



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

João Matheus Sobral Pena

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

Rio de Janeiro

2022

João Matheus Sobral Pena

Estudo da patogênese das infecções urinárias 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 Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

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

Rio de Janeiro

2022

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

P397 Pena, João Matheus Sobral.
Estudo da patogênese das infecções urinárias por *Streptococcus agalactiae* em modelo murino de diabetes induzida / João Matheus Sobral Pena – 2022.
59f.

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

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Ciências Médicas.

1. Infecções urinárias – Fisiopatologia – Teses. 2. *Streptococcus agalactiae* – Patogenicidade – Teses. 3. Diabetes mellitus - Teses. 4. Ratos como animais de laboratório – Teses. I. Ferreira, Prescilla Emy Nagao. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 616.6:579.862

Bibliotecário: Felipe Caldonazzo
CRB7/7341

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

Assinatura

Data

João Matheus Sobral Pena

Estudo da patogênese das infecções urinárias 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 Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 08 de setembro de 2022.

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

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Ana Claudia Paula Rosa

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof.^a Dra. Pamella Silva Lannes-Costa

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Veronica Viana Vieira

Instituto Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

2022

DEDICATÓRIA

Gostaria de dedicar esse trabalho a todos que, de certa forma, acreditaram no meu potencial e me permitiram finalizar esta etapa tão esperada!

AGRADECIMENTOS

O Gostaria de agradecer a Deus primeiramente, por guiar todos os meus caminhos e me permitir ter discernimento para enfrentar todos os desafios durante a minha formação acadêmica.

Logo em seguida, gostaria de agradecer a minha família por todo o esforço para que eu sempre pudesse estudar e correr atrás dos meus sonhos e anseios.

Não menos importante, gostaria de agradecer a minha Orientadora Prescilla Nagao por abrir as portas do seu laboratório para mim e sempre me orientar de forma respeitosa e didática. Gostaria de agradecer também a professora Gabriela Jonathan, pela paciência e o carinho no ensino de cada um dos experimentos laboratoriais.

Gostaria de agradecer também aos meus colegas de laboratório, Dayane, Pamella, Bruna, Kaian, Noemi, Glenda, Melissa, Eduarda, Jullyana, que me acolheram ainda como aluno de iniciação científica e me passaram todo conhecimento e rotina de laboratório. Por fim, ao falar dos meus colegas de laboratório, não poderia esquecer da minha maior companhia no laboratório e no biotério da UERJ, Jéssica Mendonça, então, fica aqui o meu muito obrigado por todo o cuidado e carinho dentro e fora da universidade.

Aos componentes da banca avaliadora: Gabriela Jonathan, Pamella Lannes e Veronica Viana, por aceitarem o meu convite mesmo em um momento conturbado para a ciência que é esse período pós/trans - pandêmico.

Os lábios da sabedoria estão fechados, exceto aos ouvidos do entendimento.

O Caibalion

RESUMO

PENA, João Matheus Sobral. *Estudo da patogênese das infecções urinárias por Streptococcus agalactiae em modelo murino de diabetes induzida*. 2022. 59 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

Streptococcus agalactiae, também denominado como Estreptococos do grupo B (EGB) são bactérias Gram-positivas, esféricas que crescem aos pares ou em cadeias. O EGB tem emergido como importante causa de infecção invasiva em adultos não gestantes, embora as razões para o aumento da incidência da doença não sejam totalmente esclarecidas. As condições médicas, incluindo as alterações na resposta imune são os principais fatores de risco para infecções por EGB, particularmente a diabetes. A prevalência de diabetes entre os pacientes com casos de doença invasiva por EGB é nitidamente mais elevada (44,4%) do que na população não diabética. As infecções do trato urinário estão entre as infecções bacterianas mais comuns em humanos ocasionando um grande gasto para os sistemas de saúde públicos e privados. Sendo responsável por 11 milhões de consultas/ano nos Estados Unidos com custos anuais de 6 bilhões de dólares. Diante do exposto, o presente estudo padronizou a inoculação intraperitoneal e intranasal do EGB em modelo murino de diabetes induzida, analisando o desenvolvimento da patogênese no trato urinário. A indução da diabetes foi realizada através da administração intraperitoneal da droga estreptozotocina, após três dias e com a confirmação da hiperglicemia, os animais foram infectados por via intranasal com a amostra GBS90356 e por via intraperitoneal com as amostras GBS90356, COH1, GBS90356bspC (1×10^7 UFC/mL). Os animais foram eutanasiados após 5 semanas no modelo de infecção crônico e após 5 dias no modelo de infecção agudo para a retirada dos órgãos alvos (rim e bexiga), bem como urina e sangue para contagem de colônias viáveis (UFC/mL) para análise da disseminação, crescimento e persistência bacteriana. No modelo crônico as contagens evidenciaram maior crescimento bacteriano nos grupos diabéticos infectados (DI) em comparação ao grupo não diabéticos infectados (NDI), da mesma forma esse modelo de infecção demonstrou contagem de UFC/mL significativa na urina e sangue; em contraste, o modelo agudo, houve contagem bacteriana somente no rim e na bexiga. Adicionalmente, a amostra bacteriana GBS90356 apresentou amplificação para todos os genes de fatores de virulência testados, com exceção do PI-2a. A capacidade de formação de biofilme das amostras recuperadas dos animais infectados apresentou alteração na presença de ambiente hiperglicêmico. Portanto, ambos os modelos de infecção testados foram bem sucedidos, apresentando contagens bacterianas em diferentes grupos de animais, demonstrando que os modelos são replicáveis para infecção do trato urinário por EGB em modelo murino de diabetes induzida.

Palavras-chave: Diabetes. Infecção urinária. Streptococcus agalactiae.

ABSTRACT

PENA, João Matheus Sobral. *Study of the pathogenesis of urinary infections by *Streptococcus agalactiae* in a murine model of induced diabetes*. 2022. 59 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

Streptococcus agalactiae, also known as group B Streptococcus (GBS), are Gram-positive cocci that grows in pairs or in chains. GBS has emerged as an important cause of invasive infection in non-pregnant adults, although the reasons for the increased incidence of GBS disease are not fully understood. Medical conditions, including changes in the immune response, are the major risk factors for the GBS infections, particularly diabetes. The prevalence of diabetes among patients with invasive GBS disease is higher (44.4%) than the non-diabetic population. Urinary tract infections are the most common bacterial infections in humans, causing a great expense to public and private health systems. GBS is responsible for 11 million consultations/year in the United States with annual costs of 6 billion dollars. Therefore, the present study aimed to standardize intraperitoneal and intranasal infection of diabetic murine model by GBS, analyzing the development of pathogenesis in the urinary tract. The diabetes induction was performed through the intraperitoneal administration of streptozotocin drug, after confirmation of hyperglycemia, the animals were infected intranasally by GBS90356 strain and intraperitoneally with GBS90356, COH1, GBS90356 Δ spC strains (1×10^7 UFC/mL). The animals were euthanized in the chronic infection model (5 weeks) and after in the acute infection model (5 days) for the removal of target organs (kidney and bladder), as well as urine and blood to count viable colonies (CFU/mL) for dissemination analysis, growth and bacterial persistence. In the chronic model, bacterial growth was higher in diabetic infected (DI) group than in the non-diabetic infected (NDI) group. In the same way, this infection model showed a significant CFU/mL count in fluids, urine and blood; in contrast, the acute model, presented bacterial count only in the kidney and bladder. In addition, GBS90356 strain showed amplification for all virulence factor genes tested, with exception for PI-2a. The biofilm formation of GBS strains recovered from diabetic animals changed in the presence of hyperglycemic environment. Therefore, both infection models tested were successful, presenting bacterial counts in different animal groups, demonstrating that the models are replicable for urinary tract infection due to GBS in a murine model of induced diabetes.

Keywords: Diabetes. Urinary infection. *Streptococcus agalactiae*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Massa corporal e consumo alimentar dos animais utilizados no primeiro experimento.....	31
Figura 2 –	Aparecimento de injúria na derme dos camundongos diabéticos infectados.....	32
Figura 3 –	PCR realizado com as amostras recuperadas dos animais Black imediatamente após a morte dos animais.....	33
Figura 4 –	Contagem das unidades formadoras de colônias (UFC/mL) dos macerados de bexiga dos animais infectados pelas amostra GBS90356 no modelo de experimento crônico de 5 semanas.....	34
Figura 5 –	Contagem das unidades formadoras de colônias (UFC/mL) dos macerados dos rins dos animais infectados pelas amostras GBS90356 no modelo crônico de 5 semanas	35
Figura 6 –	Detecção de crescimento bacteriano no sangue dos camundongos infectados.....	36
Figura 7 –	Detecção de crescimento bacteriano na urina dos camundongos infectados	37
Figura 8 –	Contagem das unidades formadoras de colônias (UFC/mL) dos macerados de bexiga dos animais infectados com amostra GBS90356 no modelo de infecção aguda.....	39
Figura 9 –	Contagem das unidades formadoras de colônias (UFC/mL) dos macerados dos rins dos animais infectados com a amostras GBS90356 no modelo de infecção aguda.....	40
Figura 10 –	Contagem das unidades formadoras de colônias (UFC/mL) dos macerados de bexiga dos animais infectados com amostra GBS90356 BspC no modelo de infecção aguda.....	41
Figura 11 –	Contagem das unidades formadoras de colônias (UFC/mL) dos macerados dos rins dos animais infectados com amostra GBS90356 BspC no modelo de infecção aguda.....	42
Figura 12 –	Contagem das unidades formadoras de colônias (UFC/mL) dos macerados de bexiga dos animais infectados com a amostra COH1 no modelo de infecção aguda.....	43

Figura 13 – Contagem das unidades formadoras de colônias (UFC/mL) dos macerados dos rins dos animais infectados com a amostra COH1 no modelo de infecção aguda.....	44
Figura 14 – Comparativo da contagem das unidades formadoras de colônias (UFC/mL) dos macerados de bexiga de todos os animais infectados com as amostras bacterianas GBS90356, GBS90356bspC e COH1 no modelo de infecção aguda.....	45
Figura 15 – Comparativo da contagem das unidades formadoras de colônias (UFC/mL) dos macerados dos rins de todos os animais infectados com as amostras bacterianas GBS90356, GBS90356bspC e COH1 no modelo de infecção aguda.....	46
Figura 16 – Cinética da produção de biofilme das amostras de EGB após 24 horas de incubação em TSB.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Modelo de infecção crônica de 5 semanas com animais swiss webster....	25
Tabela 2 –	Modelo de infecção aguda de 5 dias com animais Black C57BL-6.....	26
Tabela 3 –	Presença dos genes dos fatores de virulência da amostra GBS90356.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA	American Diabetes Association
BHI	Brain heart infusion
CAMP	Christie Atkins Munch e Petersen
CC17	Complexo clonal 17
CEUA	Cômite de ética para uso de animais
CP	Cápsula polissacarídica
DI	Diabético Infectado
DNI	Diabético Não-Infectado
EGB	Estreptococos do grupo B
ITU	Infecções do trato urinário
IBRAG	Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes
NDI	Não-diabético infectado
NDNI	Não-diabético não-infectado
UFC	Unidades formadoras de colônias

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
×	Multiplicação
β	Beta
H ₂ O	Molécula da água
mL	Mililitro
cm	Centímetro
cm ³	Centímetros cúbicos
rpm	Rotações por minute
α	Alfa

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	14
1	OBJETIVOS.....	22
1.1	Geral.....	22
1.2	Específicos.....	22
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	23
2.1	Amostras bacterianas.....	23
2.2	Deteção 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 a Diabetes.....	27
2.7	Aferição da glicemia.....	27
2.8	Infecção com as amostras bacterianas.....	27
2.9	Morte dos animais.....	28
2.10	Análise de crescimento bacteriano.....	28
3	RESULTADOS.....	30
3.1	Deteção dos genes dos fatores de virulência.....	30
3.2	Aferição dos níveis de massa corporal e consumo alimentar.....	30
3.3	Recuperação das amostras utilizadas no experimento.....	32
3.4	Contagem das unidades formadoras de colônias no modelo crônico de experimento.....	33
3.5	Contagem das unidades formadoras de colônias no modelo agudo de experimento.....	37
3.6	Análise da capacidade de produção de biofilme.....	46
4	DISCUSSÃO.....	48
	CONCLUSÕES.....	54
	REFERÊNCIAS	55

INTRODUÇÃO

Estreptococcus do grupo B

O *Streptococcus agalactiae*, também denominado Estreptococos do grupo B (EGB), é um microrganismo pertencente à família *Streptococcaceae*, Gram positivo, encapsulado, β -hemolítico, anaeróbio facultativo, catalase e oxidase negativo, hipurato e CAMP positivo, que geralmente cresce em forma de cadeias cocóides (Nizet, 2002). A maioria dos estreptococos patogênicos possui antígenos carboidratos específicos que permite a classificação em grupos sorológicos. Estes antígenos podem ser extraídos das células bacterianas e a sua presença pode ser demonstrada através da reação com anticorpos específicos conjugados à partículas de látex e, conseqüente aglutinação na presença de antígenos homólogos (Lancefield, 1934). Além disso, o EGB é classificado em dez tipos capsulares (Ia, Ib, II-IX), de acordo com o arranjo específico de unidades repetidas de polissacarídeos presentes na cápsula (polímeros de glicose, galactose, ramnose, N-acetilglicosamina e ácido siálico) (Slotved *et al.*, 2007).

No Brasil, estudos demonstraram que os casos mais frequentes de infecção por EGB foram causados pelos tipos capsulares Ia, Ib, II, III e V, relacionados com infecções em recém-natos ou adultos imunocomprometidos. De acordo com as regiões geográficas brasileiras, o tipo capsular Ia foi prevalente na região Centro-Oeste; tipos Ia e II na região Sul; tipo Ib nas regiões Norte e Nordeste e os tipos II, III e V na região Sudeste (Fiolo *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2013; Soares *et al.*, 2013; Dutra *et al.*, 2014). Com relação às infecções urinárias pelo EGB não há dados brasileiros. Contudo, estudos demonstraram que os tipos V, Ia e III foram os mais prevalentes no Alabama, EUA (Ulett *et al.*, 2009). Na Itália e em Portugal, os tipos Ia, II, III e V foram predominantes, enquanto os tipos IV e VI foram raramente isolados de infecções nessas localidades (Gherardi *et al.*; 2017; Martins *et al.*; 2017). Desde a última década, observou-se uma distribuição mais balanceada entre os tipos Ia, III e V, que tem sua predominância alternada tanto em episódios de acometimento precoce e tardio quanto em casos clínicos em gestantes e indivíduos não-grávidos (Martins *et al.*; 2017).

O EGB é um microrganismo comensal e oportunista que compõem a microbiota normal dos tratos respiratório, gastrointestinal, bucal e urogenital humano, podendo ser transmitido sexualmente (Borger, 2005), além de colonizar outros animais como os bovinos e peixes, ocasionando mastite e meningoencefalite, respectivamente (Miranda *et al.*, 2018). A capacidade do EGB em colonizar, multiplicar e colonizar diferentes ambientes e hospedeiros depende da expressão de genes relacionados à virulência (Nakib *et al.*, 2011; Campo *et al.*, 2019).

