



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Noemi dos Santos Macêdo

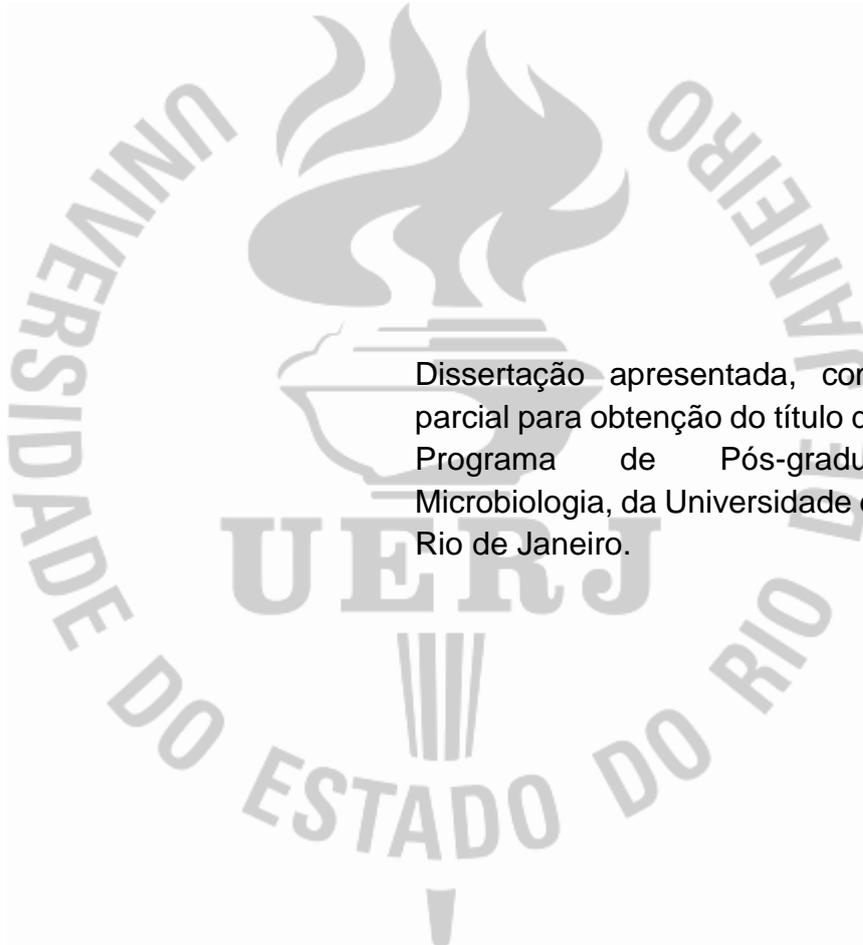
Estudo das infecções agudas de fígado e baço por *Streptococcus agalactiae* em modelo murino de diabetes induzida

Rio de Janeiro,

2024

Noemi dos Santos Macêdo

**Estudo das infecções agudas de fígado e baço 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 Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

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

Rio de Janeiro,

2024

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

M141 Macêdo, Noemi dos Santos.
Estudo das infecções agudas de fígado e baço por *Streptococcus agalactiae* em modelo murino diabético / Noemi dos Santos Macêdo. – 2024.
58 f.

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

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

1. *Streptococcus agalactiae* – Patogenicidade – Teses. 2. Complicações do diabetes – Diagnóstico – Teses. 3. Fígado – Fisiopatologia – Teses. 4. Baço – Fisiopatologia – Teses. I. Ferreira, Prescilla Emy Nagao. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU: 616.379-008.6

Bibliotecário: Felipe Caldonazzo CRB7/7341

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

Assinatura

Data

Noemi dos Santos Macêdo

**Estudo das infecções agudas de fígado e baço 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 Microbiologia, da Universidade
do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 07 de novembro de 2024.

