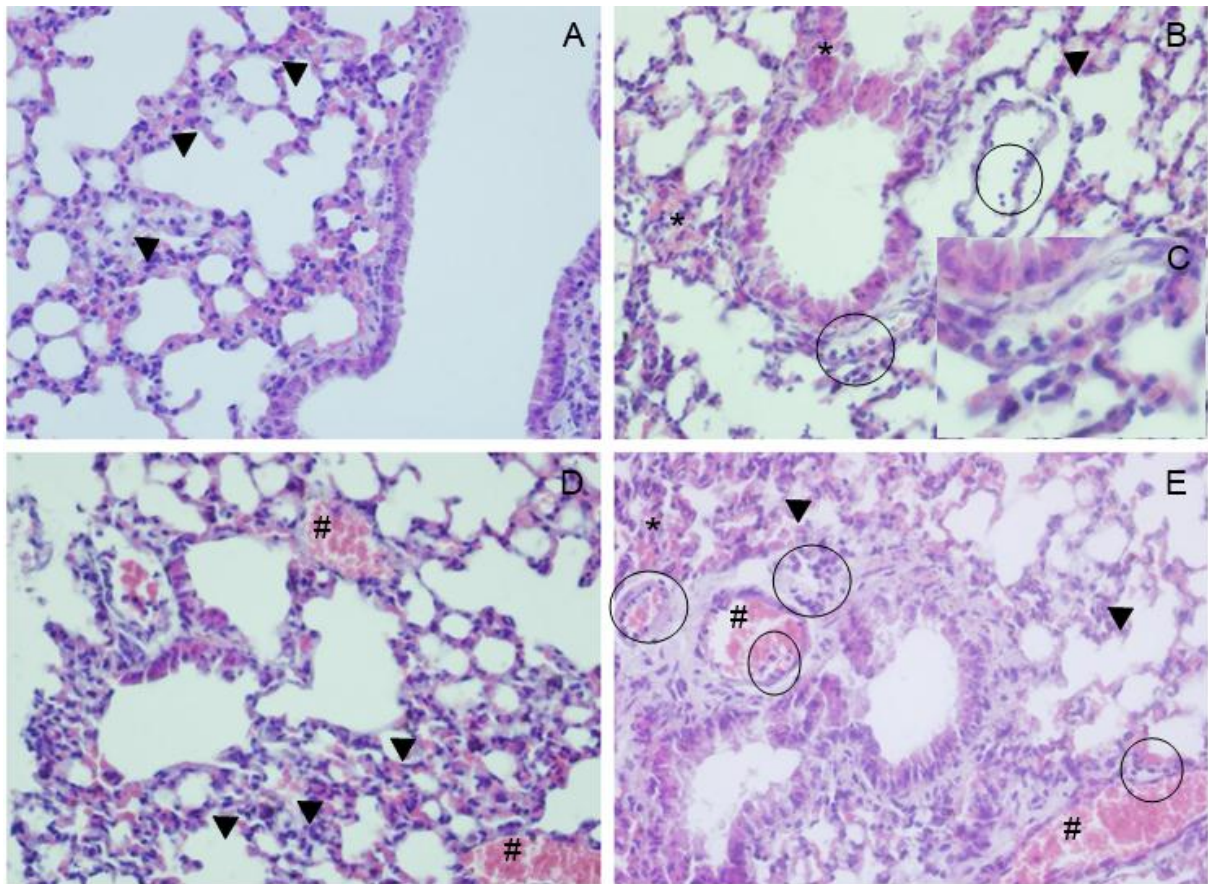
3.4 Coloração Hematoxilina e Eosina

A coloração por hematoxilina e eosina (HE) permite ter uma visão geral do órgão a ser estudado, ressaltando estruturas como os brônquios, bronquíolos, septos alveolares, vasos sanguíneos, pneumócitos e células sanguíneas.

Os parâmetros analisados a partir das imagens de HE foram baseados no trabalho de McAdams e colaboradores (2012): espessura alveolar, espessura epitelial, número de células inflamatórias, necrose, hemorragia, perda dos microvilos, colapso e casos congestos que são regiões nos septos alveolares com vasos ou capilares cheios de hemácias.

Como observamos nas **Figuras 10 A, B, C, D e E**, em nenhum dos grupos houve perda dos microvilos. Sinais de necrose foram identificados apenas em parte do grupo diabético infectado. Todos os grupos apresentaram casos de septos alveolares colapsados, com destaque para o grupo diabético infectado em que foi encontrada grande quantidade de septos alveolares arrebitados e com pontos de hemorragia alveolar. Casos congestos apresentando vasos e capilares com grandes quantidades de hemácias foram primordialmente visualizados no grupo diabético e diabético infectado, e em alguns poucos casos no grupo controle infectado.

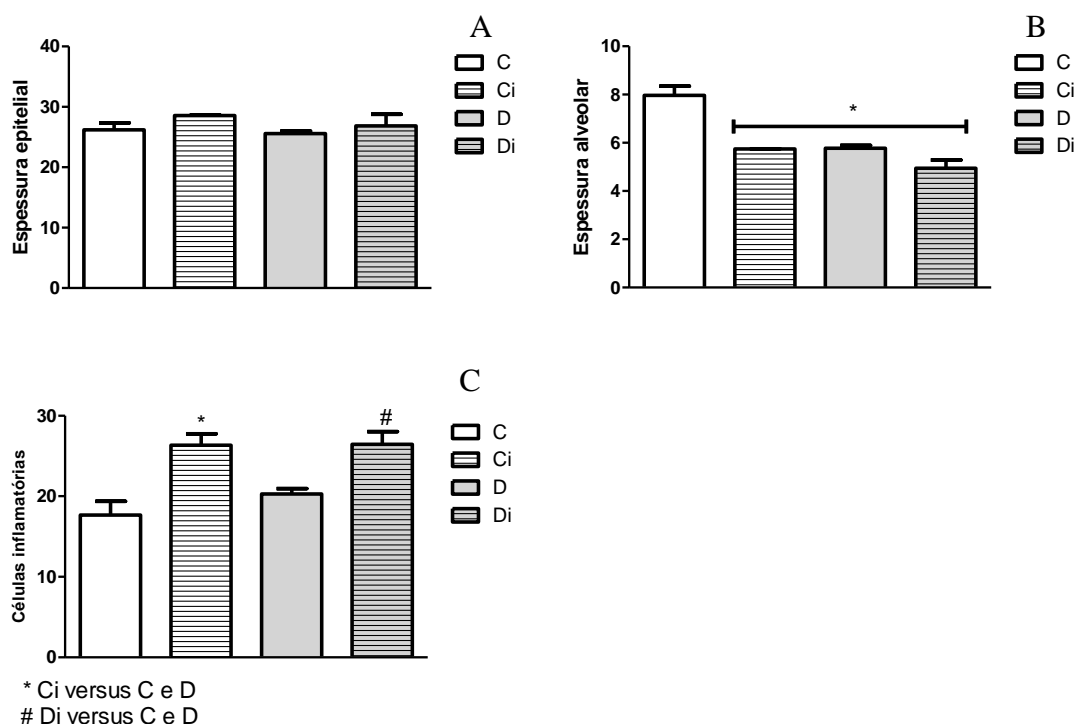
Figura 10 - Aspectos gerais do parênquima pulmonar dos animais infectados pela amostra GBS90356



Legenda: (A) Grupo controle, apresentando alguns septos alveolares colapsados (seta); (B) Grupo controle infectado com infiltrados de células inflamatórias em volta do bronquíolo e no vaso sanguíneo (círculo), alguns septos colapsados (seta) e um pequeno extravasamento de hemácias (*); (C) Imagem aumentada das células inflamatórias; (D) Grupo diabético com parte dos septos colapsados (seta) e casos congestos nos vasos (#); (E) Grupo diabético infectado apresentando casos congestos nos vasos (#) e células inflamatórias (círculo), parte dos septos colapsados (seta) e ruptura nos demais, com regiões de extravasamento de hemácias (*). Aumento de 40x.

A espessura epitelial em todos os grupos não apresentou diferença, enquanto a espessura alveolar mostrou-se reduzida em todos os grupos (controle infectado, diabético e diabético infectado) em relação ao controle ($P < 0,0001$) como demonstrado na **Figura 11A e B**. O infiltrado de células inflamatórias, após contagem semi-qualitativa, foi maior nos grupos controle infectado e diabético infectado em relação ao grupo controle e diabético (Figura 11C; $P < 0,0007$).