Estrutura e virulência bacteriana

O EGB é um microorganismo que possui a capacidade de codificar uma grande diversidade de fatores de virulência que são fundamentais para sua patogenicidade em relação ao seu hospedeiro. Dentre esses fatores de virulência, as toxinas formadoras de poros e o polissacarídeo capsular têm sido alvo de estudos em todo o mundo (Cieslewicz et al., 2015). Sendo assim, a patogenicidade do EGB é um processo multifatorial que inclui a capacidade da bactéria em aderir, colonizar, invadir células epiteliais e endoteliais, realizar a multiplicação e evadir as defesas do sistema imune do hospedeiro (Nizet et al., 2002).

A instalação bem sucedida da infecção exige que os agentes patogênicos expressem, de forma adequada, seus produtos genômicos em resposta ao ambiente do hospedeiro durante a infecção. Os principais fatores de virulência relacionados ao EGB são: a cápsula polissacarídica, a hemolisina-citolisina, a C5a peptidase, as proteínas de ligação à matriz extracelular, as adesinas imunogênicas, o fator CAMP, a proteína C, hialuronidase, ácido lipoteicoico, *pili*, entre outros ainda em estudo (Liu e Nizet, 2004, Doran e Nizet., 2014, Rajagopal., 2009).

Assim como outros microrganismos, os isolados clínicos de EGB são recobertos por uma cápsula polisacarídica (CP, antígeno tipo-específico), um dos principais fatores de virulência apresentados pelo EGB (Cielslewicz et al.; 2005). A CP tem sido utilizada na identificação do tipo capsular em amostras de EGB, sendo constituída de polímeros de alto peso molecular de unidades repetidas de glicose, galactose e N-acetilglicosamina e ácido siálico (Koogan et al.; 1996). O ácido siálico presente na CP pertence a uma família de açúcares comumente presente na superfície das células de vertebrados, dessa forma, o EGB consegue cobrir a sua superfície com um epítipo comum ao hospedeiro, caracterizando um processo de mimetismo molecular importante para viabilizar a sua sobrevivência no organismo do hospedeiro infectado. Dessa forma, a CP pode ser classificada como o principal fator de virulência do EGB, capaz de promover aderência do microorganismo às superfícies epiteliais e inibir a fagocitose por macrófagos e neutrófilos. A maioria das amostras isoladas de EGB expressa a CP que confere proteção ao patógeno, inibindo a via alternativa do complemento e impedindo a fagocitose devido a presença do ácido siálico em sua composição (Chand et al.; 2014).

As toxinas formadoras de poros promovem a entrada do microorganismo patogênico em células hospedeiras e facilitam a sobrevivência intracelular, bem como sua disseminação

sistêmica. O fator CAMP (Christie Atkins Munch Peterson) é uma proteína de 23-25 kDa secretada pelo EGB que possui capacidade de se ligar às proteínas ancoradas ao glicosilfosfatidilinositol e promover a lise da célula hospedeira infectada (Lang et al.; 2017). Além da capacidade de lisar membranas, o fator CAMP pode interagir com a porção Fc das imunoglobulinas humanas das classes IgG e IgM fazendo que os anticorpos do hospedeiro se tornem ineficazes durante a opsonização bacteriana. Logo, a formação de poros contribui de forma significativa para a perda da integridade da barreira celular imposta pelo hospedeiro e sua consequente disseminação (Jurgens et al.; 1987; Rajagopal.; 2019).

Além da ação das toxinas formadoras de poros, durante a internalização na célula hospedeira, o EGB pode se ligar às proteínas da matriz extracelular (MEC), facilitando a interação com as integrinas presentes na superfície celular dos hospedeiros. Entre essas proteínas podem ser destacadas a fibronectina, fibrinogênio e laminina. Os genes das proteínas que interagem com o fibrinogênio são denominados *fbsA* e *fbsB*. De acordo com estudos anteriores, a proteína FbsA é responsável por promover a aderência, enquanto a FbsB é necessária para invadir as células do hospedeiro infectado pelo EGB. A colonização do hospedeiro é dada a partir da aderência do EGB à célula hospedeira. Além disso, o EGB pode clivar o fibrinogênio em fibrina, impedindo o reconhecimento e a fagocitose bacteriana, facilitando a evasão do sistema imune do indivíduo infectado. A ligação do EGB ao fibrinogênio da MEC é mediada pela FbsA e FbsB, a primeira é uma proteína de superfície encontrada apenas em algumas amostras de EGB; a FbsB, por sua vez, pode ser encontrada em todas as amostras dessa espécie (Mouslim et al.; 2014).

Explorando mais sobre as proteínas essenciais para colonização do EGB, o *lmb* é o gene que codifica a proteína Lmb, que se liga à laminina da células hospedeira favorecendo a aderência do patógeno. A proteína Lmb tem um papel essencial para a colonização do EGB ao epitélio danificado e subsequente translocação para a corrente sanguínea (Tenenbaum et al.; 2007; Kaczorek et al.; 2017).

O EGB é um microrganismo capaz de produzir uma variedade de enzimas, dentre elas pode-se destacar a enzima hialuronidase. A hialuronidase é uma proteína de 110kDa, classificada como uma endoglicosidase que cliva a ligação glicosídica entre os resíduos de N-acetil- β -Glucosamina e ácido D-glicurônico do ácido hialurônico. O ácido hialurônico é um glicosaminoglicano, principal componente do tecido conjuntivo e do sistema nervoso, sendo encontrado em altas concentrações na placenta, no líquido amniótico e nos pulmões. O gene da hialuronidase expresso pelo EGB é o *hylB* (Poyart et al.; 2012; Mahendroo.; 2012.; Akgul et al.; 2014).

Grande parte das amostras de EGB apresenta a β -hemolisina que funciona como uma citolisina, uma toxina pluripotente associada à membrana, sendo pouco detectada no meio extracelular e correlacionada com extensos danos ao epitélio e endotélio (Spellerberg et al.; 2000).

Os *pili* são filamentos ligados através de ligações covalentes que se projetam da superfície de bactérias Gram-positivas. (Soriani et al.; 2010). Os genes que codificam *pili* em EGB estão agrupados em duas ilhas genômicas: ilha *pili 1* (gene *PI-1*) e *pili 2* com duas variantes 2a (gene *PI-2a*) e 2b (gene *PI-2b*) (Rosini et al.; 2006). Alguns estudos também correlacionam a presença e expressão dos *pili* em EGB com a produção de biofilme.

Estudos epidemiológicos demonstraram a associação de amostras pertencentes ao tipo capsular III e sequência tipo 17 (ST-17) em infecções invasivas como meningite (Silvestre et al.; 2020). Essas amostras alocadas no complexo clonal 17 (CC17) possuem o histórico de serem classificadas como hipervirulentas. Estudos prévios demonstraram que a adesina HvgA é um dos fatores responsável por aumentar a capacidade das amostras ST-17 de atravessar a barreira hematoencefálica. Além disso, as duas ilhas de pilus previamente descritas também são encontradas na maioria das amostras ST-17. Em estudo recentes, amostras CC17 apresentaram a perda da ilha de *pilus 1* em cerca de 15% das amostras ST-17 analisadas enquanto a ilha de *PI-2b* estava presente em quase 100% das amostras analisadas (Périchon et al.; 2017 ; Mouslim et al.; 2014). Sendo assim, o *pilus PI-2b* foi associado principalmente com os isolados clínicos pertencentes ao CC17, causando a maioria das doenças invasivas neonatais. Dois estudos genômicos realizados no Canadá e na China demonstraram a conservação do locus *PI-2b* nas amostras isoladas CC17 e a perda do *PI-1* que parece ter sido substituído por novos elementos genéticos móveis que codificavam determinantes importantes na resistência antimicrobiana. Contudo, alterações genéticas nas proximidades do *PI-2b* não foram encontradas (Silvestre et al.; 2020).

Biofilme Bacteriano

A capacidade de produção de biofilme é um fator de virulência considerado como o mais importante mecanismo de colonização e fixação de microrganismos na natureza. As bactérias sobrevivem em sistemas naturais de uma forma totalmente diferente daquelas cultivadas em laboratórios em meios artificiais e controlados. Para persistir em ambientes hostis como em tecidos do hospedeiro, local onde haverá a presença de anticorpos e fagócitos ou até

superfícies inertes na presença de condições inóspitas, como luz ultravioleta, calor e frio, as bactérias se adaptaram formando biofilmes (Olson et al.; 2002). A ocorrência de infecções causadas pelo EGB pode estar associada a sua capacidade de produção de biofilme (Flint et al.; 2011).

Os biofilmes são sistemas biológicos com elevado nível de organização, que podem ser definidos como uma matriz extracelular constituída por exopolissacarídeos, proteínas e ácidos nucléicos. A composição química da matriz extracelular do biofilme é heterogênea e complexa. Os microrganismos capazes de formar biofilmes possuem a capacidade de construir comunidades estruturadas e funcionais, envolvidas por uma complexa matriz extracelular de moléculas poliméricas fixadas à superfícies bióticas ou abióticas. Assim, garantem o estabelecimento de um sistema de comunicação que coordena atividades metabólicas para benefício mútuo, assim como a produção de outros fatores de virulência (Wimpenny et al.; 1993; Uyen et al.; 2014).

O processo de produção de biofilme pode ser dividido em duas grandes etapas: reversível e irreversível (Moraes et al.; 2013). De forma mais detalhada, as etapas de desenvolvimento de um biofilme microbiano incluem: (i) a fixação inicial reversível a uma superfície; (ii) fixação irreversível e formação de microcolônias; (iii) maturação das microcolônias em um biofilme maduro envolto em exopolissacarídeos e, (iv) dispersão na qual as células individuais ou em grupos se desprendem do biofilme, retornando ao modo de vida planctônico e, portanto, fechando o ciclo de desenvolvimento do biofilme bacteriano (Stoodley et al.; 2002).

A capacidade de produção de biofilmes é variável, podendo ser influenciada por fatores como a característica do substrato (carga, composição química, hidrofobicidade), fatores ambientais (osmolaridade, pH, temperatura, administração de antibióticos) e características bacterianas (hidrofobicidade, mecanismos de adesão, carga da superfície) (Ho et al.; 2013). As bactérias capazes de formar biofilmes são responsáveis por infecções agudas e crônicas, tendo como exemplos clínicos a cárie, doença periodontal e endocardite (Manetti et al.; 2007). Além disso, há casos de infecções associadas a biofilmes bacterianos relacionados a dispositivos médicos, como cateteres, articulações artificiais, válvulas cardíacas prostéticas, próteses artificiais e lentes de contato. No mais, as bactérias em biofilmes demonstram menor susceptibilidade à ação de agentes antimicrobianos, dentre outros fatores, pela elevada densidade populacional e a proteção física conferida pela matriz extracelular. Proteínas com função de adesina, assim como mecanismos de regulação gênica, incluindo *quorum sensing*,

parecem contribuir para a formação, crescimento e regulação dos genes envolvidos na estrutura de biofilme (Lemke et al.; 2016).

O tratamento com antimicrobianos é capaz de eliminar somente células planctônicas, deixando as formas sésseis vivas para a propagação quando o tratamento for finalizado, tornando as células do biofilme mais resistentes aos antimicrobianos (Costa et al.; 2012). Além disso, a secreção de anticorpos opsonizantes e a produção de peróxido de hidrogênio são ineficazes, uma vez que não conseguem penetrar no biofilme devido à presença da matriz exopolimérica, a qual é responsável por evitar passagem e a consequente ação destas moléculas (Zimmerli et al.; 2004; Fux et al.; 2005).

Infecções ocasionadas por EGB

Os primeiros estudos sobre o EGB foram a partir de isolados de quadros de mastite bovina. A mastite bovina é um processo inflamatório das glândulas mamárias, podendo ser classificada como clínica ou subclínica (Martins *et al.*, 2010). A mastite clínica é uma das causas mais comuns de morte de vacas leiteiras, tendo respostas inflamatórias mais severas, alterando o aspecto da secreção láctea e promovendo mudanças visíveis no tecido mamário. A mastite subclínica não apresenta sintomas, tornando o animal um reservatório (Prestes *et al.*, 2003). O EGB só foi reconhecido como parte da microbiota normal de humanos em 1933, porém em 1960 foi considerado um dos principais agentes em quadros de infecções em recém-natos (Martinez *et al.*, 2000). A patogênese da infecção em neonatos tem início através da colonização assintomática do trato genital feminino, geralmente nos três primeiros meses de gravidez, onde ~25% das gestantes apresentam colonização por EGB (Gibbs *et al.*, 2004; Rocchetti *et al.*, 2011). O EGB atravessa as membranas placentárias, iniciando uma infecção no útero e alcançando o feto com indução de parto prematuro. A infecção por EGB também pode ocorrer através da aspiração do líquido amniótico e/ou fluido vaginal contaminado durante a passagem do neonato pelo canal do parto (Doran & Nizet, 2004).

A infecção por EGB em adultos, geralmente acomete idosos e pessoas com baixa imunidade e/ou doenças concomitantes, como o diabetes *mellitus*, doenças hepáticas e câncer (Muñoz *et al.*, 1997). Em relação aos adultos, o EGB pode estar associado às infecções cutâneas, pneumonia, infecção urinária, meningite, endocardite, bacteremia, entre outras (Lanotte *et al.*, 2013).

Infecções Urinárias

A infecção do trato urinário também descrita na literatura como ITU é a causa mais comum de infecções adquiridas na comunidade e nosocomiais em pacientes internados tanto na rede pública como particular (Najar *et al.*, 2009). De forma geral, as ITU podem apresentar-se clinicamente de forma sintomática ou assintomática, sendo classificadas como cistite quando a infecção acomete o trato urinário baixo e pielonefrite quando o alvo da infecção acometido é o trato urinário superior (Arrellano-Valdez *et al.*, 2014). Além disso, as ITU são denominadas complicadas quando estão presentes alterações estruturais ou funcionais do trato urinário ou quando a infecção se desenvolve em ambiente hospitalar (Najar *et al.*, 2009). Nos eventos de ITU não complicada, a *Escherichia coli* é a bactéria responsável pela maioria das infecções, enquanto nas ITU complicadas o espectro de bactérias envolvido é amplo, incluindo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas com elevada frequência de microrganismos multirresistentes. As ITU são definidas laboratorialmente pela presença de valores a partir de 100.000 UFC/mL nos exames de urina. Os sinais e sintomas associados às ITU podem incluir eventos de polaciúria, urgência miccional, disúria, hematúria e piúria (Roriz-Filho *et al.*, 2010).

Em países asiáticos, como a Tailândia, o EGB pertencente aos tipos capsulares III (46,4%) e V (21%) foram os mais encontrados com índice de mortalidade de ~11,6% (Vasikasin *et al.*; 2021). Contudo, na Arábia Saudita, o EGB foi o terceiro uropatógeno em ITU, enquanto a população mais afetada foi de mulheres com alguma comorbidade previamente diagnosticada, onde a diabetes foi a condição responsável por ocupar o primeiro lugar com 24,7%, seguido de gravidez (11,9%) (Balkhi *et al.*, 2018; Paveenkittiporn *et al.*, 2020).