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

Banca Examinadora: _____
Prof.^a Dra. Ana Cláudia de Paula Rosa Ignácio
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Prof.^a Dra. Gabriela Santos Jonathan
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof.^a Dra. Débora Leandro Rama Gomes
Instituto Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2024

AGRADECIMENTOS

- A Deus, por me conceder a paz que excede todo entendimento, por renovar minhas forças dia após dia, me sustentar e me permitir concluir mais uma etapa tão sonhada;
- Aos meus pais que sempre me incentivaram e investiram tudo o que tinham para que estivesse realizando meus sonhos;
- Ao meu marido por sempre acreditar nos meus sonhos, por continuamente me encorajar e dar todo o suporte para que eu possa prosseguir e avançar;
- Aos meus filhos, por me fazerem um ser humano melhor e por ser a fonte de inspiração que eu precisava para encarar todos os desafios da vida acadêmica com a maternidade;
- A minha orientadora, Dra. Prescilla Emy Nagao Ferreira, por me acolher em seu grupo de pesquisa e compartilhar seus conhecimentos, orientando sempre com muito amor;
- Aos membros da banca. Agradeço a disponibilidade e atenção dedicados a mim e a esse trabalho;
- A família LBMFE, Gabriela, Pamella, Jéssica O., Jéssica M., Dayane, João, Bruna, Melissa, Julyana, Kaian, Rose, Lucas, Isabelle, Maria Eduarda. Obrigada por me abraçarem e tornarem os momentos no laboratório tão alegres;
- A Dra. Jéssica Mendonça por me ensinar técnicas importantes para a conclusão desse trabalho, além de colaborar com tudo o que precisei;
- Ao Dr. Eduardo Torres, juntamente com seu grupo (Tathiane, Kaio e Luciana), por me receberem tão bem em seu laboratório e por dedicarem tempo para me auxiliar em todas as análises histológicas;
- A Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por ser a agência de fomento que me permitiu desenvolver esse trabalho com dedicação exclusiva;
- A toda a minha família e amigos por serem meu suporte e por sempre me desejarem o melhor; meu agradecimento a todos.

Prepara-se o cavalo para o dia da batalha, mas o Senhor é que dá a vitória.

Provérbios 21:31

RESUMO

MACÊDO, Noemi dos Santos. **Estudo das infecções agudas de fígado e baço por *Streptococcus agalactiae* em modelo murino diabético**. 2024. 58 f
Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas,
Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2024.

Streptococcus agalactiae, ou estreptococos do grupo B (EGB), é um coco patogênico Gram-positivo, anaeróbio facultativo, encapsulado, beta-hemolítico, catalase e oxidase negativos, hipurato e CAMP positivos. O *S. agalactiae* é pertencente a microbiota anfibiônica dos tratos respiratório, gastrointestinal e urogenital de pessoas saudáveis, podendo ser classificado em dez diferentes tipos capsulares (Ia, Ib, II-XV). O microrganismo é o agente etiológico da mastite bovina e a principal causa de infecções invasivas em neonatos, gestantes e idosos (10-30%). Além disso, em adultos não-grávidos, sobretudo em adultos com doenças subjacentes, o *S. agalactiae* é responsável por uma elevada taxa de mortalidade e morbidade. A diabetes *mellitus* é a mais comum entre todas as doenças associadas às infecções pelo *S. agalactiae*; contudo, pouco se sabe sobre a relação entre diabetes e a patogênese desse patógeno. Desta forma, este trabalho analisou a infecção do *S. agalactiae* em modelo murino de diabetes induzida pela estreptozotocina para analisar a disseminação bacteriana em órgãos relacionados com a resposta imune, o fígado e o baço. Os resultados obtidos demonstraram pela primeira vez o comprometimento do fígado e baço após infecção pelo *S. agalactiae*, principalmente nos animais diabéticos, sugerindo maior comprometimento das funções vitais de ambos os órgãos durante a ativação da resposta imune. Desta forma, análises mais aprofundadas dos mecanismos afetados são necessárias para maior compreensão da patogênese do *S. agalactiae* em pacientes diabéticos. Além disso, o modelo de inoculação intraperitoneal mostrou-se adequado para análise do processo de infecção em modelo de diabetes induzida, podendo ser ampliado para outros microrganismos, podendo auxiliar em novas estratégias terapêuticas e profiláticas.