Figura 11 - Quantificação de espessura epitelial, alveolar e número de células inflamatórias nos camundongos infectados ou não por *S. agalactiae*

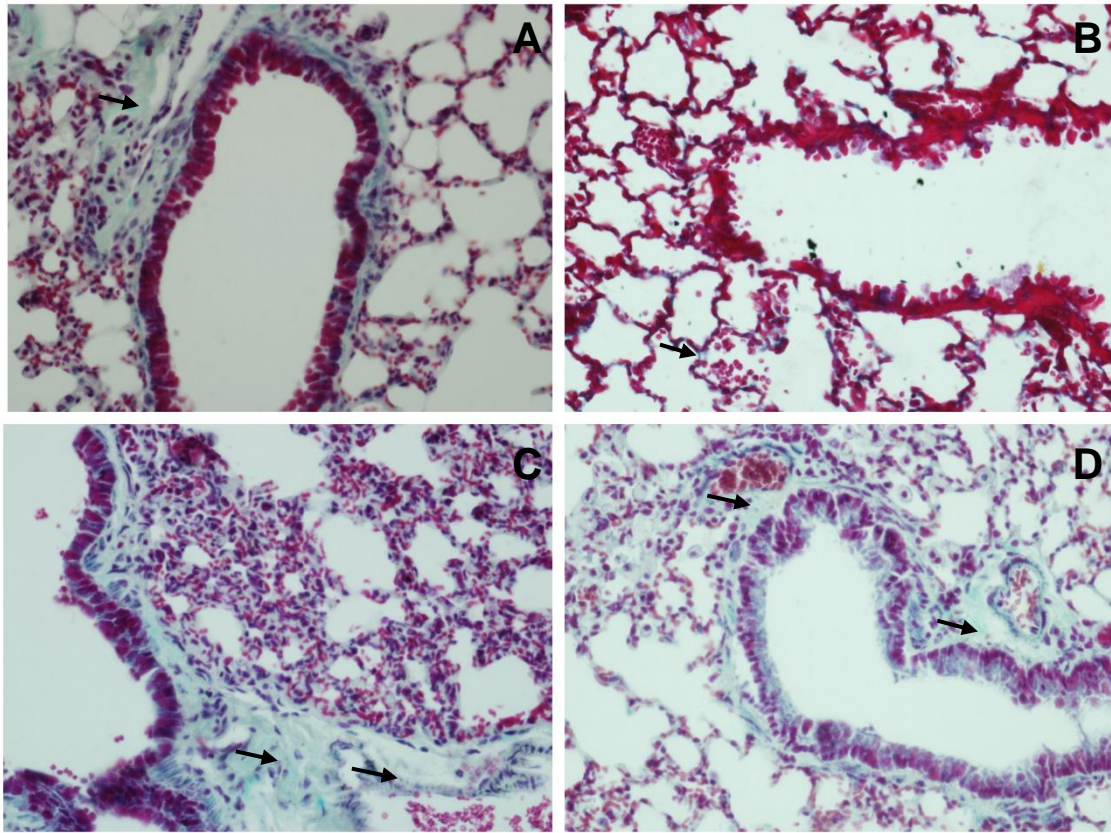


Legenda: (A) Quantificação da espessura epitelial pulmonar; (B) Quantificação da espessura alveolar pulmonar, reduzida em todos os grupos em comparação ao controle; (C) Contagem semi-qualitativa das células inflamatórias pulmonares, com aumento nos grupos controle infectado e diabético infectado quando comparados ao controle e diabético.

3.5 Coloração Tricrômico de Gomori

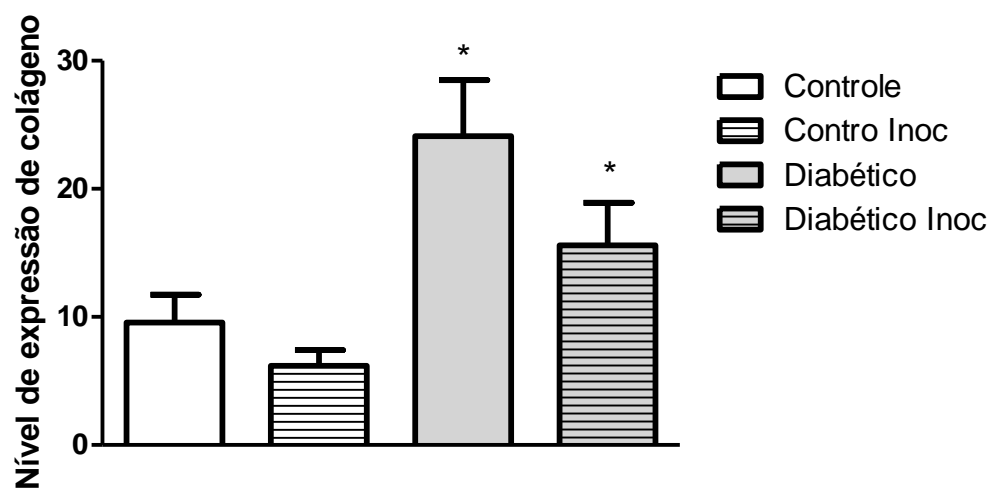
A coloração tricrômico de Gomori é utilizada em imagens histológicas para detectar fibras de colágeno e deposição de colágeno em modelo murino. As imagens mostraram que após a infecção bacteriana houve uma diminuição da deposição de colágeno no parênquima pulmonar e nas áreas subjacentes aos vasos sanguíneos, bronquíolos e brônquios, porém não foi considerada significativa. Contudo, no modelo diabético a quantificação das fibras colágenas foi maior do que no grupo controle. No grupo diabético infectado, a quantificação indica que a infecção por *S. agalactiae* é capaz de produzir níveis de colágeno superiores ao controle, como demonstrado na **Figura 12**.

Figura 12 – Síntese e deposição de fibras de colágeno no parênquima pulmonar



Legenda: Deposição de fibras de colágeno no parênquima e áreas subjacentes aos vasos sanguíneos, brônquios e bronquíolos pulmonares. (A) Controle; (B) Controle Infectado; (C) Diabético; (D) Diabético Infectado. As fibras de colágeno estão coradas em azul/verde (→), e os demais (itens) estão corados em vermelho/roxo. Quantificação realizada utilizando o programa ImagePro Plus. Aumento de 40x.

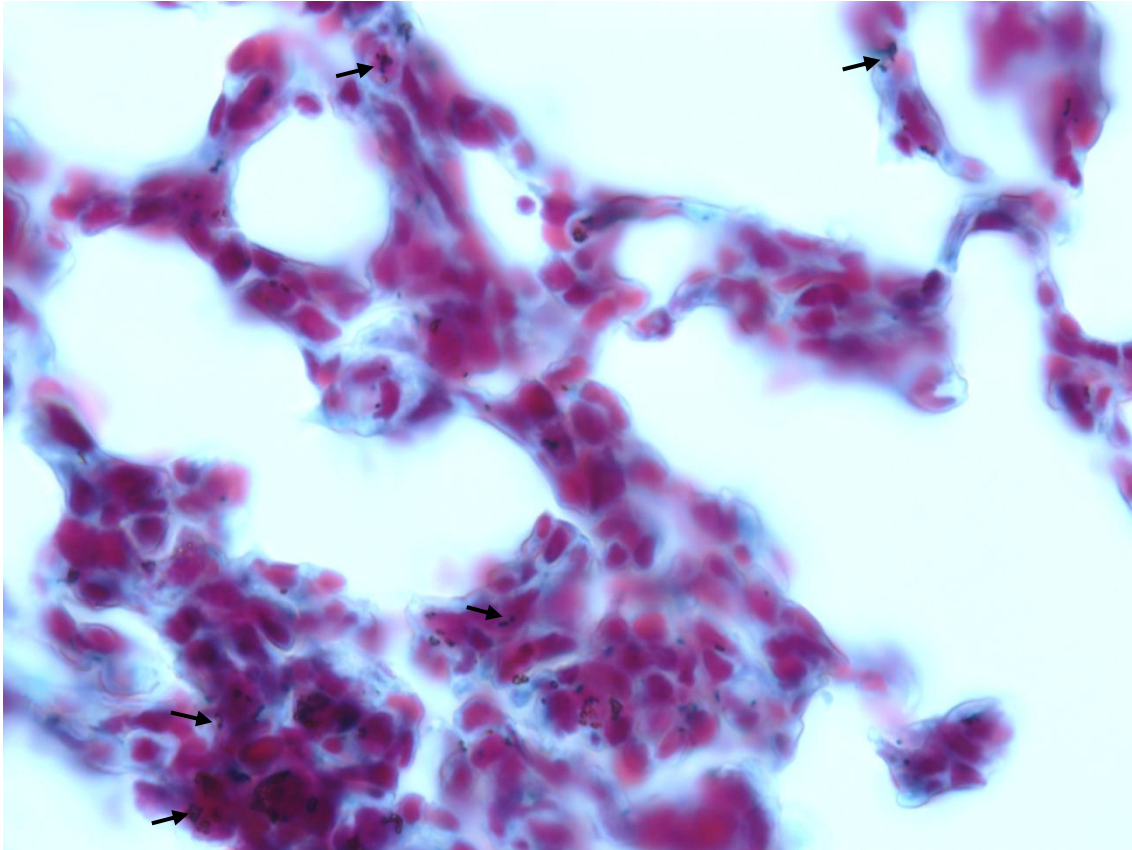
Figura 13 – Quantificação da expressão de colágeno nos diferentes grupos de estudo no parênquima pulmonar



Legenda: Níveis de expressão e deposição de colágeno no pulmão dos camundongos. Houve um aumento significativo nos grupos diabético e diabético infectado em relação ao grupo controle e controle inoculado. $P < 0,0037$.

Colônias de *Streptococcus agalactiae* foram localizadas nos alvéolos pulmonares, através da coloração de tricrômico de Gomori, comprovando a eficácia da infecção (**Figura 14**).