Diabetes mellitus

A condição conhecida como diabetes faz parte de um grupo de doenças metabólicas caracterizadas entre outros sintomas por hiperglicemia resultante de defeitos na secreção do hormônio insulina, na ação da insulina ou em ambos os processos (Arrellano-Valdez *et al.*, 2014). A hiperglicemia crônica do diabetes está associada a danos a longo prazo como disfunção e falha de diferentes órgãos do organismo do indivíduo diabéticos, com manifestações especialmente em órgãos e estruturas como olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos (American Diabetes Association, 2011).

A grande maioria dos casos de diabetes se enquadra em duas grandes categorias etiopatogênicas. Na primeira categoria classificada a diabetes tipo 1, a causa é uma deficiência absoluta de secreção de insulina produzida pelo pâncreas. Os indivíduos com risco aumentado de desenvolver este tipo de diabetes podem frequentemente ser identificados por evidências sorológicas de um processo patológico autoimune que ocorre nas ilhotas pancreáticas e por marcadores genéticos. Na outra categoria da classificação, o diabetes tipo 2, a causa é uma combinação de resistência à ação da insulina produzida pelo pâncreas e uma resposta inadequada de secreção de insulina compensatória. No quadro da diabetes do tipo 2, há um grau de hiperglicemia suficiente para causar alterações patológicas e funcionais em vários tecidos-alvo, mas sem necessariamente apresentar sintomas clínicos, podendo estar presente por um longo período de tempo antes que o indivíduo receba o diagnóstico de diabetes tipo 2 (American Diabetes Association, 2020). Quase metade dos pacientes com diabetes apresenta disfunção da bexiga ou cistopatia, tal condição pode se manifestar em mulheres como hipersensibilidade (~39–61% das mulheres diabéticas) ou bexiga neurogênica. Em indivíduos do sexo masculino, pode se apresentar como sintomas do trato urinário inferior (~25% dos homens diabéticos). Além disso, o aumento do volume da próstata afeta a micção e o trato urinário (Arrellano-Valdez *et al.*, 2014).

A neuropatia diabética pode ser relacionada a alguns sinais e sintomas desenvolvidos pelo paciente diabético, como alterações na sensibilidade vesical, ocasionando diminuição da percepção do enchimento vesical, aumento do limiar para início da diurese, aumento da capacidade vesical e, conseqüente, retenção da urina por mais tempo. Essa última condição, pode possibilitar a criação de um microambiente propício ao desenvolvimento bacteriano, evento esse potencializado pela presença da hiperglicemia (Turan *et al.*, 2008; Vigliarolo *et al.*, 2019).

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo Geral

O EGB é responsável por um grande número de casos de infecções invasivas, sendo um dos principais microrganismos causadores de infecções do trato urogenital em adultos imunocomprometidos, principalmente portadores de diabetes mellitus. As razões para o aumento de infecções entre adultos não grávidos ainda não são bem compreendidas. Dessa forma, estudos que possam contribuir para o esclarecimento dos mecanismos utilizados pelo EGB para o desenvolvimento da patogênese e, conseqüentemente auxiliar no tratamento e redução da incidência de infecções invasivas por esse microrganismo são relevantes.

1.2 Objetivos específicos

- a) realizar a indução de diabetes mellitus em camundongos *Swiss Webster* e dos camundongos *Black* com a droga estreptozotocina;
- b) realizar a infecção por via intranasal e intraperitoneal dos animais diabéticos e não diabéticos com as amostras de EGB GBS90356, GBS90356 Δ bspC e COH1;
- c) implementar os modelos de infecção crônica e aguda por via intraperitoneal;
- d) avaliar a disseminação e a persistência bacteriana nos rins e bexiga dos animais submetidos aos modelos de infecção crônica e aguda;
- e) analisar o crescimento bacteriano nos rins, bexiga, sangue e urina nos dois modelos de infecção;
- f) analisar a capacidade de formação de biofilmes das amostras bacterianas antes e após infecção *in vivo* no modelo agudo.

2 METODOLOGIA

2.1 Amostras Bacterianas

As amostras bacterianas utilizadas neste estudo para infecção *in vivo* foram as seguintes: GBS90356 e sua mutante GBS90356 Δ bspC pertencente ao tipo capsular III e ST-17, isolada de líquor de paciente recém nascido e sequenciada pelo nosso laboratório. O microrganismo foi identificado e tipado por PCR de acordo com metodologia descrita por Poyart e colaboradores (2007). A terceira amostra utilizada no estudo foi a amostra COH1, tipo III utilizada como padrão da ST-17.

As culturas bacterianas foram armazenadas 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 bactéria foi crescida em placas de agar sangue contendo 5% de hemácias de carneiro (Plast Labor LTDA, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e, posteriormente, em meio BHI para padronização 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 fatores de virulência por PCR

Os seguintes genes de virulência para a amostra GBS90356 foram analisados por PCR: *lmb*, *hvgA*, *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 utilizados, seguindo os padrões utilizados anteriormente na tipagem capsular. 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 durante 35 ciclos. Um total de 10 μL de cada produto de PCR foi separado por eletroforese em gel de agarose para confirmar a amplificação bem sucedida.

2.3 Comitê de ética

Os estudos com animais foram realizados em consonância 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 010/2021.

2.4 Animais

Um total de 30 animais animais da linhagem *Swiss Webster* foram cedidos pelo Dr. Alexandre Dias, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, no Laboratório de Vacinas Bacterianas (LVB) - Fundação Oswaldo Cruz/RJ, com peso variando entre 30-40 gramas para a realização do modelo crônico de infecção por 5 semanas. Todos os animais foram submetidos à dieta padrão do Laboratório de Vacinas Bacterianas e livre acesso 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.

Na segunda fase do estudo, o modelo de infecção via intraperitoneal, um total de 30 animais Black - C57BL/6 foram cedidos pelo Biotério do Departamento de Microbiologia da UERJ para a realização do modelo de infecção aguda de 7 dias de infecção. Todos os animais foram submetidos à dieta padrão do biotério da microbiologia da UERJ e livre acesso à água e ração. Os dados de consumo e massa corporal foram aferidos a partir de uma escala realizada diariamente e, posteriormente, analisados estatisticamente utilizando o One-way ANOVA e pós teste *Newman-Keuls* no GraphPad Prisma.

2.5 Grupos de estudo

Para a realização da primeira fase, o modelo de infecção crônico de 5 semanas, os 30 camundongos *Swiss Webster* foram divididos em quatro grupos (Tabela 1): grupo 1 - Não diabético não-infectado (NDNI): animais não diabéticos e não infectados com a amostra

GBS90356 e com acesso livre à água e ração; grupo 2 - Não diabético infectado (NDI): animais infectados com a amostra GBS90356 e com acesso livre à água e ração; grupo 3 - Diabético não infectado (DNI): animais tratados com estreptozotocina, não infectados com a amostra GBS90356 e com acesso livre à água e ração e, grupo 4 - Diabético Infectado (DI): animais tratados com estreptozotocina, infectados com a amostra de GBS90356 e com acesso livre à água e ração. Os animais foram mantidos por cinco semanas após a indução da diabetes. Os animais resistentes à droga estreptozotocina não foram utilizados no estudo, assim como os animais que morreram em decorrência das complicações inerentes à diabetes.

Tabela 1 - Modelo de infecção crônica de 5 semanas com animais *Swiss Webster*

Nome do grupo	Sigla do grupo	Amostra utilizada	Via de infecção	Modelo de infecção
Não diabético não-infectado	NDNI	-	Intraperitoneal	Crônica
Não Diabético infectado	NDI	GBS90356	Intraperitoneal	Crônica
Diabético infectado	DI	GBS90356	Intraperitoneal	Crônica
Diabético não-infectado	DNI	-	Intraperitoneal	Crônica

Fonte: o autor, 2022

Na segunda fase do estudo *in vivo*, o modelo agudo, os 30 camundongos *Black* foram divididos em 8 grupos (Tabela 2): **grupo 1** - Não diabético não-infectado (NDNI): animais não diabéticos e não infectados com a amostra GBS90356 e com acesso livre à água e ração; **grupo 2** - Não diabético infectado (NDI - GBS90356): animais infectados com a amostra GBS90356 e com acesso livre à água e ração; **grupo 3** - Não diabético infectado (NDI - GBS90356 Δ bspC): animais infectados com a amostra Δ bspC e com acesso livre à água e ração; **grupo 4** - Não diabético infectado (NDI - COH1): animais infectados com a amostra COH1 e com acesso livre à água e ração; grupo 5 - Diabético não infectado (DNI): animais tratados com estreptozotocina, não infectados com a nenhuma amostra bacteriana e com acesso livre à água e ração; grupo 6 - Diabético Infectado (DI - GBS90356): animais tratados com estreptozotocina,

infectados com a amostra de GBS90356 e com acesso livre à água e ração; grupo 7 - Diabético Infectado (DI - GBS90356 Δ bspC): animais tratados com estreptozotocina, infectados com a amostra de GBS90356 Δ bspC e com acesso livre à água e ração; grupo 8 - Diabético Infectado (DI - COH1) : animais tratados com estreptozotocina, infectados com a amostra COH1 e com acesso livre à água e ração.

Tabela 2 - Modelo de infecção aguda de 5 dias com animais *Black C57BL-6*

Nome do grupo	Sigla do grupo	Amostra utilizada	Via de infecção	Modelo de infecção
Não diabético não-infectado	NDNI	-	Intraperitoneal	Aguda
Não Diabético infectado	NDI-GBS90356	GBS90356	Intraperitoneal	Aguda
Não Diabético infectado	NDI-GBS90356 Δ bspC	GBS90356 Δ bspC	Intraperitoneal	Aguda
Não Diabético infectado	NDI-COH1	COH1	Intraperitoneal	Aguda
Diabético infectado	DI-90356	GBS90356	Intraperitoneal	Aguda
Diabético infectado	DI-GBS90356 Δ bspC	GBS90356 Δ bspC	Intraperitoneal	Aguda
Diabético infectado	DI-COH1	COH1	Intraperitoneal	Aguda

Fonte: o autor, 2022

2.6 Indução da diabetes

A indução da diabetes nos camundongos utilizados nas duas fases do estudo *in vivo* foi realizada utilizando 180mg/kg de estreptozotocina (Sigma-Aldrich), diluída em tampão citrato 40 mM por via intraperitoneal. A aferição de peso de todos os animais foi realizada 2h antes da indução. Os animais não-diabéticos 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 normalmente, com o intuito de evitar a hipoglicemia neste período imediatamente após a indução.

2.7 Aferição da glicemia

A aferição da glicemia foi realizada 2h antes da indução da diabetes com a droga estreptozotocina e, no período 48h após a indução da diabetes, com o auxílio de um monitor de glicemia *AccuCheck Active* e fitas glicêmicas padronizadas. Os animais foram previamente pesados e marcados com uma caneta permanente para identificação durante todo o experimento. Para a dosagem glicêmica, os animais foram momentaneamente imobilizados manualmente e submetidos a uma pequena incisão na extremidade da cauda. O sangue foi coletado e posicionado nas fitas glicêmicas para leitura pelo glicosímetro. Foram considerados animais diabéticos aqueles que apresentaram um 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 as amostras bacterianas

Os camundongos foram inicialmente tratados com uma solução anestésica composta pela combinação de dois anestésicos de uso veterinário (0,17 mL de xylazina, 0,33 mL de ketamina, 2,83 mL solução salina) por via intraperitoneal. Cada animal recebeu entre 0,10 mL e 0,15 mL do anestésico de acordo com o seu peso. Posteriormente, os animais foram infectados com 30 µL da suspensão bacteriana crescida em meio BHI (0,2 UDO; $\sim 1 \times 10^5$ UFC/mL) por via intraperitoneal. Os grupos infectados foram mantidos em caixas separadas,

cerca de 2 a 4 animais por caixa, até o momento da morte do animal para retirada dos órgãos para estudo.

2.9 Morte dos animais

Após trinta e cinco dias contados após a infecção dos camundongos, os animais da primeira fase do estudo foram anestesiados, imobilizados manualmente e induzidos a urinar. Logo em sequência ao recolhimento da urina dos animais em estudo, este material foi plaqueado em placas de agar sangue contendo 5% de hemácias de carneiro para posterior contagem de UFC/mL. Posteriormente, com o animal ainda anestesiado, foi realizada uma pequena incisão na extremidade da cauda do camundongo e uma pequena amostra de sangue foi coletada de cada animal. O sangue coletado dos animais foi imediatamente plaqueado em placas de agar sangue contendo 5% de hemácias de carneiro para posterior contagem de colônias viáveis. Os animais da segunda fase do estudo, modelo agudo, passaram pelas mesmas etapas citadas anteriormente, porém após o intervalo de 5 dias de pós-infecção.

Os animais utilizados neste estudo foram sacrificados através da injeção de superdoses de drogas anestésicas (xilazina e ketamina) e, após isso, foi realizado o deslocamento cervical em cada animal. Os camundongos do estudo foram necropsiados para a retirada dos órgãos alvos do estudo: rins e bexiga. Parte dos órgãos foi reservada em refrigeração a 4°C em tubos cônicos (50 mL) contendo paraformaldeído a 4% para realização das análises histológicas. A parte restante dos órgãos foi colocada separadamente em tubos de vidro contendo solução salina e macerada utilizando um macerador de vidro individual para cada órgão. A diluição 1:1000 em solução salina 0,9% foi utilizada para plaqueamento em placa de agar acrescida com 5% de hemácias de carneiro e contagem bacteriana em UFC/mL.

2.10 Análise do crescimento bacteriano

As colônias apresentando as seguintes características de EGB: colônias lisas, côncavas, pequenas, brilhantes, circundadas por um halo de β -hemólise foram utilizadas nas contagens, sendo consideradas somente as placas contendo entre 25-300 colônias. As placas com um número de colônias superior a 300 foram descartadas para evitar erros de contagens, conforme

recomendação da Anvisa e do *Centers for Disease Control and Prevention* (Anvisa, 2008; CDC 2016). As placas que apresentaram contaminação por outro microrganismo também foram descartadas. Os grupos sem inóculo tiveram os órgãos igualmente plaqueados para verificar uma possível contaminação durante o experimento. Posteriormente, as colônias recuperadas de cada órgão foram submetidas aos testes de identificação bacteriana e tipagem capsular por PCR, além de terem sido armazenadas para experimentos futuros.

3 RESULTADOS

3.1 Detecção de genes de fatores de virulência

Os resultados da análise dos genes de fatores virulência da amostra GBS90356 através da técnica de PCR convencional estão representados na Tabela 3. Os dados demonstraram que a amostra GBS90356 tipo capsular III apresentou todos os fatores analisados, com exceção de *PI-2a*.

Tabela 3 - Presença de genes de fatores de virulência da amostra GBS90356

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

Legenda: gene presente (+) ausência do gene (-)

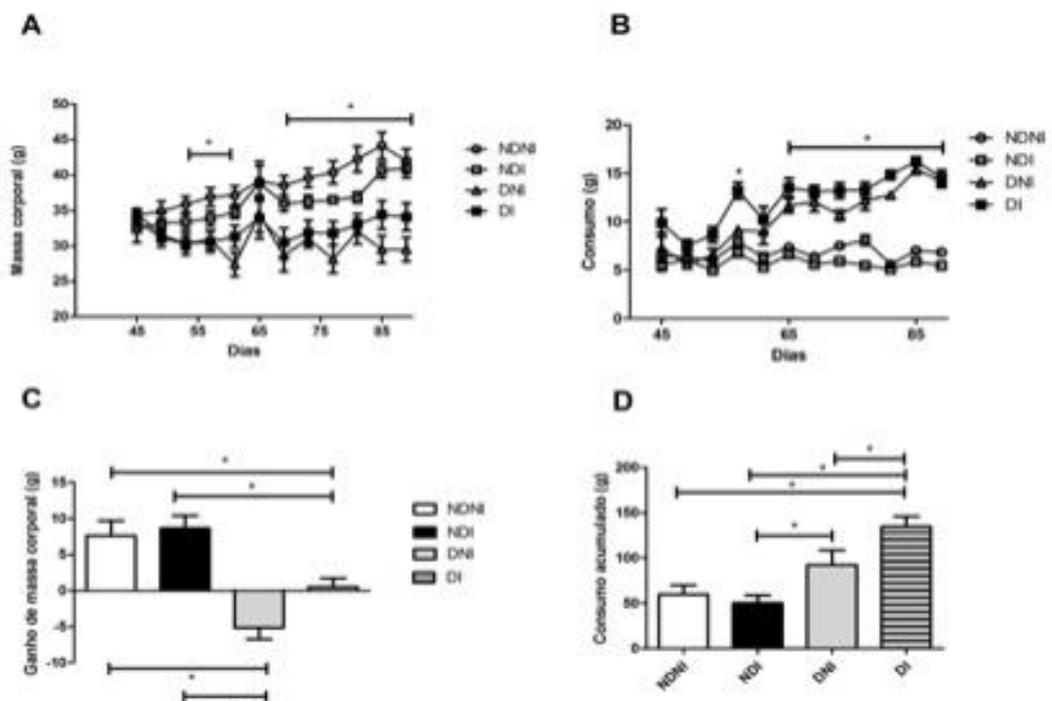
Fonte: o autor, 2022

3.2 Aferição dos níveis de massa corporal e consumo alimentar

A massa corporal e o consumo alimentar dos animais foram monitorados durante todo o experimento, a cada quatro dias no modelo crônico de infecção e diariamente no segundo modelo de infecção, o modelo agudo. Na Figura 1, pode-se acompanhar a evolução durante o

primeiro experimento, a partir de 49 dias pós-natal (PN49) os animais diabéticos passaram a apresentar uma redução significativa no peso em relação aos animais não-diabéticos não-infectados (NDNI) e não-diabéticos infectados (NDI) (Figuras 1A; $P < 0,0389$). Da mesma forma, a partir de PN53 os animais diabéticos infectados (DI) apresentaram redução no peso em relação aos animais NDNI e NDI (Figuras 1A; $P < 0,0017$). Ao final dos experimentos, ambos os grupos diabéticos apresentaram massa corporal reduzida ($P < 0,0002$), enquanto os grupos NDNI e NDI apresentaram um aumento de massa corporal em comparação aos valores iniciais (Figuras 1C; $P < 0,0002$). Durante todo o experimento, o consumo alimentar entre os animais diabéticos foi superior aos demais grupos não-diabéticos não-infectados e não-diabéticos infectados (Figuras 1B e 1D; $P < 0,0001$)

Figura 1 - Massa corporal e consumo alimentar dos animais utilizados no primeiro experimento.



Fonte: o autor, 2022

Figura 2 - Aparecimento de injúria na derme dos camundongos diabéticos infectados.



Legenda: Manifestação clínica causada pela infecção com a amostra GBS90356 após cinco semanas em camundongos diabéticos e infectados.

Fonte: o autor, 2022

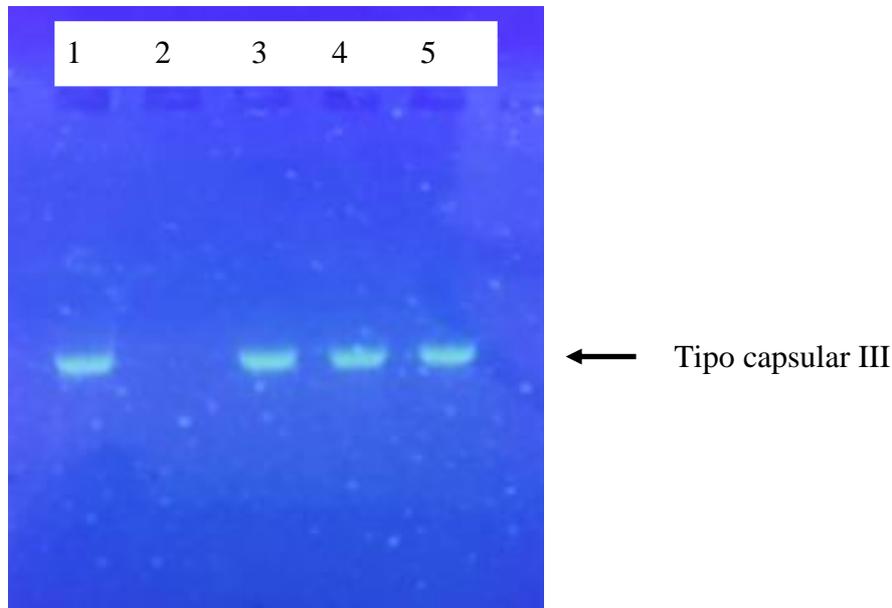
Após cinco semanas de infecção, os camundongos machos e fêmeas do primeiro modelo de infecção (modelo crônico) pertencentes ao grupo diabético infectado apresentaram injúrias na derme da região ilíaca, como observado na Figura 2.

3.3 Recuperação das amostras utilizadas no experimento

Logo após o procedimento de anestesia com solução anestésica a base de xilazina e quetamina, os animais foram imobilizados e foi realizada punção cardíaca dos animais, através dessa técnica foi aspirada a quantidade de 0,2 a 0,5 mL de sangue diretamente do coração dos animais, o sangue coletado foi armazenado em eppendorfs estéreis, os quais foram armazenados em gelo e logo depois conduzidos ao laboratório para serem plaqueados.

O sangue coletado foi plaqueado com o objetivo de recuperar as amostras inoculadas nos animais no início do experimento. Após o plaqueamento, as placas ficaram durante 48h encubadas em uma estufa a 36°C. As amostras visualmente identificadas como EGB foram coletadas e seguiram para a identificação através da técnica de PCR.

Figura 3 - PCR realizado com as amostras recuperadas dos animais *Black* imediatamente após a morte dos animais.



Legenda: PCR para tipagem das amostras recuperadas dos animais.

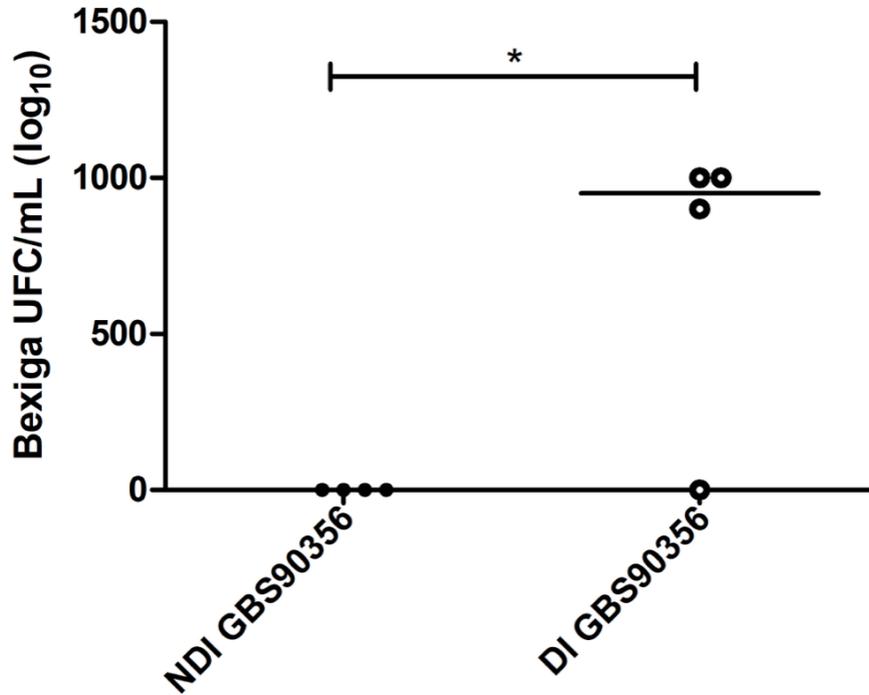
Slot 1: padrão, Slot 3: GBS90356, Slot 4: GBS90356bspC, Slot 5: COH1

Fonte: o autor, 2022

3.4 Contagem das unidades formadoras de colônias no modelo crônico de experimento

A inoculação da amostra GBS90356 realizada por via intraperitoneal obteve sucesso em todos os animais diabéticos infectados durante os dois modelos de infecção, com crescimento bacteriano em diferentes órgãos. A viabilidade bacteriana (UFC/mL) proveniente dos macerados dos rins e bexigas, bem como a contagem decorrente do plaqueamento sanguíneo e urinário foram realizados para determinar a efetividade da infecção intraperitoneal e a capacidade de disseminação através da corrente sanguínea. Houve crescimento na bexiga ($\sim 1 \times 10^3$ UFC/mL; Figura 4), rins ($\sim 1,4 \times 10^5$ UFC/ mL; Figura 5), sangue (Figura 6) e urina (Figura 7) em todos os animais diabéticos infectados. Não houve identificação de crescimento bacteriano nos grupos de animais não diabéticos, após 5 semanas.

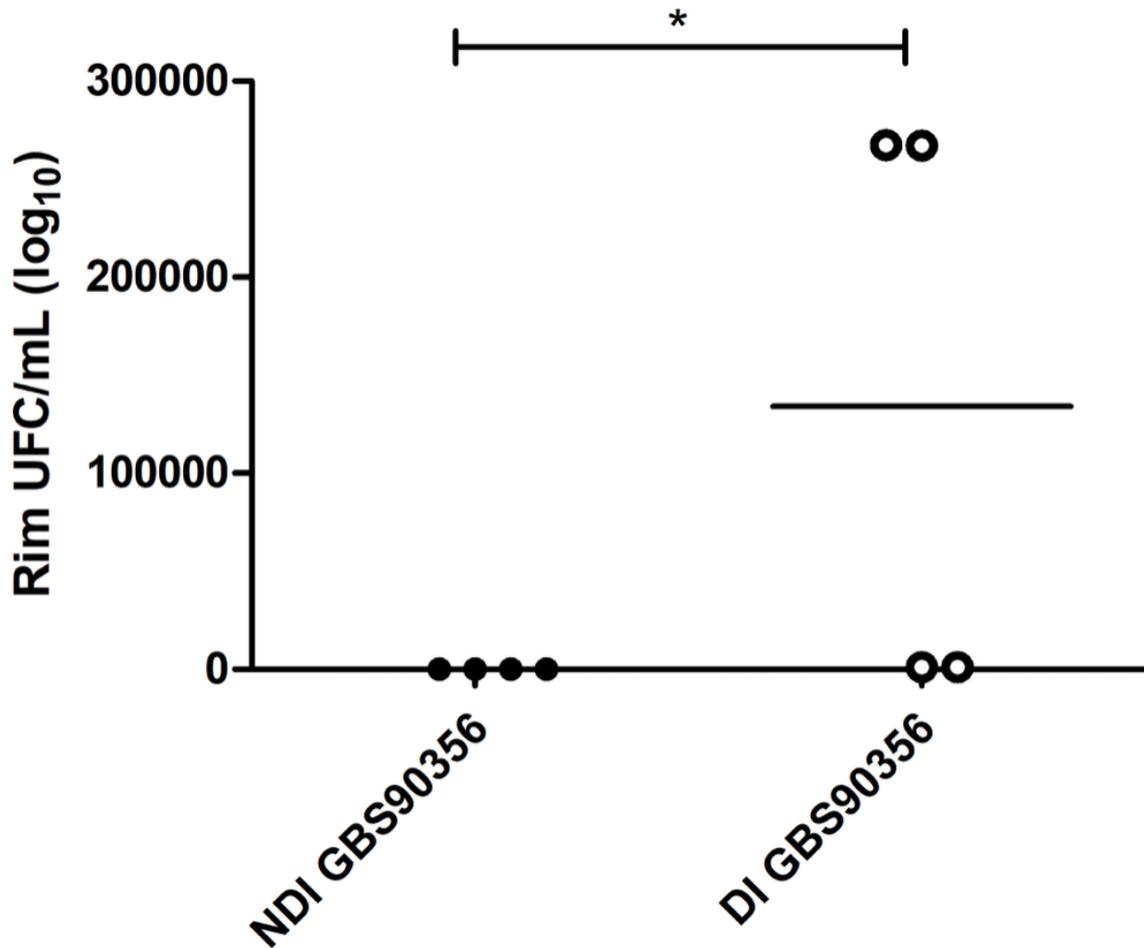
Figura 4 - Contagem das unidades formadoras de colônias (UFC/mL) dos macerados da bexiga dos animais infectados pela amostras GBS90356 no modelo de experimento crônico de 5 semanas.



Legenda: Quantificação das unidades formadoras de colônia nos macerados da bexiga de camundongos diabéticos infectados (NDI) e diabéticos infectados (DI), após cinco semanas. Não houve crescimento nos animais não diabéticos infectados. * $P < 0,05$, teste t no GraphPad Prism.

Fonte: o autor, 2022

Figura 5 - Contagem das unidades formadoras de colônias (UFC/mL) dos macerados dos rins dos animais infectados pela amostras GBS90356 no modelo de experimento crônico de 5 semanas.