Figura 14 - Colônias de *S. agalactiae* em septos alveolares do pulmão

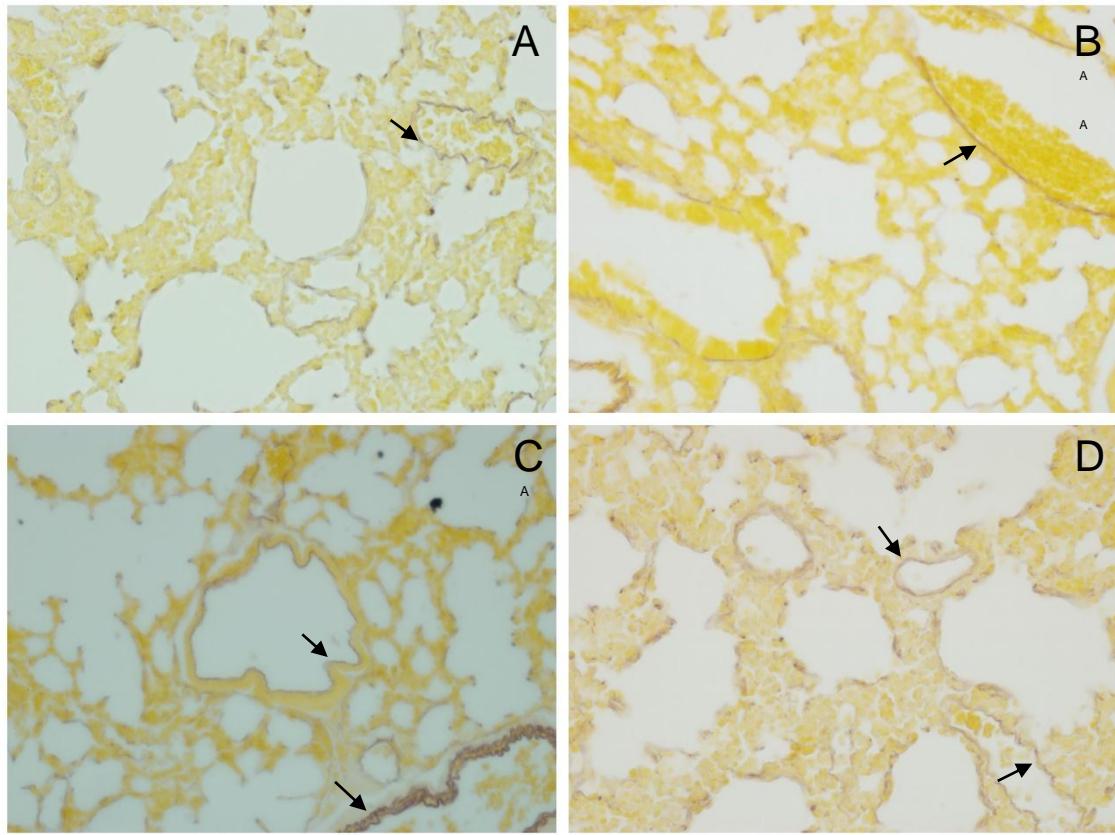


Legenda: Presença de *Streptococcus agalactiae* (setas) em meio as células alveolares coradas em vermelho. Aumento de 100x.

3.6 Coloração de Weigert

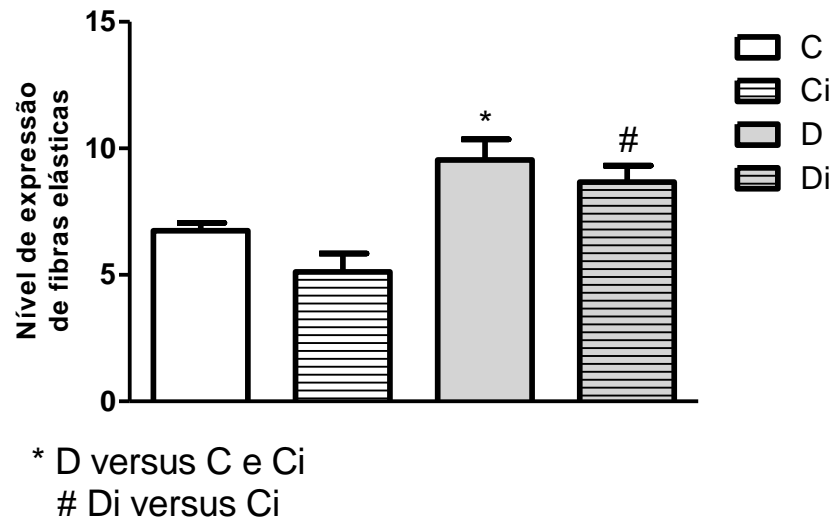
A coloração de Weigert sem oxidação é utilizada em imagens histológicas para detectar fibras elásticas. Apesar de não haver diferença significativa na quantificação de fibras elásticas dos animais infectados, os animais dos grupos diabético e diabético infectado tiveram uma expressão superior em relação aos controles, como observamos nas **Figuras 15 e 16**.

Figura 15 - Deposição de fibras elásticas no parênquima pulmonar



Legenda: Expressão e deposição de fibras elásticas no parênquima e áreas subjacentes aos vasos sanguíneos, brônquios e bronquíolos pulmonares. (A) Controle; (B) Controle Infectado; (C) Diabético; (D) Diabético Infectado. As fibras de colágeno estão coradas em marrom (→), e os demais (itens) estão corados em amarelo. Quantificação realizada utilizando o programa ImagePro Plus. Aumento de 40x.

Figura 16 - Quantificação da expressão de fibras elásticas nos diferentes grupos de estudo no parênquima pulmonar



Legenda: Níveis de expressão de fibras elásticas no pulmão dos camundongos. Houve um aumento significativo nos grupos diabético em relação ao controle e controle infectado, e no grupo diabético infectado em relação ao controle infectado. $P < 0,0009$.

4 DISCUSSÃO

Apesar das melhorias na profilaxia neonatal e do tratamento de *Streptococcus agalactiae* (Scharg, Zywicki, Farley, 2000), a taxa de doenças invasivas causadas por esse patógeno em adultos com doenças crônicas (principalmente diabetes mellitus) tem aumentado significativamente. Entre os anos 1990 e 2000 o número de casos reportados aumentou de 4,1 para 7,2 a cada 100.000 adultos não-grávidos (Farley, Harvey, Stull, 1993; Munoz et al., 1997; Farley, 2001).

Os *S. agalactiae* possuem inúmeros mecanismos que contribuem para patogenicidade e virulência (Farley, 2001). Sua capacidade de sobrevivência e multiplicação no hospedeiro requer a expressão e regulação de múltiplos fatores de virulência (Lione et al., 2014; Korir et al., 2014) que contribuem para a capacidade da bactéria em aderir, invadir e induzir apoptose ou necrose em células hospedeiras. A caracterização desses fatores é primordial para melhor compreensão da patogenicidade deste microrganismo.

Os dados obtidos através da detecção de genes de virulência demonstraram que a amostra utilizada neste estudo, GBS90356, apresentou amplificação para os diferentes genes pesquisados: *lmb*; *gbs2018* (ST-17); *PI-1*; *PI-2b*; *fbsA*; *fbsB* e *hylB*, exceto *PI-2a*. De acordo com a literatura, a presença desses fatores de virulência evidencia a alta patogenicidade dessa amostra.

S. agalactiae se liga a proteínas de matriz extracelular como a fibronectina e a laminina. Vários estudos demonstraram a capacidade de ligação de *S. agalactiae* ao fibrinogênio (Fbg) a partir do isolamento do gene *fbsA* (Lammler, Chhatwal, Blobel, 1983; Schubert et al., 2012). Pietrocola e colaboradores (2004) demonstraram que amostras mutantes para *fbsA* perdem a capacidade de se ligar ao Fbg ou de induzir a agregação de plaquetas quando comparada à amostra não-mutada. Da mesma forma, Gutekunst, Eikmanns e Reinscheid descreveram em 2004 uma segunda proteína ligante ao fibrinogênio, codificada pelo gene *fbsB*. Ambos os genes foram identificados na amostra utilizada no presente estudo.

Além disso, a presença da lipoproteína Lmb na superfície do *S. agalactiae* medeia a adesão do patógeno à laminina humana. Estudos demonstraram que *S. agalactiae* foi capaz de danificar o epitélio pulmonar (Nizet et al., 1996), a partir da exposição de estruturas da matriz extracelular. Quando comparadas com cepas

selvagens, amostras mutantes de *S. agalactiae* (Δ *lmb*) obtiveram uma menor taxa de adesão à laminina placentar humana imobilizada, indicando que a *Lmb* está diretamente relacionada à capacidade invasiva do *S. agalactiae* em neonatos (Spellerberg et al., 1999).

Com relação à linhagem genética, os resultados mostraram que a amostra GBS90356 apresenta o gene *gbs2018* (ST-17), associado com a maior invasividade (Hoshina et al., 2002). Estudos realizados pela técnica MLST revelaram que a sequência ST-17 define um clone "altamente virulento", presente em sua maioria no tipo capsular III, fortemente associado com infecções invasivas neonatais (Lamy et al., 2006). Dados do nosso grupo relatam que a amostra GBS90356/III isolada de líquido apresenta elevada capacidade invasiva em diferentes tipos celulares (Costa et al., 2011; Soares et al., 2013), corroborando com dados de outros pesquisadores de que amostras do tipo III ST-17 positiva manifestam uma maior capacidade de virulência.