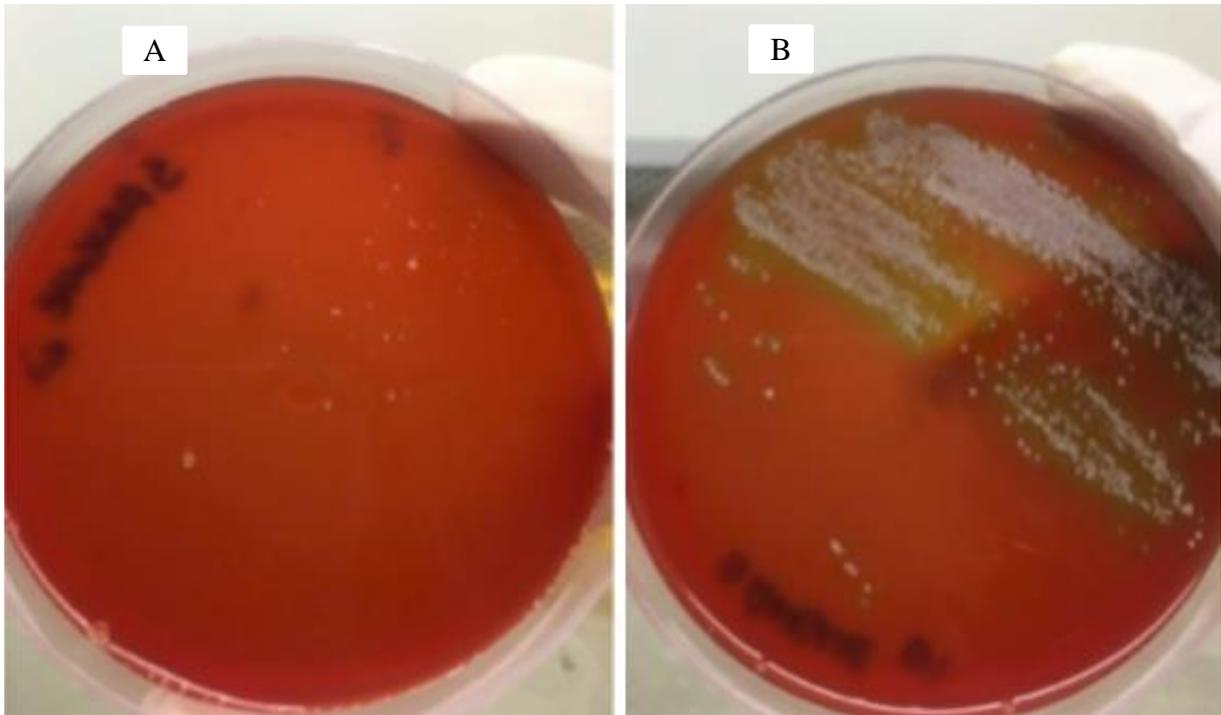


Legenda: Quantificação das unidades formadoras de colônia nos macerados renais de camundongos não diabéticos infectados (NDI) e diabéticos infectados (DI), após cinco semanas. Não houve crescimento nos animais não diabéticos infectados. * $P < 0,05$, teste t no GraphPad Prism.

Fonte: o autor, 2022

A amostra GBS90356 apresentou elevado crescimento no sangue de camundongos DI (Figura 6). Contudo, não foi possível realizar a quantificação, pois o número de colônias presentes foi superior a 300 colônias. Desta forma, nos próximos ensaios, serão realizadas diluições seriadas para melhor contagem do material plaqueado.

Figura 6 - Detecção de crescimento bacteriano no sangue dos camundongos infectados.

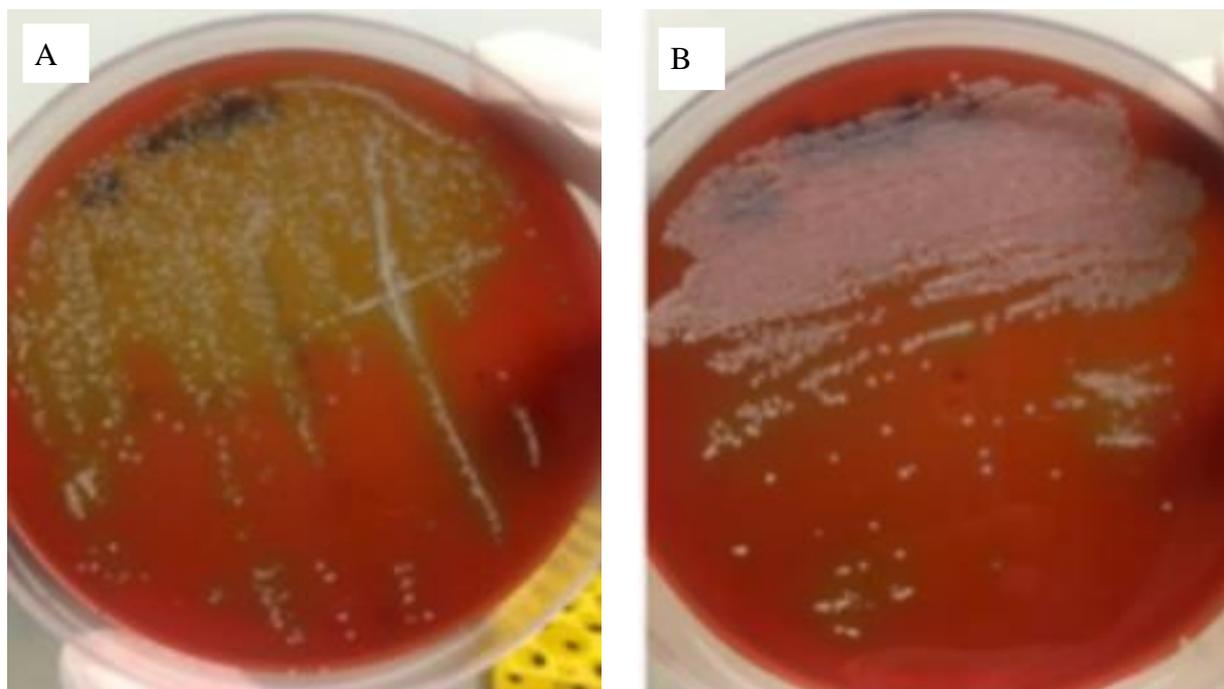


Legenda: Crescimento bacteriano no sangue exemplificado pelos plaqueamentos da amostra GBS90356 em (A) camundongo não diabético não infectado - NDNI e (B) diabético infectado - DI.

Fonte: o autor, 2022

Não houve crescimento bacteriano na urina dos camundongos não diabéticos não infectados (NDNI). Contudo, nos camundongos diabéticos infectados (DI) e nos animais não-diabéticos infectados (NDI) não foi possível realizar a quantificação devido ao elevado número de colônias presentes nas placas de agar sangue (Figura 7). Desta forma, experimentos futuros com diluições seriadas estão em andamento.

Figura 7 - Detecção de crescimento bacteriano na urina dos camundongos infectados



Legenda: Crescimento bacteriano no sangue exemplificado pelos plaqueamentos da amostra GBS90356 em (A) camundongo não diabético infectado - NDNI e (B) diabético infectado - DI.

Fonte: o autor, 2022

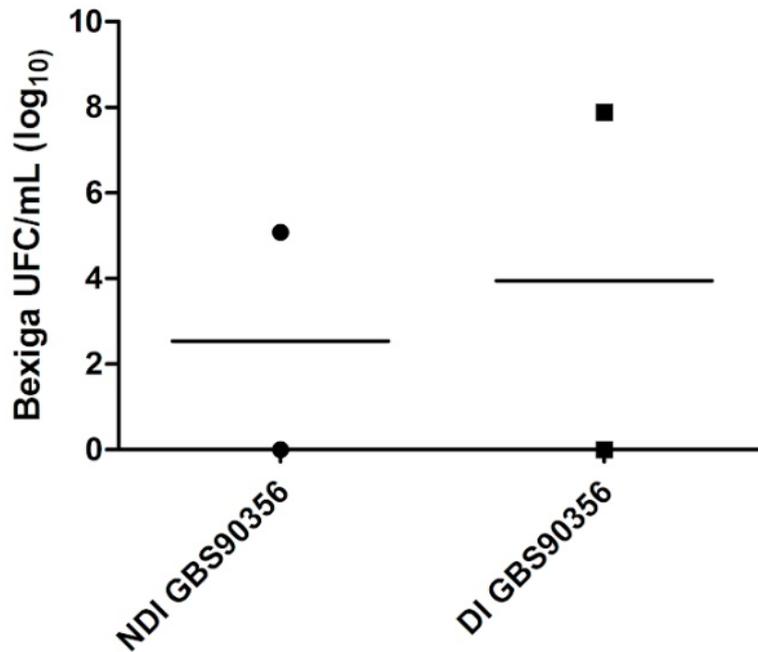
3.5 Contagem das unidades formadoras de colônias no modelo agudo de experimento

No segundo modelo de infecção, a inoculação das amostras GBS90356, GBS90356 Δ bspC e COH1 foi realizada por via intraperitoneal que também obteve sucesso em todos os animais infectados com crescimento bacteriano em diferentes órgãos (Figuras 8-13). A viabilidade bacteriana (UFC/mL) proveniente dos macerados da bexiga (Figura 8) e rins (Figura 9), bem como a contagem decorrente do plaqueamento sanguíneo e urinário, foram realizados para determinar a efetividade da infecção intraperitoneal e a capacidade de disseminação através da corrente sanguínea. Na bexiga, a contagem alcançou o valor de 1×10^3 UFC/mL para a amostra GBS90356 no grupo NDI, enquanto o grupo DI apresentou a contagem de 1×10^4 UFC/mL (Figura 8; *P <0,05). Da mesma forma, a contagem de colônias viáveis nos rins macerados foi maior nos animais diabéticos, alcançando o valor de 1×10^3 UFC/mL no grupo NDI pela amostra GBS90356, enquanto o grupo DI alcançou a contagem de 1×10^5 UFC/mL (Figura 9; *P <0,05). Quando os animais foram infectados com a amostra GBS90356 Δ bspC, os resultados demonstraram que no grupo NDI, o macerado da bexiga apresentou contagem bacteriana no valor de 1×10^5 UFC/mL; contudo, no grupo DI, a contagem

alcançou o valor de 1×10^3 UFC/mL (Figura 10; *P <0,05). Nos macerados dos rins, o grupo NDI apresentou contagem no valor de 1×10^5 UFC/mL e o grupo DI apresentou 1×10^3 UFC/mL (Figura 11; *P <0,05). Contudo, a infecção dos animais com a amostra bacteriana COH1 demonstrou resultados bastante diferentes. Não houve crescimento bacteriano nos macerados de bexigas, já no macerado referente ao órgão rim, houve crescimento bacteriano significativo significativo (Figuras 12 e 13, respectivamente). Da mesma forma, neste modelo de infecção, não houve contagem de unidades bacterianas viáveis no sangue e na urina dos animais NDI e DI com as amostras bacterianas, diferentemente do evidenciado no modelo crônico de 5 semanas..

A análise comparativa dos macerados de bexiga e rins dos animais infectados pelas diferentes amostras bacterianas está representada nas Figuras 14 e 15, respectivamente.

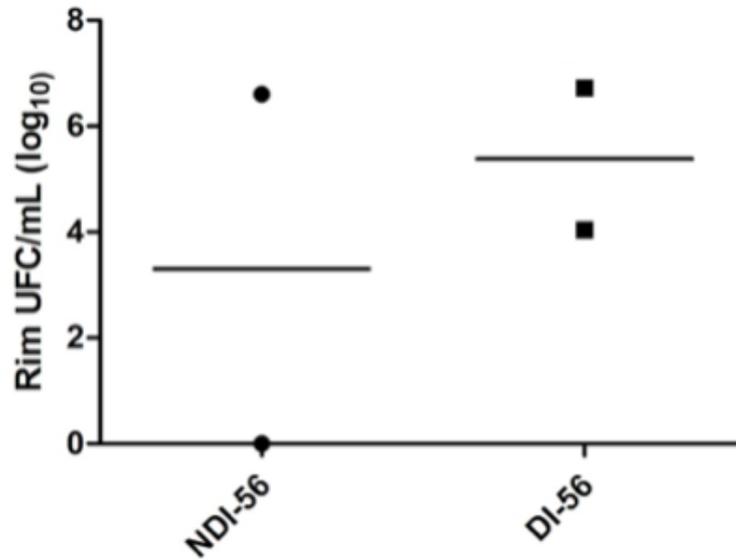
Figura 8 - Contagem das unidades formadoras de colônias (UFC/mL) dos macerados de bexiga dos animais infectados com amostra GBS90356 no modelo de infecção aguda.



Legenda: Quantificação das unidades formadoras de colônia nos macerados da bexiga de camundongos não diabéticos infectados (NDI) e diabéticos infectados (DI) pela amostra bacteriana GBS90356, após cinco dias de infecção. Houve crescimento nos animais não diabéticos infectados e nos animais diabéticos infectados. * $P < 0,05$, teste t no GraphPad Prisma.

Fonte: o autor, 2022

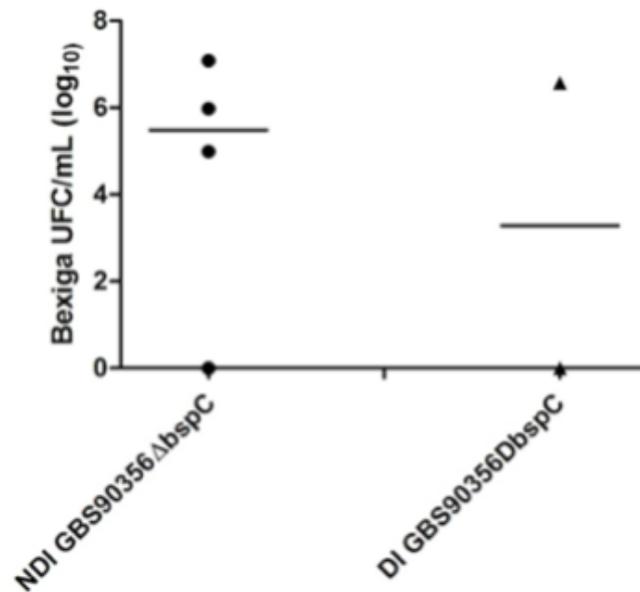
Figura 9 - Contagem das unidades formadoras de colônias (UFC/mL) dos macerados de rins dos animais infectados com amostra GBS90356 no modelo de infecção aguda.



Legenda: Quantificação das unidades formadoras de colônia nos macerados da rim de camundongos não diabéticos infectados (NDI) e diabéticos infectados (DI) pela amostra bacteriana GBS90356, após cinco dias de infecção. Houve crescimento nos animais não diabéticos infectados e nos animais diabéticos infectados. * $P < 0,05$, teste t no GraphPad Prisma.

Fonte: o autor, 2022

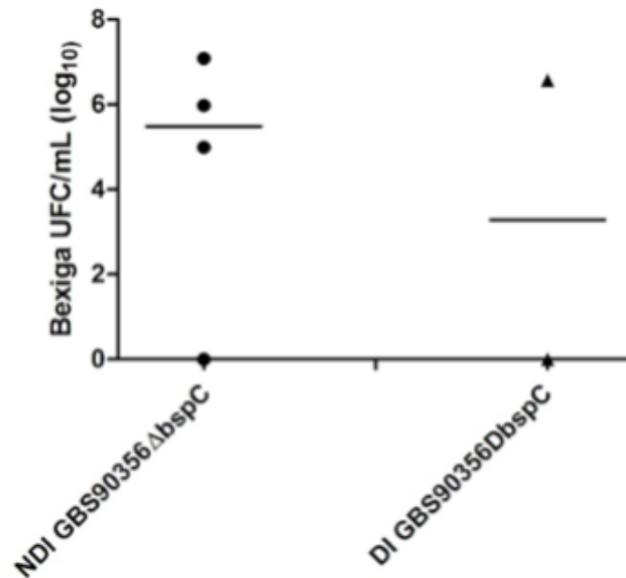
Figura 10 - Contagem das unidades formadoras de colônias (UFC/mL) dos macerados de bexiga dos animais infectados com a amostra GBS90356 Δ bspC no modelo de infecção aguda.