Estruturas de pilus foram descritas em alguns patógenos Gram-positivos, porém sua conformação, síntese e função ainda não são bem descritas (Rosini et al., 2006). Segundo Springman e colaboradores (2014), as amostras de origem humana apresentam a ilha *pilus* 1 em combinação com um dos variantes de PI-2 (a ou b), o que foi confirmado por PCR na amostra GBS90356 utilizada neste trabalho.

A presença do gene *hylB* na amostra GBS90356 é responsável por codificar a protease hialuronidase. Amostras mutantes de *S. agalactiae* com atividade de hialuronidase ausente foram menos virulentas (Yildirim, Fink, Lämmner, 2002). Em tilápias, a presença do gene *hylB* mostrou uma maior virulência do patógeno, assim como o rápido aparecimento de sinais clínicos como áreas de hemorragia difusas envolta da boca, exofitalmia, cérebro, fígado e baço congestionados e melanose (Godoy et al., 2013).

Sendo uma desordem metabólica que afeta mais de 180 milhões de pessoas no mundo (Johargy, 2016), a diabetes mellitus é um importante alvo de estudo com o intuito de controlar sua dispersão e tratar suas complicações. Em pacientes diabéticos, o aumento da susceptibilidade às infecções bacterianas tem sido atribuído a diversos fatores de risco como anormalidades vasculares, nefropatia, neuropatia, obesidade, além de alterações na resposta imune inata e humoral (Rajagolapan, 2005; Johargy, 2016).

Mesmo a diabetes sendo a doença mais associada à infecção por *S. agalactiae*, poucos são os trabalhos de interações do patógeno com modelos diabéticos. O primeiro trabalho, de Edwards e Fuselier (1983), descreveu a maior susceptibilidade de animais diabéticos à infecção por *S. agalactiae*, associada à bacteremia prolongada e sequestro persistente de organismos no sistema reticuloendotelial visceral. Em 2015, Alves e colaboradores utilizaram o modelo diabético para testar uma vacina que tem como alvo uma enzima glicolítica da superfície bacteriana, demonstrando menor colonização após imunização nos órgãos analisados (cérebro, coração, sangue e fígado). Recentemente, Koga e colaboradores (2017) reportaram infecções espontâneas durante 6 anos em modelo animal de diabetes do tipo 2, camundongos KK-Ay e identificaram inflamação renal e exudato no útero.

Em diabéticos a perda de massa corporal já é bem estabelecida, decorrente da insuficiência de insulina. As células do corpo tornam-se incapazes de obter glicose e utilizam outros substratos como proteínas e gordura como fontes de energia (American Diabetes Association, 2011). A associação entre infecções bacterianas e diabetes é capaz de exacerbar essa perda de peso através da alteração do equilíbrio metabólico-endócrino do hospedeiro (Rayfield et al., 1982). Nossos resultados utilizando camundongos machos com três semanas de infecção e fêmeas com cinco semanas de infecção corroboram essa informação.

O modelo de infecção escolhido no presente estudo, simula uma das vias naturais utilizada pelo patógeno, onde no momento do nascimento via parto normal o bebê pode aspirar o líquido amniótico contaminado. Após a inoculação intranasal, o *S. agalactiae* foi capaz de se estabelecer no pulmão e alcançar outros órgãos através da corrente sanguínea, demonstrando a eficácia do modelo de inoculação intranasal implantado em nosso laboratório. Estudo realizado por Marcusso (2014) com tilápias, demonstrou a presença de colônias bacterianas em regiões como fígado, baço, rins e cérebro. As bactérias foram capazes de causar necrose local, invadir e se multiplicar dentro de fagócitos e se disseminar para vários órgãos, inclusive com transposição da barreira hemato-encefálica.

Mesmo após cinco semanas de infecção, a contagem bacteriana (UFC/mL) demonstrou a persistência do *S. agalactiae* no pulmão e no coração dos camundongos. Outros órgãos como cérebro, fígado e baço não foram analisados neste projeto. O *S. agalactiae* é considerado o principal agente etiológico da

meningoencefalite em teleósteos (Eldar et al., 1994; Evans et al., 2006). Em humanos é um dos maiores causadores de meningite em recém nascidos e em adultos com doenças crônicas, representando entre 0,3% a 4,3% dos casos reportados (Oyanguren et al., 2015; Khan, 2016). Dados previamente publicados verificaram que o fígado de tilápias infectadas por *S. agalactiae* ficou congestionado com necrose focal e os rins com hemorragia e nefrite intersticiais (Zamri-Saad et al., 2010). Esses dados corroboram a necessidade de continuidade do trabalho para posterior análise dos demais órgãos-alvo.

Apesar de pacientes com diabetes mellitus apresentarem uma maior susceptibilidade às infecções bacterianas, geralmente associadas com anormalidades das funções dos fagócitos e na quimiotaxia de leucócitos (Geerlings, Hoepelman, 1999; Rajagolapan, 2005), neste trabalho não houve diferença significativa quanto ao número de bactérias viáveis encontradas no pulmão dos animais diabéticos se comparados aos animais controle infectados. Contudo, no coração a quantidade de bactérias foi considerado significativo nos animais diabéticos em relação aos animais controle.

Segundo Orihuela e colaboradores (2003), a capacidade da amostra em desenvolver preferencialmente doenças como sepse, pneumonia ou meningite, proliferando-se mais em um órgão do que em outro, está relacionada com a combinação dos fatores de virulência, incluindo o tipo capsular, que cada amostra expressa. Para dar suporte a essa afirmação, estudos utilizando mutagênese sítio-dirigida (*In Vivo Expression Technology* [IVET]) e análises de indução a partir do diferencial de fluorescência de *S. pneumoniae* demonstraram que enquanto um painel de genes principal é expresso em um local anatômico como nasofaringe, um segundo subconjunto pode ser expresso em outros locais como pulmões e sangue. As diferentes amostras possuem apenas determinados conjuntos de genes que permitem causar distintas formas de doenças (Polissi et al., 1998; Hava et al., 2002; Marra et al., 2002; Orihuela et al., 2003). Todavia, estudos mais aprofundados precisam ser desenvolvidos para melhor compreensão da relação entre os fatores de virulência e o desenvolvimento de doenças específicas, inclusive em *S. agalactiae*.

Análises histológicas são extremamente relevantes para obter uma apreciação geral de diversos órgãos após infecções bacterianas, inclusive daqueles que não apresentam alterações macroscópicas. A partir do estudo histopatológico

obtemos o detalhamento das modificações causadas por um patógeno dentro de determinado órgão, o que é capaz de diagnosticar doenças e auxiliar no tratamento com maior precisão.

Durante a pneumonia bacteriana aguda é observada a redução da defesa alveolar, e condições como a diabetes são capazes de alterar a função dos macrófagos. Além disso, em imagens histológicas são observadas congestões e edemas com acúmulo de secreções (Nascimento, 2013). Em nossos resultados encontramos no modelo diabético infectado uma série de casos congestos, indicando um possível quadro de pneumonia.

Em modelo de infecção por *S. agalactiae* após 3 h e 24 h realizado por Kline e colaboradores (2011) foi feita a análise histológica dos rins e bexiga dos camundongos, onde nas imagens de HE (hematoxilina e eosina) foram observados polimorfonucleares, monócitos e linfócitos. Nos controles tratados com PBS não houveram indicativos de infecção. Apesar da diferença nos tempos de infecção, no presente estudo foi igualmente observado uma quantidade superior de polimorfonucleares (a maioria macrófagos) e linfócitos nos pulmões dos animais infectados.

Análises histopatológicas de infecções severas geralmente incluem a presença de neutrófilos nos alvéolos, contudo, existem alguns relatos de caso na literatura de pneumonias atípicas causadas por *Streptococcus pyogenes* com um número relativamente pequeno de neutrófilos (Brusch & Mark, 1996; Tajiri et al., 2008). Da mesma forma, foram observados poucos neutrófilos em regiões alveolares em nosso trabalho. Uma das teorias para esse resultado é o tempo longo de infecção, onde a inflamação após cinco semanas estaria sendo mediada por linfócitos e não mais por neutrófilos que são os primeiros a combater o patógeno. Estudos mais aprofundados são necessários para quantificar cada tipo de célula inflamatória e compreender melhor a ação de cada uma delas.

Diferenças histológicas nos pulmões de camundongos, como as observadas em nosso estudo, incluindo o acúmulo de células inflamatórias, espessamento ou ruptura das paredes teciduais e exsudação de fibrina ou hemorragia podem ser indícios precursores de displasias broncopulmonares. Em recém-nascidos prematuros contaminados com *S. agalactiae* esses mesmos quadros clínicos são observados (McAdams et al., 2012; Coalson, 2006). Em modelo de sepse onde *S. pyogenes* foi inoculado intraperitonealmente, as imagens histopatológicas

mostraram severa hemorragia, inchaço alveolar e depósito de fibrina (Oehmcke et al., 2009).

Laith e colaboradores (2017) realizaram um estudo analisando histopatologicamente órgãos de tilápia (*Oreochromis niloticus*) e observaram indícios de meningite, como infiltrado de células inflamatórias e vasos sanguíneos congestionados no cérebro, e sinais de degeneração neuronal. Além disso, verificaram trombose e congestão de vasos sanguíneos no fígado. Estudos posteriores utilizando esses órgãos em camundongos são necessários para avaliar se em modelo murino a infecção causada por *S. agalactiae* se mantém similar.