Legenda: Quantificação das unidades formadoras de colônia nos macerados das bexigas de camundongos não diabéticos infectados (NDI) e diabéticos infectados (DI) pela amostra bacteriana GBS90356 Δ bspC, após cinco dias de infecção. Houve crescimento nos animais não diabéticos infectados e nos animais diabéticos infectados. * $P < 0,05$, teste t no GraphPad Prisma.

Fonte: o autor, 2022

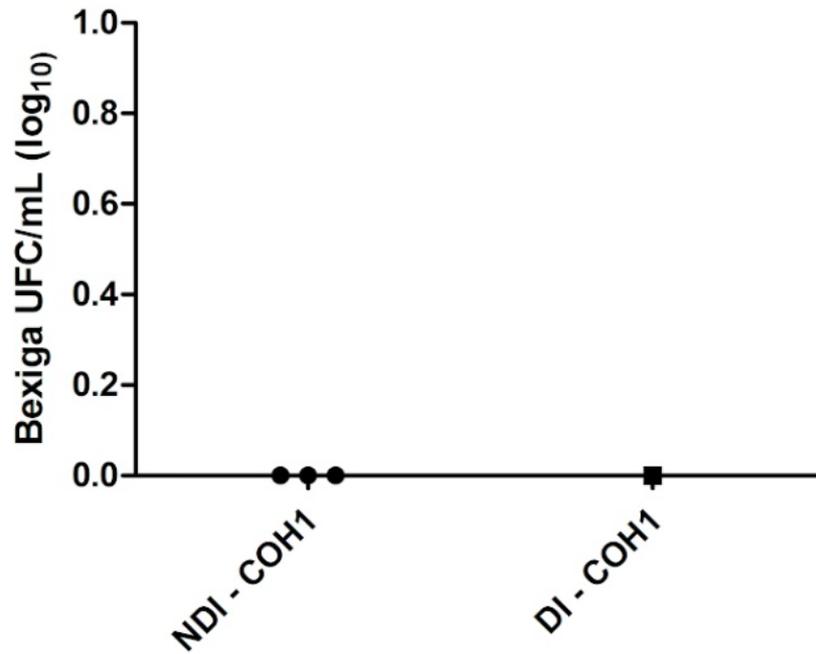
Figura 11 - Contagem das unidades formadoras de colônias (UFC/mL) dos macerados dos rins dos animais infectados com a amostra GBS90356 Δ bspC no modelo de infecção aguda.



Legenda: Quantificação das unidades formadoras de colônia nos macerados dos rins de camundongos não diabéticos infectados (NDI) e diabéticos infectados (DI) pela amostra bacteriana GBS90356 Δ bspC, após cinco dias de infecção. Houve crescimento nos animais não diabéticos infectados e nos animais diabéticos infectados. * $P < 0,05$, teste t no GraphPad Prisma.

Fonte: o autor, 2022

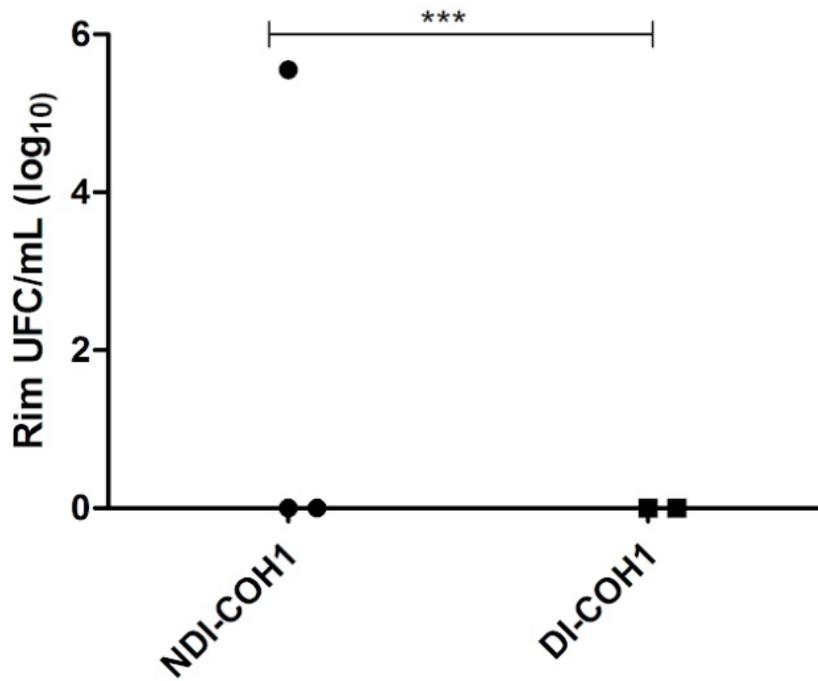
Figura 12 - Contagem das unidades formadoras de colônias (UFC/mL) dos macerados de bexiga dos animais infectados com a amostra COH1 no modelo de infecção aguda.



Legenda: Quantificação das unidades formadoras de colônia nos macerados de bexiga de camundongos não-diabéticos infectados (NDI) e diabéticos infectados (DI) pela amostra bacteriana COH1, após cinco dias de infecção. Não houve crescimento nos animais não diabéticos infectados e nos animais diabéticos infectados. *P<0,05, teste t no GraphPad Prism.

Fonte: o autor, 2022

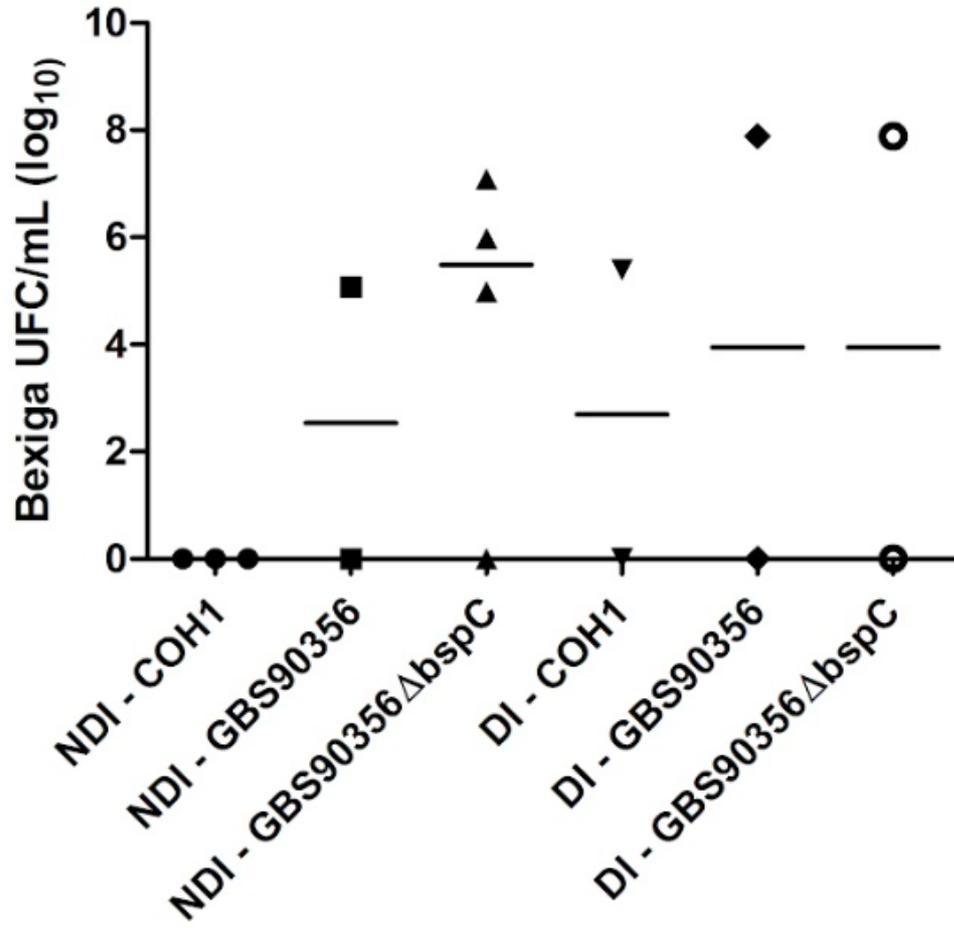
Figura 13 - Contagem das unidades formadoras de colônias (UFC/mL) dos macerados dos rins dos animais infectados com a amostra COH1 no modelo de infecção aguda.



Legenda: Quantificação das unidades formadoras de colônia nos macerados dos rins de camundongos não-diabéticos infectados (NDI) e diabéticos infectados (DI) pela amostra bacteriana COH1, após cinco dias de infecção. Não houve crescimento nos animais não diabéticos infectados e nos animais diabéticos infectados. *** $P < 0,001$, teste t no GraphPad Prism.

Fonte: o autor, 2022

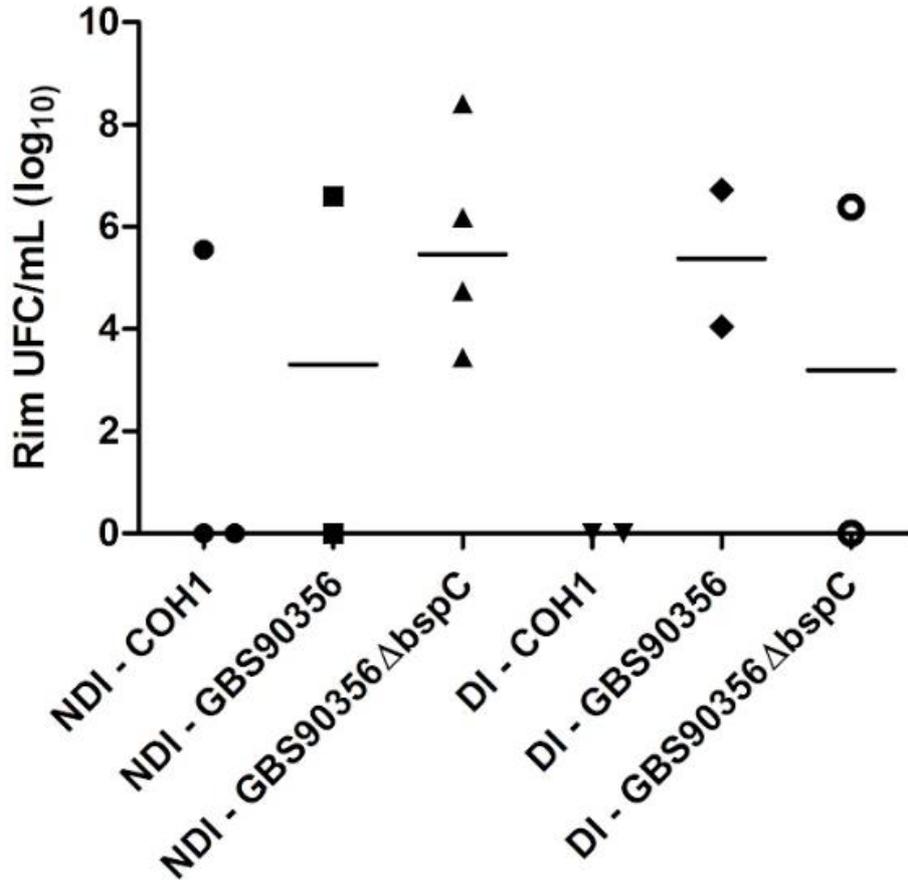
Figura 14 - Comparativo da contagem das unidades formadoras de colônias (UFC/mL) dos macerados de bexiga de todos os animais infectados com as amostras bacterianas GBS90356, GBS90356 Δ bspC e COH1 no modelo de infecção aguda.



Legenda: Quantificação das unidades formadoras de colônia nos macerados de bexiga de todos os camundongos não diabéticos infectados (NDI) no modelo de experimento agudo de cinco dias pelas amostras de EGB GBS90356, GBS90356 Δ bspC e COH1, após cinco dias de infecção. *P<0,05, teste t no GraphPad Prism.

Fonte: o autor, 2022

Figura 15 - Comparativo da contagem das unidades formadoras de colônias (UFC/mL) dos macerados de rins de todos os animais infectados com as amostras bacterianas GBS90356, GBS90356 Δ bspC e COH1 no modelo de infecção aguda.



Legenda: Quantificação das unidades formadoras de colônia nos macerados de rins de todos os camundongos não diabéticos infectados (NDI) no modelo de experimento agudo de cinco dias pelas amostras de EGB GBS90356, GBS90356 Δ bspC e COH1, após cinco dias de infecção. * $P < 0,05$, teste t no GraphPad Prism.

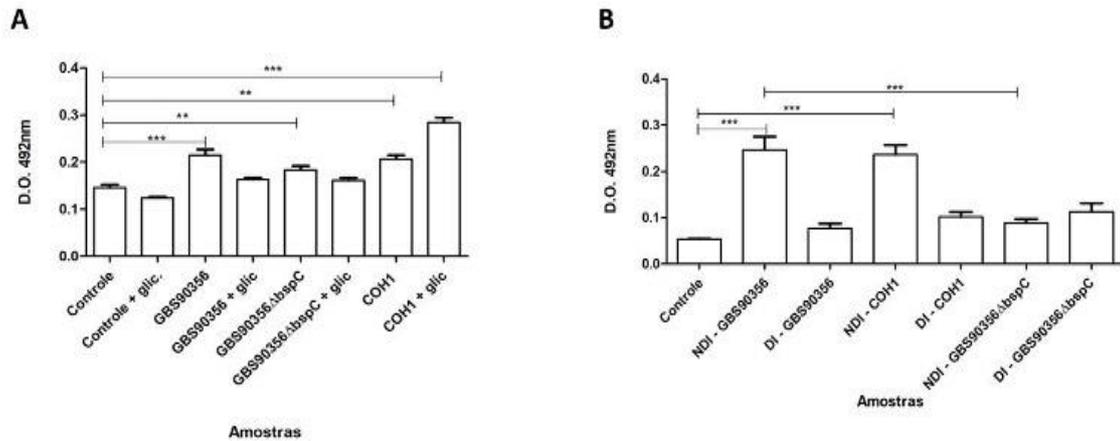
Fonte: o autor, 2022

3.6 Análise da capacidade de produção de biofilme

A análise do biofilme bacteriano foi realizada com as amostras antes e após infecção no modelo de infecção aguda. As amostras GBS90356, COH1 e GBS90356 Δ bspC foram recuperadas dos animais infectados após a morte dos animais no 5 dia do experimento (Figura 16). As amostras foram plaqueadas em placas de 96 poços, o experimento se deu com meio de cultura distintos TSB e também em duas condições diferentes, no meio com adição de glicose

para mimetizar o microambiente hiperglicêmico e no meio de cultura sem a adição desse açúcar (normoglicêmico) para mimetizar o organismo de um indivíduo saudável.

Figura 16 - Cinética da produção de biofilme das amostras de EGB após 24 horas de incubação em TSB.