O colágeno é a proteína mais abundante nos mamíferos e o principal componente protéico de tecidos conjuntivos (Bornstein, Traub, 1979). O metabolismo defeituoso do colágeno na diabetes mellitus resulta em sua acumulação no decorrer dos anos. Apesar disso, em um modelo de diabetes induzida em ratos, desenvolvido por Spanheimer, Umpierrez e Stumpf (1988), a quantificação das fibras de colágeno nos ossos e cartilagens foi relativamente menor (cerca de 52%) nos animais diabéticos do que nos animais controle. Eles verificaram que quanto maior o nível de glicose (mg/dL), menor se tornava a produção de colágeno.

Caskey e colaboradores (2014) verificaram que ao final da lesão em camundongos diabéticos a produção de colágeno é significativamente aumentada, contudo no início da lesão há um decaimento nas fibras colágenas. Essa produção desregulada de colágeno durante injúrias sugere que esse é o fator que contribui para o desenvolvimento de lesões crônicas em diabéticos. Os dados obtidos neste trabalho através da quantificação das fibras colágenas coradas por Tricromio de Gomori, demonstraram acúmulo de colágeno nos animais diabéticos após cinco semanas de infecção com *S. agalactiae*.

Nos últimos anos uma série de microrganismos, em sua grande maioria patogênica em humanos, tem sido reportada como produtores de enzimas capazes de degradar o colágeno (Harrington, 1996). Em alguns casos específicas doenças associadas a esses organismos são capazes de degradar macromoléculas, incluindo o colágeno, nos tecidos do hospedeiro. Dessa forma, a produção de enzimas que degradam o colágeno pode ser um importante fator na etiologia dessas doenças. A amostra de *S. agalactiae* GBS90356 é produtora de colagenase, conforme descrito previamente pelo nosso grupo de pesquisa (Santos et al., 2003).

Proteases produzidas por *Pseudomonas aeruginosa* têm sido relacionadas à sua patogênese em uma série de desordens pulmonares. A inoculação de camundongos com colagenase purificada de *P. aeruginosa* resultou em hemorragia pulmonar e necrose nos pulmões (Diener, Carrick, Berk, 1973). Contudo, Gray e Kreger (1975) sugeriram que a perda ou alteração do colágeno alveolar de coelhos não foi observada após administração intratraqueal de proteases provenientes de *P. aeruginosa*.

Segundo Jackson e colaboradores (1994), enzimas colagenolíticas produzidas por *S. agalactiae* podem ser importantes na degradação das fibras de colágeno amnióticas, o que leva à ruptura prematura das membranas e posterior infecção de neonatos a partir da cavidade amniótica. *S. agalactiae* produz uma enzima específica capaz de hidrolisar fibras de colágeno amnióticas e o peptídeo sintético FALGPA (2-furanacryloyl-Leu-Gly-Pro-Ala).

A capacidade colagenolítica de *S. agalactiae* foi parcialmente confirmada por esse estudo, pois foi possível observar que o grupo controle inoculado foi o que menos expressou colágeno comparado aos demais grupos. Contudo, na quantificação realizada observamos que não houve diferença significativa entre o grupo infectado e o grupo controle. Uma possível explicação para esse resultado é o acesso do *S. agalactiae* ao colágeno. Nas imagens obtidas por HE observamos que a bactéria estava entre os alvéolos, e as regiões com mais presença de colágeno são no entorno dos brônquios, bronquíolos e vasos sanguíneos. A infecção no grupo diabético demonstrou que a capacidade de produzir colágeno é parcialmente reestabelecida, aumentando significativamente em relação aos grupos controle e controle inoculado.

Alguns estudos indicaram que deformações nos septos alveolares decorrentes da diminuição da elastase nos pulmões imaturos estão ligadas a presença de displasias bronco-alveolares (BPD) em recém-nascidos e bebês. Os pulmões de prematuros contêm um número reduzido de alvéolos e os septos a se desenvolver são dependentes do tecido conectivo, particularmente das fibras elásticas. A destruição elastolítica desse tecido conectivo durante o desenvolvimento pode contribuir para modificações crônicas em BPD, particularmente na defasagem do crescimento pulmonar (Bruce et al., 1992).

A insulina é capaz de modular as respostas inflamatórias e de reparo da elastase, promovendo o reparo e remodelamento tecidual. Num estudo realizado

com ratos induzidos à diabetes (Petta et al., 2011), foi observado 42% de redução no número de neutrófilos, 20% de aumento no diâmetro alveolar e 33% de diminuição da densidade de fibras elásticas nos septos alveolares. O tratamento com insulina foi capaz de restaurar o número de neutrófilos, a espessura dos alvéolos e a quantidade de fibras elásticas, se equiparando com o controle não-diabético. Em contrapartida, nosso modelo diabético demonstrou uma maior expressão de fibras colágenas, em associação com a maior expressão de fibras de colágeno. Uma possível explicação dada por Caskey et al. (2014) está relacionada ao processo de finalização da inflamação após injúrias como infecções bacterianas, onde as fibras elásticas e de colágeno aumentam sua expressão para o reparo tecidual.

Diante do exposto, nosso trabalho evidenciou que o modelo de inoculação intranasal mostrou-se adequado para análise do processo de infecção. Este estudo demonstrou também o papel da diabetes mellitus no processo de infecção por *S. agalactiae*, principalmente durante a disseminação do patógeno para a região cardíaca. Além disso, estes dados contribuíram para o melhor entendimento, a nível histológico, da patogênese ocasionada por *S. agalactiae*, podendo auxiliar em novas estratégias terapêuticas, profiláticas e novos alvos para terapia.

CONCLUSÃO

De acordo com os resultados apresentados podemos concluir que:

- a) A amostra GBS90356 tipo capsular III apresentou os seguintes genes de virulência: *lmb*, *gbs2018*, *PI-1*, *PI-2b*, *fbsA*, *fbsB* e *hylB*, com exceção apenas do gene *PI-1a*;
- b) A via de infecção intranasal foi bem sucedida, possibilitando a disseminação bacteriana nos animais;
- c) Ambos os grupos diabéticos (infectado ou não) apresentaram perda de massa corporal e aumento de consumo alimentar se comparados aos demais grupos controle;
- d) A disseminação bacteriana alcançou órgãos como pulmão e coração;
- e) O número de unidades formadoras de colônias do pulmão se manteve similar nos grupos controle infectado e diabético infectado, enquanto no coração o número de colônias viáveis foi superior no grupo diabético infectado;
- f) Todos os grupos apresentaram casos de septos colapsados;
- g) O grupo diabético infectado apresentou pontos de hemorragia e ruptura de septos alveolares;
- h) Foram observados casos congestos, principalmente nos grupos diabéticos;
- i) Os grupos diabético e diabético infectado apresentaram maiores níveis de fibras de colágeno e fibras elásticas no parênquima pulmonar.

REFERÊNCIAS

- Abbas, A. K.; Lichtman, A. H.; Pillai, S. H. I. V. *Imunologia celular e molecular*. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.
- Aires, M. M. – *Fisiologia*. 3a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. v. 1. 1232 p.
- Agarwal, V., Kuchipudi, A., Fulde, M., Riesbeck, K., Bergmann, S., and Blom, A. M. Streptococcus pneumoniae endopeptidase O (PepO) is a multifunctional plasminogen- and fibronectin-binding protein, facilitating evasion of innate immunity and invasion of host cells. *J. Biol. Chem.* v.288, p.6849–6863, 2013.
- Alves, F. G. et al. Laboratory parameters of cerebrospinal fluid in individuals with enterovirus meningitis. *Rev. bras. crescimento desenvolv. hum.* [online]. v.25, p. 237-242, 2015.
- American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes—2011. *Diabetes Care*, v. 34, p. S11-S61, 2011.
- Baker CJ. The spectrum of perinatal group B streptococcal disease. *Vaccine* 31 (Suppl. 4): D3-D6, 2013.
- Barrichello, T., Generoso, J. S., Milioli, G., Elias, S. G., Teixeira, A. L. Pathophysiology of bacterial infections of the central nervous system and its putative role in the pathogenesis of behaviorlal changes. *Revista Brasileira de Psiquiatria*. v. 35, p. 81-87, 2013.
- Batista R. P., Ferreira, C. R. Streptococcus agalactiae septicemia in a patient with diabetes and hepatic cirrhosis. *Autops Case Rep.* v. 5, p. 35-43, 2015.
- Berne e Levy: *Fisiologia*. 6ª edição. Editora Elsevier, Rio de Janeiro. 2009.
- Blumberg, H. M., Stephens, D. S., Modansky, M., Erwin, M., Elliot, J., Facklam, R. R., Schuchat, A., Baughman, W., Farley, M. M. Invasive group B streptococcal disease: the emergence of serotype V. *J Infect Dis.* v. 173, p. 365-373, 1996.
- Bornstein, P., Traub, W. *The Proteins*. v. 4, p. 411, 1979.
- Brown, A. O., Mann, B., Gao, G., Hankins, J. S., Humann, J., Giardina, J., et al. *Streptococcus pneumoniae* Translocates into the Myocardium and Forms Unique Microlesions That Disrupt Cardiac Function. *PLoS Pathog.* v. 10, e1004383, 2014.
- Bruce, M. C., Schuyler, M., Martin, R. J., Starcher, B. C., Tomashefski, J. F., Wedig, K. E. Risk Factors for the Degradation of Lung Elastic Fibers in the Ventilated Neonate. *Am Rev Respir Dis.* v. 146, p. 204-212, 1992.