Legenda: Cinética da produção de biofilme bacteriano pelas amostras GBS90356, COH1 e GBS90356ΔbspC após 24 horas de incubação em meio TSB com e sem adição de glicose (normoglicêmico). (A) Produção de biofilme das amostras bacterianas antes da infecção dos animais. (B) Produção de biofilme das amostras bacterianas recuperadas após a morte dos animais infectados.

Fonte: o autor, 2022

4 DISCUSSÃO

Estudos publicados nos últimos anos apresentam o EGB como uma das principais bactérias envolvidas em infecções invasivas em neonatos, adultos imunocomprometidos e idosos (Santos et al.; 2013). Resultados disponíveis nos bancos de dados internacionais evidenciam que aproximadamente 30% das mulheres são portadoras de EGB na região retal e/ou vaginal podendo ser classificada como permanente, intermitente ou transitória (Verani & Schrang et al.; 2010). Dados também demonstraram que 52,4% dos neonatos nascidos de mulheres portadoras de EGB apresentaram colonização por este patógeno (Madzi Handl et al.; 2011). Mesmo com os avanços referentes às técnicas de profilaxia neonatal e dos tratamentos recomendados pelo CDC (CDC, 2020), a taxa de doenças invasivas causadas por esse patógeno em adultos com doenças crônicas, principalmente diabetes mellitus, tem apresentado um aumento considerável. No período entre 1990-2000, o número de casos reportados cresceu de 4,1 para 7,2 casos a cada 100.000 adultos não-grávidos (Farley et al.; 1993; Munoz et al.; 1997; Farley.; 2001; Miranda et al.; 2018).

O EGB possui inúmeros mecanismos que contribuem para a patogenicidade e virulência (Farley et al.; 2001). A capacidade de sobrevivência e multiplicação do microrganismo em seu hospedeiro requer a expressão e regulação de diversos fatores de virulência que auxiliam na capacidade do patógeno em aderir, invadir, formar biofilme e induzir os processos de necrose e/ou apoptose em células hospedeiras. Desta forma, a identificação desses fatores é de crucial importância para a melhor compreensão da patogenicidade dessa bactéria (Lione et al.; 2014; Korir et al.; 2014).

A amostra utilizada neste estudo, GBS90356, tem sido utilizada no LBMFE como modelo para interação com várias linhagens celulares (Miranda et al.; 2018), sendo considerada uma amostra padrão do laboratório. A amostra apresentou a amplificação para diferentes genes pesquisados: *lmb*, *hgvA* (ST-17), *PI-1*, *PI-2b*, *fbsA*, *fbsB* e *hylB*; o único gene não amplificado foi o correspondente ao *PI-2a*. Sendo assim, de acordo com os dados disponíveis na literatura, a presença desses fatores de virulência demonstra que a amostra GBS90356 é altamente patogênica.

O EGB é uma bactéria capaz de se ligar a proteínas da matriz extracelular como a fibronectina e à laminina. A fibronectina é uma glicoproteína encontrada de forma solúvel em fluidos corporais e na forma insolúvel como um componente da superfície celular, membranas basais e da matriz extracelular. A fibronectina solúvel no plasma é capaz de interagir com

diversas bactérias e pode servir como um receptor de aderência bacteriana às células epiteliais do hospedeiro (Hynes et al.; 2010).

Alguns estudos já relataram a capacidade do EGB se ligar ao fibrinogênio (Fbg) a partir do isolamento do gene *fbsA* (Schubert et al.; 2012). O fibrinogênio é uma proteína humana plasmática, envolvida no sistema de cascata de coagulação através da sua conversão em fibrina insolúvel. A síntese do fibrinogênio é regulada durante a inflamação tecidual ou sob a exposição do tecido ao estresse e infecções sistêmicas (Davis et al.; 2001; Mosesson.; 2005). Dados publicados demonstraram que amostras mutantes para *fbsA* perderam a capacidade de se ligar ao fibrinogênio ou de induzir a agregação plaquetária quando comparadas às amostras não-mutadas (Pietrocola et al.; 2004). Estudo publicado em 2004, demonstrou uma outra variação de proteína ligante ao fibrinogênio, codificada pelo gene *fbsB*. Esses dois genes foram amplificados na amostra GBS90356 utilizada no presente estudo.

Além disso, a presença da lipoproteína Lmb na superfície do EGB medeia a aderência do patógeno à laminina humana. Pesquisas verificaram que amostras de EGB mutantes para o gene *lmb* (Δ Lmb) apresentaram uma menor taxa de aderência à laminina placentar humana, indicando que a Lmb possui ligação direta com a capacidade invasiva do EGB em neonatos (Spellerberg et al., 1999). Tais propriedades de interação com proteínas da matriz extracelular possivelmente favorecem a aderência à superfície celular pelo EGB, podendo induzir alterações relevantes na capacidade invasiva do patógeno em células hospedeiras, em tecidos danificados e coágulos sanguíneos (O'Neill et al.; 2008; Bonifati et al.; 2008).

Analisando a linhagem genética da amostra amostra GBS90356 que apresenta o gene *hvgA* (ST-17), podemos considerá-la como hiperinvasiva (Hoshina et al.; 2002). Experimentos realizados através da técnica de MLST foram capazes de demonstrar que a sequência ST-17 define um clone com "altamente virulento e invasivo", característica presente na maioria das amostras pertencentes ao tipo capsular III, muito associada às infecções invasivas neonatais (Lamy et al.; 2006). Dados publicados pelo nosso grupo demonstraram a elevada capacidade invasiva da amostra GBS90356 em diferentes linhagens celulares (Costa et al.; 2011; Soares et al.; 2013), corroborando os dados de outras pesquisas de que as amostras classificadas como tipo III e ST-17 apresentam maior capacidade de virulência.

O gene *hylB* identificado na amostra GBS90356 é responsável por codificar a protease hialuronidase. Amostras de EGB mutantes para hialuronidase foram menos virulentas comparadas às amostras selvagens (Yildirim, Fink, Lammler, 2002). O EGB também é um patógeno responsável por infecção em outros seres vivos; em tilápias, a presença do gene *hylB* mostrou maior virulência do microrganismo, assim como o rápida disseminação e identificação

de sinais clínicos graves como exoftalmia com opacidade da córnea, lesões na pele e na base das nadadeiras (Godoy et al., 2013).

Em relação às estruturas de *pili*, amostras de EGB de origem humana apresentam a ilha *pilus 1* em combinação com um dos variantes de *PI-2* (podendo ser a ou b), tal característica foi confirmada pela técnica de PCR realizada na amostra GBS90356 utilizada neste trabalho (Springman et al.; 2014). Os *pili* tem sido relatados como fatores que possibilitam a perpetuação bacteriana através da capacidade de formação de biofilme. Os biofilmes podem ser caracterizados como sistemas biológicos com um alto nível de organização onde a formação bacteriana é estruturada e coordenada em comunidades funcionais em uma matriz de exopolissacarídeos em superfícies bióticas e abióticas (Pompilio et al.; 2008; Gomes et al.; 2009). Casos de infecção associados aos biofilmes bacterianos podem incluir infecções associadas a dispositivos médicos, como cateteres, válvulas cardíacas, próteses e articulações artificiais e lentes de contato (Miranda et al.; 2018). A estrutura formada pelo biofilme bacteriano confere proteção aos microrganismos em relação a fagocitose pelas células do sistema do sistema imune do hospedeiro, bem como proteção em relação à ativação do sistema complemento (Schubert et al.; 2012; Fux et al.; 2005). Além disso, essa estrutura dificulta a passagem dos antimicrobianos, uma vez que esses fármacos encontram dificuldade em ultrapassar a matriz exopolimérica do biofilme (Zimmerli et al.; 2014). Sendo assim, diversos estudos possuem como objetivo o estudo da capacidade de formação de biofilme pelo EGB, inclusive relacionando o gênero *Streptococcus* a uma série de doenças bucais como cárie e doença periodontal (Pereira et al.; 2006). Estudo publicado pelo nosso grupo demonstrou que a produção de biofilme pelo EGB favoreceu o estabelecimento do processo infeccioso e que o pH ácido pode contribuir para o aumento da produção de biofilme (Miranda et al.; 2018). Além disso, a importância de 5% de CO₂ para a produção de biofilme por diferentes amostras de EGB também foi previamente reportada (Bonsaglia et al., 2019).

A literatura disponível nas bases de dados ainda salienta que mesmo os pacientes com excelente resposta imune celular e humoral, infecções relacionadas a biofilmes bacterianos são raramente resolvidas pelos mecanismos de defesa do hospedeiro. Na realidade, essa forma de infecção é geralmente crônica e de difícil tratamento, capaz de apresentar sintomas recorrentes, inclusive após ciclos de terapia com fármacos antimicrobianos. Esses episódios infecciosos, muitas vezes são eliminados do organismo apenas com intervenção cirúrgica ou com doses muito elevadas de agentes quimioterápicos. Dessa forma, o custo do tratamento destas infecções é muito elevado (Archibald & Gaynes.; 1997 ; Costeron et al.; 1999; Potera et al.; 1999; Fux et al.; 2005).

Podendo ser classificada como uma desordem metabólica que afeta mais de 180 milhões de indivíduos em escala global (Johargy et al.; 2016), a diabetes mellitus é um frequente objeto de estudo em trabalhos com o objetivo de controlar sua dispersão e de tratar suas complicações (Rajagolapan, 2005). Pessoas diabéticas apresentam aumento da susceptibilidade às infecções bacterianas, tal informação têm sido atribuída a alguns fatores de risco como alterações vasculares, nefropatia, neuropatia, obesidade, além de alterações presentes nas respostas imune inata e humoral dos pacientes acometidos (Rajagolapan, 2005; Johargy, 2016). A diabetes é a comorbidade mais frequente associada à infecção por EGB, todavia são escassos os estudos com foco na interação desse microrganismo com modelos que mimetizem o organismo do diabético. Em uma das primeiras pesquisas publicadas, em 1983, os autores descreveram a maior susceptibilidade de animais diabéticos à infecção por EGB, associada à bacteremia prolongada (Edwards e Guselier, 1983).

Em pacientes diabéticos, ocorre a perda de massa corporal decorrente da insuficiência de insulina nessa população. As células do indivíduo acometido tornam-se incapazes de obter glicose e utilizam outros substratos como forma de energia para o seu metabolismo, como exemplo proteínas e gorduras (*American Diabetes Association*, 2011). Estudos evidenciaram que a associação entre infecções bacterianas e diabetes é capaz de elevar a perda de peso promovidas por alterações no equilíbrio metabólico-endócrino do indivíduo hospedeiro (Rayfield et al.; 1982). Nossos resultados utilizando o modelo de infecção crônica corroboraram essa informação, evidenciando a perda de massa corporal do animais, mesmo sendo mantida a mesma dieta padrão em todos os grupos do experimento.

Os primeiros modelos de infecção murina com EGB foram publicados em 2005, todavia esses modelos focaram na infecção por via vaginal, mimetizando o modelo de infecção de curto prazo, apenas vários anos depois, um modelo murino de colonização vaginal, de longo prazo, por EGB foi desenvolvido para analisar fatores bacterianos e fatores relacionados com o hospedeiro (Cheng et al.; 2005). Os modelos de infecção escolhidos para realização neste estudo simularam duas das principais vias de infecção naturalmente utilizadas pelo patógeno. A via intranasal é utilizada pelo patógeno no momento do nascimento do bebê via parto normal, momento no qual o bebê pode aspirar o líquido amniótico contaminado pelo EGB. Em contrapartida, o modelo de infecção intraperitoneal mimetiza o momento que o EGB atinge a corrente sanguínea e se dissemina para os diversos órgãos do organismo. Após a infecção nos dois modelos, o EGB foi capaz de se estabelecer nos órgãos-alvo através da corrente sanguínea, demonstrando a viabilidade dos dois modelos de infecção implantados em nosso laboratório durante o desenvolvimento deste projeto de dissertação. Estudos prévios publicados em modelo

de tilápias, demonstraram a presença de colônias em diversos órgãos como rins, baço, cérebro e fígado. As bactérias apresentaram a capacidade de causar necrose local, invadir e se multiplicar dentro dos fagócitos do hospedeiro (Marcusso et al.; 2014).

De acordo com Ullet e colaboradores em 2009, em até 3,5% das gestações, o EGB se dissemina para a bexiga causando infecção do trato urinário e bacteriúria assintomática (Ullet et al.; 2009). A bacteriúria por EGB durante o período da gravidez está associada a um risco aumentado de diversas complicações, como exemplo: febre intraparto, corioamnionite, parto prematura e ruptura prematura de membranas (Kessous et al.; 2012). Nosso modelo de infecção crônica, após 5 semanas de infecção, através da infecção intranasal demonstrou a persistência do EGB nos rins e bexiga dos animais DI, apresentando diferença significativa em relação ao grupo NDI. No modelo de infecção aguda, 5 dias, demonstrou a persistência de EGB nos grupos DI com as diferentes amostras estudadas (GBS90356, COH1 e GBS90356 Δ bspC), porém sem diferença significativa entre os grupo NDI e os DI. Contudo, até o momento, não existem publicações disponíveis na literatura que auxiliem na discussão dos resultados obtidos. Sendo assim, este trabalho demonstrou pela primeira vez que os modelos de inoculação intranasal e intraperitoneal são adequados para a análise do processo de infecção por EGB em modelo murino. Nosso trabalho evidenciou também o papel da diabetes no processo de infecção do EGB com foco na disseminação para os órgãos do trato urogenitário, contribuindo para o melhor entendimento da patogênese ocasionada pela infecção do EGB em indivíduos diabéticos.

Silvestre e colaboradores (2020) evidenciaram que todas as 38 amostras de EGB apresentaram maior capacidade de formação de biofilme após a incubação em meio acrescido de 1% de glicose e na presença de 5% de CO² após 48 h. O efeito da presença da glicose no meio de cultura foi relacionada com a acidificação do meio decorrente da produção metabólica de ácidos pelo microrganismo. Os ensaios de produção de biofilme apresentado em nosso estudo, a capacidade de formação de biofilme no meio padronizado TSB foi realizado na ausência e na presença de glicose como forma de mimetizar o microambiente hiperglicêmico de indivíduo diabético. As amostras GBS90356 e GBS90356 Δ bspC apresentaram maior potencial de formação de biofilme no meio sem adição de glicose (normoglicêmico), enquanto a amostra COH1 apresentou maior potencial de formação de biofilme em TSB hiperglicêmico. Contudo, as amostras GBS90356 e COH1 recuperadas do grupo NDI mantiveram o seu potencial de formação de biofilme, enquanto a amostra GBS90356 Δ bspC apresentou uma produção de biofilme menor. Interessantemente, todas as amostras evidenciaram um padrão de formação de biofilme alterado negativamente no grupo DI.

Sendo assim, os resultados dos nossos trabalhos apresentam uma forma diferenciada de estudar as infecções da amostra patogênica GBS90356, bem como as mutantes classificadas com ST-17, através do modelo murino de caráter crônico e agudo. Além disso, evidenciou-se a capacidade de formação de biofilme das amostras analisadas, apresentando, dessa forma, mais um importante fator para a persistência do microorganismo nos sistemas biológicos do hospedeiro acometido pela infecção do patógeno EGB.