Brusch, J. L., Mark, E. J. Case records of the Massachusetts General Hospital (case 13-1996). *New England Journal of Medicine*. v. 334, p. 1116-1123, 1996.

Carlin, A. F., Lewis, A. L., Varki, A., Nizet, V. Group B streptococcal capsular sialic acids interact with siglecs (immunoglobulin-like lectins) on human leukocytes. *J Bacteriol*. v. 189, p. 1231-1237, 2007.

Caskey, R.C., Zgheib, C., Morris, M., Allukian, M., Dorsett-Martin, W., Xu, J., Wu, W., Liechty, K.W. Dysregulation of collagen production in diabetes following recurrent skin injury: contribution to the development of a chronic wound. *Wound Repair Regen*. v. 22, p. 512-520, 2014.

Casqueiro, J., Casqueiro, J., Alves, C. Infections in patients with diabetes mellitus: A review of pathogenesis. *Indian J Endocrinol Metab*. v. 1, p. S27-S36, 2012.

Centers for Disease Control and Prevention. Prevention of perinatal Group B *Streptococcal* disease: a public health perspective. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. v. 45, p. 1-24, 1996.

Centers for Disease Control and Prevention. Prevention of Perinatal Group B *Streptococcal* Disease. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. v. 59, p. 1-23, 2010.

Centers for Disease Control and Prevention. Group B Strep Infection in Adults. 2016. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/groupbstrep/about/adults.html>>. Acesso em: 11 jan. 2018.

Coalson, J. J. Pathology of bronchopulmonary dysplasia. *Semin Perinatol*. v. 30, p. 179–184, 2006.

Costa A. L., Lamy Filho F., Chein M. B., Brito L. M., Lamy Z. C., Andrade K. L.. Prevalence of colonization by group B *Streptococcus* in pregnant women from a public maternity of Northwest region of Brazil. *Rev Bras Ginecol Obstet*. v. 30, p. 274-280, 2008.

Costa AF, Pereira CS, Santos GS, Carvalho TM, Hirata JrR, Mattos-Guaraldi AL, Rosa AC, Nagao PE. Group B *Streptococcus* serotypes III and V induce apoptosis and necrosis of human epithelial A549 cells. *Int J Mol Med*. v.27, p. 739-744, 2011.

Delamaire, M., Maugeudre, D., Moreno, M., Le Goff, M. C., Allannic, H., Genetet, B. Impaired leucocyte functions in diabetic patients. *Diabet Med*. v. 14, p. 29-34, 1997.

Diener, B., L. Carrick, Jr., Berk, R. S. In vivo studies with collagenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun*. v. 7, p. 212–217, 1973.

Doran, K. S., Chang, J. C., Benoit, V. M., Eckmann, L., Nizet, V. Group B streptococcal beta-hemolysin/cytolysin promotes invasion of human lung epithelial cells and the release of interleukin-8. *J Infect Dis*. v. 185, p. 196-203, 2002.

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

Dogan, B., Schukken, Y. H., Santisteban, C., Boor, K. J. Distribution of Serotypes and Antimicrobial Resistance Genes among *Streptococcus agalactiae* Isolates from Bovine and Human Hosts. *Journal of Clinical Microbiology*. v.43, p.5899-5906, 2005.

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

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

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

Edwards, M. S., Fuselier, P. A. Enhanced Susceptibility of Mice with Streptozotocin-Induced Diabetes to Type II Group B Streptococcal Infection. *Infection and Immunity*. v. 39, p. 580-585, 1983.

Eldar, A., Bejerano, Y. & Bercovier, H. *Streptococcus shiloi* and *Streptococcus difficile*: two new streptococcal species causing a meningoencephalitis in fish. *Curr Microbiol*. v. 28, p.139–143, 1994.

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

Evans, J. J., Pasnik, D. J., Klesius, P. H., Al-Ablani, S. First report of *Streptococcus agalactiae* and *Lactococcus garvieae* from a wild bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *Journal of Wildlife Diseases*, v. 42, p. 561-569, 2006.

Facklam, R. R., Padula, J. F., Thacker, L. G., Wortham, E. C., Sconyers, B. J. Presumptive identification of group A, B, and D streptococci. *Appl Microbiol*. v. 27, n. 1, p. 107-113, 1974.

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

Farley, M. M., Harvey, R. C., Stull, T., Smith, J. D., Schuchat, A., Wenger, J. D., Stephens, D. S. A population-based assessment of invasive disease due to group B *Streptococcus* in nonpregnant adults. *N Engl J Med*. v.24, p. 1807-1811, 1993.

Ferreira, S. S., Nunes, F. P. B., Casagrande, F. B., Martins, J. O. Insulin Modulates Cytokine Release, Collagen and Mucus Secretion in Lung Remodeling of Allergic Diabetic Mice. *Front Immunol*. v. 8, p. 1-20, 2017.

Ferreira, L. T., Saviolli, I. H., Valenti, V. E., Abreu, L. C. Diabetes mellitus: hyperglycemia and its chronic complications. *Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde*. v.36, p. 182-188, 2011.

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

Geerlings, S. E., Hoepelman, A. I. Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus (DM). *FEMS Immunol Med Microbiol*. v. 26, p. 259-265, 1999.

Gherardi, G., Imperi, M., Baldassarri, L., Pataracchia, M., Alfarone, G., Recchia, S., Orefici, G., Dicuonzo, G., Creti, R. Molecular epidemiology and distribution of serotypes, surface proteins, and antibiotic resistance among group B streptococci in Italy. *J Clin Microbiol*. v. 45, p. 2909-2916, 2007.

Glaser, P., Rusniok, C., Buchrieser, F., Chevalier, L., Frangeul, T., Msadek, M., Zouine, E., Couvé, L., Lalioui, C., Poyart, P., Trieu-Cuot, F., Kunst, F. Genome sequence of *Streptococcus agalactiae*, a pathogen causing invasive neonatal disease. *Molecular Microbiology*. v. 45, p. 1499-1513, 2002.

Godoy, D.T., Carvalho-Castro, G.A., Leal, C.A., Pereira, U.P., Leite, R.C., Figueiredo, H.C. Genetic diversity and new genotyping scheme for fish pathogenic *Streptococcus agalactiae*. *Lett Appl Microbiol*. v. 53, p. 476-483, 2013.

Gray, L. D., Kreger, A. S. Rabbit corneal damage produced by *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Infect. Immun*. v.12, p. 419-432, 1975.

Gurcan, M. N., Boucheron, L. E., Can, A., Madabhushi, A., Rajpoot, N. M., Yener, B. Histopathological image analysis: a review. *Rev Biomed Eng*. v. 2, p. 147-171, 2009.

Gutekunst, H., Eikmanns, B. J., Reinscheid, D.J. The novel fibrinogen-binding protein FbsB promotes *Streptococcus agalactiae* invasion into epithelial cells. *Infect Immun*. v. 72, p. 3495-3504, 2004.

Harrington, D. J. Bacterial Collagenases and Collagen-Degrading Enzymes and Their Potential Role in Human Disease. *Infection and Immunity*. v. 64, p. 1885-1891, 1996.

Hava, D. L., LeMieux, J., Camilli, A. From nose to lung: the regulation behind *Streptococcus pneumoniae* virulence factors. *Mol Microbiol*, v. 50, p. 1103-1110, 2002.

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

Heath, P. T., Balfour, G., Weisner, A. M., Efstratiou, A., Lamagni, T. L., Tighe, H., O'Connell, A. F., Cafferkey, M., Verlander, Q., et al. Group B streptococcal disease in UK and Irish infants younger than 90 days. *The Lancet*. v. 363, p. 292-294, 2004.

Hoshina K, Suzuki Y, Nishida H, Kaneko K, Matsuda S, Kobayashi M, et al. Trend of neonatal group B streptococcal infection during the last 15 years. *Pediatr Int*. v. 44, p. 641, 2002.

Hull JR, et al. Interactions of the streptococcal C5a peptidase with human fibronectin. *Acta Biomater.* v. 4, p. 504-5013, 2007.

Hulstijn, M. et al. Parasitological and morphological study of *Schistosoma mansoni* and diabetes mellitus in mice. *Experimental Parasitology*, v.129, p.42–47, 2011.

International Diabetes Federation. 2011 Guideline for Management of PostMeal Glucose in Diabetes. 2011. Disponível em: <www.idf.org>. Acesso em: 12 dez. 2017.

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

Jackson, R. J., Dao, M. L., Lim, D. V. Cell-associated collagenolytic activity by group B streptococci. *Infect Immun.* v. 62, p. 5647-5651, 1994.

Jackson, L. A., Hilsdon, R., Farley, M. M., Harrison, L. H., Reingold, A. L., Plikaytis, B. D., Wenger, J. D., Schuchat, A. Risk Factors for Group B Streptococcal Disease in Adults. *Ann Intern Med.* v. 123, p. 415-420, 1995.

Johargy, A.K. Antimicrobial susceptibility of bacterial and fungal infections among infected diabetic patients. *J Pak Med Assoc.* v.66, p. 1291-1295, 2016.

Johri, A. K., L. C. Paoletti, P. Glaser, M. Dua, P. K. Sharma, G. Grandi, and R. Rappuoli.. Group B Streptococcus: global incidence and vaccine development. v. 4, p. 932-942, 2006.

Joshi, N., Caputo, G. M., Weitekamp, M. R., Karchmer, A. W. Infections in patients with diabetes mellitus. *N Engl J Med.* v. 341, p. 1906-1912, 1999.

Kang, M., Ko, Y. P., Liang, X., Ross, C. L., Liu, Q., Murray, B. E., et al. Collagen-binding microbial surface components recognizing adhesive matrix molecule (MSCRAMM) of Gram-positive bacteria inhibit complement activation via the classical pathway. *J. Biol. Chem.* v. 288, p. 20520–20531, 2013.

Keefe GP. *Streptococcus agalactiae* mastitis: a review. *Can Vet J.* v. 38, p. 429–437, 1997.

Kenzel, S., Mergen, M., von Süßkind-Schwendi, J., Wennekamp, J., Deshmukh, S. D., Haeffner, M., Triantafyllopoulou, A., Fuchs, S., Farmand, S., et al. Insulin modulates the inflammatory granulocyte response to streptococci via phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Immunol.* v. 189, p. 4442-4444, 2012.

Khan, F.Y. *Streptococcus agalactiae* Meningitis in Adult Patient: A Case Report and Literature Review. *Case Rep Infect Dis.* v. 2016, p. 1-2, 2016.

Kim, D., Wang, J., Willingham, S. B., Martin, R., Wernig, G., Weissman, I. L. Anti-CD47 antibodies promote phagocytosis and inhibit the growth of human myeloma cells. *Leukemia*, v. 26, p. 2538-2545, 2012.

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

Kline, K.A., Schwartz, D.J., Lewis, W.G., Hultgren, S.J., Lewis, A.L. Immune activation and suppression by group B streptococcus in a murine model of urinary tract infection. *Infect Immun*. v. 79, p. 3588-3595, 2011.

Koga, T., Aoki, W., Fujii, M., Satou, K., Ikeda, Y. Spontaneous Infection Caused by *Streptococcus agalactiae* in KK-A^y Mice. *American Association for Laboratory Animal Science*. v. 67, p. 416-419, 2017.

Korir, M.L., Knupp, D., LeMerise, K., Boldenow, E., Loch-Carusio, R., Aronoff, D. M., Manning, S. D. Association and virulence gene expression vary among serotype III group B streptococcus isolates following exposure to decidual and lung epithelial cells. *Infect Immun*. v. 82, p. 4587-4595, 2014.

Konto-Ghiorghi, Y., Mairey, E., Mallet, A., Duménil, G., Caliot, E., Trieu-Cuot, P., & Dramsi, S. Papel duplo para *Pilus* na adesão às células epiteliais e formação de biofilme em *Streptococcus agalactiae* . *PLoS Pathogens*. v. 5, p. e1000422, 2009.

Kreger, A.S., Gray, L.D. Purification of *Pseudomonas aeruginosa* proteases and microscopic characterization of pseudomonal protease-induced rabbit corneal damage. *Infect Immun*. v.19, p. 630–648, 1978.

Laith, A. A., Ambak, M. A., Hassan, M., Sheriff, S. M., Nadirah, M., Draman, A. S., Wahab, W., Ibrahim, W. N., Aznan, A. S., et al. Molecular identification and histopathological study of natural *Streptococcus agalactiae* infection in hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Vet World*. v. 10, p. 101-111, 2017.

Lammler, C., Chhatwal, G. S., Blobel, G. Binding of human fibrinogen and its polypeptide chains to group B streptococci. *Med Microbiol Immunol*. v. 172, p. 149-153, 1983.

Lamy, M-C, S. Dramsi, A. Billoet, H. Réglie-Poupet, A. Tazi , J. Raymond, F. Guérin, E. Couvé, F. Kunst, P. Glaser , P. Trieu-Cuot, and C. Poyart. Rapid detection of the “highly virulent” group B Streptococcus ST-17 clone. *Microbes and Infection*. v. 8, p. 1714-1722, 2006.

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

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

Landwehr-Kenzel, S., Henneke, P. Interaction of *Streptococcus agalactiae* and cellular innate immunity in colonization and disease. *Front Immunol*. v. 5, p. 1-9, 2014.

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

Langley, G., Hao, Y., Pondo, T., Miller, L., Petit, S., Thomas, A., Lindegren, M. L., Farley, M. M., Dumyati, G., Como-Sabetti, K, et al. The Impact of Obesity and Diabetes on the Risk of Disease and Death due to Invasive Group A *Streptococcus* Infections in Adults. *Clin Infect Dis.* v. 62, p. 845-852, 2016.

Lartigue, M. F.; Kostrzewa, M.; Salloum, M.; Haguenoer, E.; Héry-Arnaud, J.; Domelier, A. S.; Stumpf, S. and Quentin, R. Rapid detection of “highly virulent” group B *Streptococcus* ST-17 and emerging ST-1 clones by MALDI-TOF mass spectrometry. *J. Microb. Meth.* v. 86, p. 262–265, 2011.

Lauer P, Rinaudo CD, Soriani M, et al. Genome analysis reveals *pili* in Group B *Streptococcus*. *Science.* v. 309, p. 105, 2005.

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.* v. 12, p. 60-68, 2005.

Levent, F., Baker, C. J., Rench, M. A., Edwards, M. S. Early outcomes of group B streptococcal meningitis in the 21st century. *Pediatr. Infect. Dis. J.* v. 29, p. 1009-1012, 2010.

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

Lin, Y., Mahan, K., Lathrop, W. F., Myles, D. G., Primakoff, P. A hyaluronidase activity of the sperm plasma membrane protein PH-20 enables sperm to penetrate the cumulus cell layer surrounding the egg. *J Cell Biol.* v. 125, p. 1157-1163, 1994.

Lione, V. de O., Santos, M. H., Oliveira, J. S., Mattos-Guaraldi, A. L., Nagao, P. E. Interferon- γ inhibits group B *Streptococcus* survival within human endothelial cells. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* v. 109, p. 940-943; 2014.

Lopardo, H. A., Vidal, P., Jeric, C., Centron, D., Paganini, H., Facklan, R. R., Elliot, J. Argentinian *Streptococcus* Study group. Six-month multicenter study on invasive infections due to group B streptococci in Argentina. *J Clin Microb.* v. 41, p. 4688-4695, 2003.

Luan, S. L., Granlund, M., Sellin, M., Lagergard, T., Spratt, B. G., Norgren, M. Multilocus sequence typing of Swedish invasive group B *Streptococcus* isolates indicates a neonatally associated genetic lineage and capsule switching. *J Clin Microbiol.* v. 43, p. 3727-3733, 2005.

Ly, D., Taylor, J. M., Tsatsaronis, J. A., Monteleone, M. M., Skora, A. S. Plasmin(ogen) acquisition by group A *Streptococcus* protects against C3b-mediated neutrophil killing. *J. Innate Immun.* v. 6, p. 340-350, 2014.

McAdams, R. M., Vanderhoeven, J., Beyer, R. P., Bammler, T. K., Farin, F. M., Liggitt, H. D., Kapur, R. P., Gravett, M. G., Rubens, C. E., Adams, W. Chorionic infection downregulates angiogenesis and morphogenesis pathways in fetal lungs from *Macaca nemestrina*. *PLoS ONE*. v.7, p. e46863, 2012.

Maisey HC, Doran KS, Nizet V. Recent advances in understanding the molecular basis of Group B Streptococcus virulence. *Expert Rev Mol Med*. v. 10, p. 1-18, 2009.

Maisey HC, Hensler M, Nizet V, Doran KS. Group B streptococcal *pilus* proteins contribute to adherence to and invasion of brain microvascular endothelial cells. *J Bacteriol*. v. 189, p. 1464–1467, 2007.

Maisey, H. C., Quach, D., Hensler, M. E., Liu, G. Y., Gallo, R. L. et al. A group B streptococcal pilus protein promotes phagocyte resistance and systemic virulence. *FASEB J*. v. 22, p. 1715-1724, 2008.

Marcusso, P. F. Resposta imune de tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*) vacinadas contra *Streptococcus agalactiae*. 2014. 78 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista - Unesp, Jaboticabal, 2014.

Marra, A., Lawson, S., Asundi, J. S., Brigham, D., Hromockyj, A. E. In vivo characterization of the *psa* genes from *Streptococcus pneumoniae* in multiple models of infection. *Microbiology*, v. 148, p. 1483-1491, 2002.

Muñoz, P.; Llancaqueo, A.; Rodríguez-Créixems, M.; Peláez, T.; Martín, L.; Bouza, E. Group B streptococcus bacteremia in nonpregnant adults. *Arch Intern Méd*. v.157, p. 213-216, 1997.

Nascimento, A. C. Patologia Pulmonar. 2011. Disponível em: <<http://www.ufjf.br/deptopatologia/files/2011/08/Aula-15-16.07.2013-Patologia-pulmonar.pdf>>. Acesso em: 20 jan. 2018.

Nielsen, T. B., Pantapalangkoor, P., Yan, J., Luna, B. M., Dekitani, K., Bruhn, K., Tan, B., Junus, J., Bonomo, R. A., et al. Diabetes Exacerbates Infection via Hyperinflammation by Signaling through TLR4 and RAGE. *American Society for Microbiology*. v. 8, p. 1-15, 2017.