CONCLUSÕES

De acordo com os dados apresentados neste estudo podemos concluir que:

- a) A amostra GBS90356 pertencente ao tipo capsular III ST17 apresentou os seguintes genes de virulência: *lmb*, *gbs2018*, *PI-1*, *PI-2b*, *fbsA*, *fbsB* e *hylB*, dentre os fatores avaliados o único não presente foi o gene *PI-1a*;
- b) A técnica de PCR implementada foi capaz de identificar as amostras recuperadas dos animais eutanasiados;
- c) O modelo de indução à diabetes através da estreptozotocina tanto nos animais da linhagem Swiss Webster e da linhagem Black C57BL-6;
- d) Ambas as vias de infecção implementadas (intranasal e intraperitoneal) foram bem sucedidas, possibilitando a disseminação bacteriana nos animais;
- e) Ambos os grupos diabéticos (infectados e não infectados) apresentaram perda de massa corporal em comparação com os grupos controle do experimento;
- f) A disseminação bacteriana foi capaz de alcançar os órgãos alvo rim e pulmão tanto no modelo crônico;
- g) O modelo agudo de infecção evidenciou a ausência do patógeno no sangue e na urina dos animais;
- h) As amostras bacterianas GBS90356, COH1 e GBS90356 Δ bspC foram capazes de produzir biofilme das diferentes condições analisadas neste estudo.

REFERÊNCIAS

- Arrellano-Valdez F, Urrutia-Osorio M, Arroyo C, Soto-Vega E. A comprehensive review of urologic complications in patients with diabetes. Springerplus. 2014 Sep 23;3:549. doi: 10.1186/2193-1801-3-549. PMID: 25332855; PMCID: PMC4183758.
- Akgul O, Uysal HK, Aliyev E, Tunc MH, Oner YA. A rare case of urinary schistosomiasis in Turkey. Travel Med Infect Dis. 2014 May-Jun;12(3):283-5. doi: 10.1016/j.tmaid.2013.11.002. Epub 2013 Nov 15. PMID: 24280295.
- American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes—2011. *Diabetes Care*, v. 34, p. S11-S61, 2011.
- Borger IL. Estudo da colonização por *Streptococcus agalactiae* em gestantes atendidas na maternidade escola da Universidade Federal do Rio de Janeiro [Dissertação]. Rio de Janeiro: Universidade Federal Fluminense, curso de Pós graduação em Patologia; 2005.
- Balkhi B, Mansy W, AlGhadeer S, Alnuaim A, Alshehri A, Somily A. Antimicrobial susceptibility of microorganisms causing Urinary Tract Infections in Saudi Arabia. J Infect Dev Ctries. 2018 Apr 30;12(4):220-227. doi: 10.3855/jidc.9517. PMID: 31851630.
- 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.
- Cieslewicz MJ, Donati C, Tettelin H, Massignani V, Medini D, Ward NL, DeBoy RT. Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial ‘pangenome’. Proc Natl Acad Sci USA. 2005;102:13950–5.
- Chand 2014 Chand S, McKnight AJ, Borrows R. Genetic polymorphisms and kidney transplant outcomes. Curr Opin Nephrol Hypertens. 2014 Nov;23(6):605-10. doi: 10.1097/MNH.000000000000068. PMID: 25188274.
- Dutra VG, Alves VMN, Olendzki AN, Dias CAG, Bastos AFAB, Santos GO, Amorin ELT, Sousa MAB, Santos R, Ribeiro PRS, Fontes CF, Andrey M, Magalhães K, Araujo AA, Paffadore LF, Marcone C, Murta EFC, Fernandes PC, Raddi MSG, Marinho PS, Bornia RBG, Palmeiro JK, Dalla-Costa LM, Pinto TCA, Botelho ACN, Teixeira LM, Fracalanza SEL. *Streptococcus agalactiae* in Brazil: serotype distribution, virulence determinants and antimicrobial susceptibility. BMC Infectious Diseases. 2014; 14:323.
- Doran, KS, Nizet V. Molecular pathogenesis of neonatal group B streptococcal infection: no longer in its infancy. Mol Microbiol. 2004; 54(1):23-31.
- Fiolo K, Zanardi CE, Salvadego M, Bertuzo CS, Amaral E, Calil R, Levy CE. Infection rate and *Streptococcus agalactiae* serotypes in samples of infected neonates in the city of Campinas - São Paulo, Brazil. Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetria. 2012; 34 (9): 544-49.

Flint A, Arslanian S. Treatment of type 2 diabetes in youth. *Diabetes Care*. 2011 May;34 Suppl 2(Suppl 2):S177-83. doi: 10.2337/dc11-s215. PMID: 21525452; PMCID: PMC3632158.

Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol*. 2005 Jan;13(1):34-40. doi: 10.1016/j.tim.2004.11.010. PMID: 15639630.

Gibbs RS, Schrag S, Schuchat A. Perinatal infections due to group B streptococci. *Obstet Gynecol*. 2004 Nov;104(5 Pt 1):1062-76. doi: 10.1097/01.AOG.0000144128.03913.c2. PMID: 15516403.

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*. 2007; 45: 2909-16.

Ho YR, Li CM, Yu CH, Lin YJ, Wu CM, Harn C, Tang MJ, Chen YJ, Shen FC, Lu CY, Tsai TC, Wu JJ. The enhancement of biofilm formation in *Group B streptococcal* isolates at vaginal pH. *Med Microbiol Immunol*. 2013; 202:105-15.

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

Kaczorek E, Małaczewska J, Wójcik R, Siwicki AK. Biofilm production and other virulence factors in *Streptococcus* spp. isolated from clinical cases of bovine mastitis in Poland. *BMC Vet Res*. 2017 Dec 28;13(1):398. doi: 10.1186/s12917-017-1322-y. PMID: 29282118; PMCID: PMC5745963.

Kaczorek E, Małaczewska J, Wójcik R, Rękawek W, Siwicki AK. Phenotypic and genotypic antimicrobial susceptibility pattern of *Streptococcus* spp. isolated from cases of clinical mastitis in dairy cattle in Poland. *J Dairy Sci*. 2017 Aug;100(8):6442-6453. doi: 10.3168/jds.2017-12660. Epub 2017 Jun 7. PMID: 28601447.

Lanotte P, Perivier M, Haguenoer E, Mereghetti L, Burucoa C, Claverol S, Atanassov C. Proteomic biomarkers associated with *Streptococcus agalactiae* invasive genogroups. *PloSOne*. 2013; 8(1):1-11.

Lancefield RC. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic *Streptococci*. *J. Exp. Med*. 1933; 57: 571-595.

Lembke C, Podbielski A, Hidalgo-Grass C, Jonas L, Hanski E, Kreikemeyer B. Characterization of biofilm formation by clinically relevant serotypes of group A streptococci. *Appl Environ Microbiol*. 2006 Apr;72(4):2864-75. doi: 10.1128/AEM.72.4.2864-2875.2006. PMID: 16597993; PMCID: PMC1449035.

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

Liu GY, Doran KS, Lawrence T, Turkson N, Puliti M, Tissi L, Nizet V. Sword and shield: linked group B streptococcal beta-haemolysin/cytolysin and carotenoid pigment function to subvert host phagocyte defense. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 5:14491–6.

Manetti AG, Zingaretti C, Falugi F, Capo S, Bombaci M, Bagnoli F, Gambellini G, Bensi G, Mora M, Edwards AM, Musser JM, Graviss EA, Telford JL, Grandi G, Margarit I. *Streptococcus pyogenes* pili promote pharyngeal cell adhesion and biofilm formation. *Mol Microbiol*. 2007 May;64(4):968-83. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.05704.x. PMID: 17501921.

Mahendroo M. Cervical remodeling in term and preterm birth: insights from an animal model. *Reproduction*. 2012 Apr;143(4):429-38. doi: 10.1530/REP-11-0466. Epub 2012 Feb 18. PMID: 22344465.

Martins RP, Silva JAG, Nakazato L, Dutra V, Filho ESA. Prevalência e etiologia infecciosa de mastite bovina na microregião de Cuiabá, MT. *Ci Anim Bras*. 2010; 11: 181-7.

Martinez G, Harel J, Higgins R, Lacouture S, Daignault D, Gottschalk M. Characterization of *Streptococcus agalactiae* isolates of bovine and human origin by randomly amplified polymorphic DNA analysis. *J Clin Microbiol*. 2000; 38:71-8.

Moraes MN, Silveira WC, Teixeira LEM, Araújo ID. Mecanismos de adesão aos biomateriais. *Ver Med Minas Gerais*. 2013; 23(1):99-104.

Muñoz P, Llancaqueo A, Rodríguez-Créixems M, Peláez T, Martín L, Bouza E. Group B *Streptococcus* bacteremia in nonpregnant adults. *Arch Intern Med*. 1997; 157(2):213- 6.

Najar MS, Saldanha CL, Banday KA. Approach to urinary tract infections. *Indian J Nephrol*. 2009 Oct;19(4):129-39. doi: 10.4103/0971-4065.59333. PMID: 20535247; PMCID: PMC2875701.

Nakib M, Longo M, Tazi A, Billoet A, Raymond J, Trieu-Cuot P, Poyart C. Comparison of the Diversilab® system with multi-locus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis for the characterization of *Streptococcus agalactiae* invasive strains. *J Microbiol Methods*. 2011 May;85(2):137-42. doi: 10.1016/j.mimet.2011.02.010. Epub 2011 Feb 19. PMID: 21338630.

Nizet V, Rubens, C. Pathogenic Mechanisms and virulence factors for group B streptococci. In: *Gram-Positive Pathogens*. 2nd ed. Washington, DC: American Society of Microbiology; 2006. 152-68..

Olson ME, Ceri H, Morck DW, Buret AG, Read RR. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can J Vet Res*. 2002; 66(2):86–92.

Pereira Ude P, Rodrigues Dos Santos A, Hassan SS, Aburjaile FF, Soares Sde C, Ramos RT, Carneiro AR, Guimarães LC, Silva de Almeida S, Diniz CA, Barbosa MS, Gomes de Sá P, Ali A, Bakhtiar SM, Dorella FA, Zerlotini A, Araújo FM, Leite LR, Oliveira G, Miyoshi A, Silva A, Azevedo V, Figueiredo HC. Complete genome sequence of *Streptococcus agalactiae* strain SA20-06, a fish pathogen associated to meningoencephalitis outbreaks. *Stand Genomic Sci*. 2013 May 25;8(2):188-97. doi: 10.4056/sigs.3687314. PMID: 23991251; PMCID: PMC3746423.

- Périchon B, Szili N, du Merle L, Rosinski-Chupin I, Gominet M, Bellais S, Poyart C, Trieu-Cuot P, Dramsi S. Regulation of PI-2b Pilus Expression in Hypervirulent *Streptococcus agalactiae* ST-17 BM110. *PLoS One*. 2017 Jan 20;12(1):e0169840. doi: 10.1371/journal.pone.0169840. PMID: 28107386; PMCID: PMC5249243.
- Paveenkittiporn W, Ungcharoen R, Kerdsin A. *Streptococcus agalactiae* infections and clinical relevance in adults, Thailand. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2020 May;97(1):115005. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2020.115005. Epub 2020 Jan 30. PMID: 32081521.
- Prestes DS, Fillapi A, Cecim M. Susceptibilidade à mastite: fatores que influenciam - uma revisão. *Revista da FZVA*. 2002; 9(1):118-32.
- Poyart C, Tazi A, Réglie-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*. 2007;45:1985-8.
- Rajagopal L. Understanding the regulation of Group B Streptococcal virulence factors. *Future Microbiol*. 2009; 4(2):201-21.
- Rosini R, Lauer P, Rinaudo CD, Soriani M, Margarit I, Maione D, Rosini R, Taddei AR, Mora M, Rappuoli R, Grandi G, Telford JL. Genome Analysis Reveals Pili in Group B *Streptococcus*. *Science*. 2005; 309(5731):105.
- Rochetti RC, Adona PR, de Bem TH, Mesquita LG, Leal CL. Embryonic development and gene expression in oocytes cultured in vitro in supplemented pre-maturation and maturation media. *Reprod Domest Anim*. 2011 Feb;46(1):e31-8. doi: 10.1111/j.1439-0531.2010.01618.x. PMID: 20403123.
- Silvestre I, Borrego MJ, Jordão L. Biofilm formation by ST17 and ST19 strains of *Streptococcus agalactiae*. *Res Microbiol*. 2020 Dec;171(8):311-318. doi: 10.1016/j.resmic.2020.08.001. Epub 2020 Sep 5. PMID: 32896574.
- Soares GC, Alviano DS, 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. *Braz J Microbiol*. 2013; 44:869-72.
- Soriani, M, Pezzicoli, A., Santi, I., Lauer, P., Rosini, R., Rinaudo, D., Grandi, G., Telford, J. L.. Pilus backbone contributes to group B *Streptococcus* paracellular translocation through epithelial cells. *J Infect Dis*. v. 198, p. 890-898, 2008.
- Slotved HC, Kong F, Lambertsen L, Sauer S, Gilbert GL. Serotype IX, a Proposed New Serotype. *J Clin Microbiol*. 2007; 45(9): 2929–36.
- Stoodley P, Cargo R, Rupp CJ, Wilson S, Klapper I. Biofilm material properties as related to shear-induced deformation and detachment phenomena. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2002; 29(6):361-7.
- Spellerberg B, Rozdzinski E, Martin S, Weber-Heynemann J, Schnitzler N, Luttiken 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

Tenenbaum T, Bloier C, Adam R, Reinscheid DJ, Schroten H. Adherence to and invasion of human brain microvascular endothelial cells are promoted by fibrinogen-binding protein FbsA of *Streptococcus agalactiae*. *Infect Immun.* 2005 Jul;73(7):4404-9. doi: 10.1128/IAI.73.7.4404-4409.2005. PMID: 15972538; PMCID: PMC1168575.

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.

Uyen NQ, Lan VT, Ha NT, Duong NT, Huong NT, Thuan TB, Duong PA, To TV. Standardization of the methylation-specific PCR method for analyzing BRCA1 and ER methylation. *Mol Med Rep.* 2014 May;9(5):1844-50. doi: 10.3892/mmr.2014.1990. Epub 2014 Feb 26. PMID: 24573411.

Vasikasin V, Changpradub D. Clinical manifestations and prognostic factors for *Streptococcus agalactiae* bacteremia among nonpregnant adults in Thailand. *J Infect Chemother.* 2021 Jul;27(7):967-971. doi: 10.1016/j.jiac.2021.02.010. Epub 2021 Feb 18. PMID: 33610481.

Vigliarolo L, Arias B, Suárez M, Van Haute E, Kovacec V, Lopardo H, Bonofiglio L, Mollerach M. Argentinian multicenter study on urinary tract infections due to *Streptococcus agalactiae* in adult patients. *J Infect Dev Ctries.* 2019 Jan 31;13(1):77-82. doi: 10.3855/jidc.10503. PMID: 32032027.

Zimmerli 2004 Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE. Prosthetic-joint infections. *N Engl J Med.* 2004 Oct 14;351(16):1645-54. doi: 10.1056/NEJMra040181. PMID: 15483283.