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

Oehmcke, S., Shannon, O., von Köckritz-Blickwede, M., Mörgelin, M., Linder, A., Olin, A., Björck, L., Herwald, H. Treatment of invasive streptococcal infection with a peptide derived from human high-molecular weight kininogen. *Blood*. v. 114, p. 444-451, 2009.

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

- Olokoba, A. B., Obateru, O. A., Olokoba, L. B. Type 2 Diabetes Mellitus: A review of Current Trends. *Oman Med J.* v. 27, p. 269-273, 2012.
- Orihuela, C. J., Gao, G., McGee, M., Yu, J., Francis, K. P., Tuomanen, E. Organ-specific models of *Streptococcus pneumoniae* Disease. *Scand J Infect Dis.* v. 35, p. 647-652, 2003.
- Osrin, D., Vergano, S., Costello, A. Serious bacterial infections in newborn infants in developing countries. *Curr Opin Infect Dis.* v. 17, p. 217-224, 2004.
- Oyanguren, B., Esteban, L., Guillán, M., de Felipe, A., Alonso-Cánovas, A., Navas, E., Quereda, C., Corral, I. Central nervous system involvement in adult patients with invasive infection caused by *Streptococcus agalactiae*. *Neurologia.* v. 30, p. 158-162, 2015.
- Palmeiro JK, Dalla-Costa LM, Fracalanza SEL, Botelho ACN, Nogueira KS, Scheffer MC, Torres ARLS, Carvalho NS, Cogo LL, Madeira HMF. Phenotypic and genotypic characterization of group B streptococcal isolates in southern Brazil. *J Clin Microbiol.* v. 12, p. 4397-4403, 2010.
- Panikkath, R., Suvorava, N., Ngo, N., Panikkath, D., Lim, S. Y., Umyarova, E., Meyerrose, G. Comparison of patients rehospitalized for heart failure with versus without a history of habitual alcohol consumption. *Proc (Bayl Univ Med Cent).* v.27, p. 208-209, 2016.
- Petta, S. et al. Hepatic steatosis and insulin resistance are associated with severe fibrosis in patients with chronic hepatitis caused by HBV or HCV infection. *Liver Internat.* v. 2011 p. 507-515, 2011.
- Pezzicoli, A., Santi, I., Lauer, P., Rosini, R., Rinaudo, D., Grandi, G., Telford, J. L., Soriani, M. Pilus backbone contributes to group B *Streptococcus paracellular* translocation through epithelial cells. *J Infect Dis.* v. 198, p. 890-898, 2008.
- Pimentel, B. A. S, Martins, C. A. S., Mendonça, J. C., Miranda, P. S. D., Sanches, G. F., Mattos-Guaraldi, A. L., Nagao, P. E. *Streptococcus agalactiae* infection in cancer patients: a five-year study. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* v. 35, p. 927-933, 2016.
- Pietrocola, G., Schubert, A., Visai, L., Torti, M., Fitzgerald, J. R., Foster, T. J., Reinscheid, D. J., Speziale, P. FbsA, a fibrinogen-binding protein from *Streptococcus agalactiae*, mediates platelet aggregation. *Blood Journal.* v. 1, p. 1-37, 2004.
- Poyart, C.; Tazi, A.; Réglier-Poupet, H.; Billoët, A.; Tavares, N.; Raymond, J.; Trieu-Cuot P. Multiplex PCR Assay for Rapid and Accurate Capsular Typing of Group B Streptococci. *J Clin Microbiol.* v. 45, p. 1985–1988, 2007.
- Pritchard, D. G., Lin, B., Willingham, T. R., Baker, J.R. Characterization of the group B streptococcal hyaluronate lyase. *Arch Biochem Biophys.* v.315, p.431-437, 1994.

Polissi, A., Pontiggia, A., Feger, G., Altieri, M., Mottl, H., Ferrari, L., Simon, D., Raddtke, A. et al. Large-scale identification of virulence genes from *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* v. 66, p. 5620-5629, 1998.

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

Rajagopalan, S. Serious Infections in Elderly Patients with Diabetes Mellitus. *Clin Infect Dis.* v. 40, p. 990-996, 2005.

Rayfield, E.J., Ault, M.J., Keusch, G.T., Brothers, M.J., Nechemias, C., Smith, H. Infection and diabetes: the case for glucose control. *Am J Med.* v. 72, p. 990-996, 1982.

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

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

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

Robertson, R. P. Antagonist: diabetes and insulin resistance--philosophy, science, and the multiplier hypothesis. *J Lab Clin Med.* v. 125, p. 560-564, 1995.

Rubens, C. E., Raff, H. V., Jackson, J. C., Chi, E. Y., Bielitzki, J. T., Hillier, S. L. Pathophysiology and histopathology of group B streptococcal sepsis in *Macaca nemestrina* primates induced after intraamniotic inoculation: evidence for bacterial cellular invasion. *J Infect Dis.* v. 164, n. 2, p. 320-330, 1991.

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

Schrag, S. J.; Zywicki, S.; Farley, M. M.; Reingold, A. L.; Harrison, L. H.; Lefkowitz, L. B. Group B Streptococcal disease in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis. *N. Engl. J. Med.* v. 342, p. 15-20, 2000.

Schubert, A., Zakikhany, K., Schreiner, M., Frank, R., Spellerberg, B., Eikmanns, B. J., Reinscheid, D. J. A fibrinogen receptor from group B *Streptococcus* interacts with fibrinogen by repetitive units with novel ligand binding sites. *Mol Microbiol.* v. 46, p. 557-569, 2002.

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

Silverthorn, D. U. *Human Physiology: An Integrated Approach*. San Francisco: Pearson/Benjamin Cummings, 2015.

Sharma, C. M., Agrawal, R. P., Sharan, H., Kumar, B., Sharma, D., Bhatia, S. S. "Neonatal Sepsis": Bacteria & their Susceptibility Pattern towards Antibiotics in Neonatal Intensive Care Unit. *J Clin Diagn Res*. v. 7, p. 2511-2513, 2013.

Skoff, T. H., Farley, M. M., Petit, S., Craig, A. S., Schaffner, W., Gershman, K., Harrison, L. H, Lynfield, R., Mohle-Boetani, J, et al. Increasing Burden of Invasive Group B Streptococcal Disease in nonpregnant Adults, 1990-2007. *Clin Infect Dis*. v. 49, p. 85-92, 2009.

Slotved, H. C.; Kong, F.; Lambertsen, L.; Sauer, S. and Gilbert, G. L. Serotype IX, a proposed new *Streptococcus agalactiae* serotype. *J. Clin. Microbiol.* v. 45, p. 2929-2936, 2007.

Soares, TCG, Daniela Sales Alviano,DS, Gabriela da Silva Santos, GS, Alviano,CS, Mattos-Guaraldi,AL, Nagao, PE. Prevalence of Group B Streptococcus serotypes III and V in pregnant women of Rio de Janeiro. *Brazil Brazilian Journal of Microbiology*. v. 44, p. 869-872, 2013.

Souza, V. C. et al. Antimicrobial susceptibility and genetic diversity of *Streptococcus agalactiae* recovered from newborns and pregnant women in Brazil. 2013. Disponível em: <<https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/7091>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

Spanheimer, R.G., Umpierrez, G.E., Stumpf, V. Decreased collagen production in diabetic rats. *Diabetes*. v. 37, p. 371-372, 1988.

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

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 factors and bacterial surface components. *Infect. Immun*. v. 62, p. 2450-2458, 1994.

Tajiri, T., Tate, G., Akita, H., Ohike, N., Masunaga, A., Kunimura, T., Mitsuya, T. and Morohoshi, T. Autopsy cases of fulminant-type bacterial infection with necrotizing fasciitis: Group A (beta) hemolytic *Streptococcus pyogenes* versus *Vibrio vulnificus* infection. *Pathology International*. v. 58, p. 196–202, 2008.

Turan, H., Serefhanoglu, K., Torun, A. N., Kulaksizoglu, S., Kulaksizoglu, M., Pamuk, B., Arslan, H. Frequency, risk factors, and responsible pathogenic microorganisms of asymptomatic bacteriuria in patients with type 2 diabetes mellitus. *Jpn. J. Infect. Dis*. v. 61, p. 236-238, 2008.

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

Wennekamp, J., Henneke, P. Induction and termination of inflammatory signaling in group B streptococcal sepsis. *Immunological Reviews*. v. 225, p. 114-127, 2008.

Wiles, K. G., Panizzi, P., Krohn, H. K., Bock, P. E. Skizzle is a novel plasminogen and plasmin binding from *Streptococcus agalactiae* that targets proteins of human fibrinolysis to promote plasmin generation. *JBC*. v. 285, p. 21153-21164, 2010.

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

Yildirim, A.O., Fink, K., Lämmler, Ch. Distribution of the hyaluronate lyase encoding gene hylB and the insertion element IS1548 in streptococci of serological group B isolated from animals and humans. *Res Vet Sci*. v. 73, p. 131-135, 2002.

Zamri-Saad, M., Amal, M.N.A., Siti, A. Pathological changes in red tilapia *Oreochromis spp.* naturally infected by *Streptococcus agalactiae*. *J Comp Pathol*, v.143, p. 227–229, 2010.