Palavras-chave: *Streptococcus agalactiae*; modelo murino; diabetes; fígado; baço.

ABSTRACT

MACÊDO, Noemi dos Santos. *Study of acute liver and spleen infections by Streptococcus agalactiae in a diabetic murine model*. 2024. 58 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

Streptococcus agalactiae, or group B *Streptococcus* (GBS), is a Gram-positive, facultatively anaerobic, encapsulated, beta-hemolytic, catalase and oxidase negative, hippurate and CAMP positive. *S. agalactiae* belongs to the amphibian microbiota of the intestinal, gastrointestinal and urogenital tracts of healthy individuals and can be classified into ten different capsular types (Ia, Ib, II-XV). The microorganism is the etiological agent of bovine mastitis and the main cause of invasive infections in neonates, pregnant women and the elderly (10-30%). Furthermore, in non-pregnant adults, especially in adults with underlying diseases, *S. agalactiae* is responsible for a high rate of mortality and morbidity. Diabetes mellitus is the most common disease associated with *S. agalactiae* infections; However, little is known about the relationship between diabetes and the pathogenesis of this pathogen. Therefore, this study analyzed *S. agalactiae* infection in a murine model of streptozotocin-induced diabetes to analyze bacterial dissemination in organs related to the immune response, the liver and spleen. The results obtained demonstrated for the first time the involvement of the liver and spleen after infection by *S. agalactiae*, mainly in diabetic animals, showing greater impairment of the functions caused by both organs during the activation of the immune response. Therefore, more in-depth analyses of the affected mechanisms are useful for a better understanding of the pathogenesis of *S. agalactiae* in diabetic patients. In addition, the intraperitoneal inoculation model shown is suitable for analyzing the infection process in a model of induced diabetes, and can be expanded to other microorganisms, potentially assisting in new therapeutic and prophylactic strategies.

Keywords: *Streptococcus agalactiae*; murine model; diabetes; liver; spleen.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 - Modelo de infecção aguda de 1 semana.....	22
Figura 1 – Aferição dos níveis de glicemia dos camundongos com 1 semana de infecção.....	27
Figura 2 – Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) no fígado de animais não diabéticos infectados e diabéticos infectados após uma semana de infecção por GBS90356.....	29
Figura 3 – Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) no fígado de animais não diabéticos infectados e diabéticos infectados após uma semana de infecção por GBS90356 Δ <i>bspC</i>	30
Figura 4 – Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) no fígado de animais não diabéticos infectados e diabéticos infectados após uma semana de infecção por GBSCOH1.....	31
Figura 5 – Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) no baço de animais não diabéticos infectados e diabéticos infectados após uma semana de infecção por GBS90356.....	32
Figura 6 – Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) no baço de animais não diabéticos infectados e diabéticos infectados após uma semana de infecção por GBS90356 Δ <i>bspC</i>	33
Figura 7 – Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) no baço de animais não diabéticos infectados e diabéticos infectados após uma semana de infecção por GBSCOH1.....	34
Figura 8 – Aspectos gerais do fígado dos animais controles diabéticos e não diabéticos não-infectados.....	36
Figura 9 – Aspectos gerais do fígado dos animais infectados com a amostra GBS90356.....	37
Figura 10 – Aspectos gerais do fígado dos animais infectados com a amostra GBS90356 Δ <i>bspC</i>	38
Figura 11 – Aspectos gerais do fígado dos animais infectados com a amostra GBSCOH1.....	39

Figura 12 – Aspectos gerais do baço dos animais controles diabéticos e não diabéticos não infectados.....	41
Figura 13 – Aspectos gerais do baço dos animais infectados com a amostra GBS90356.....	42
Figura 14 – Aspectos gerais do baço dos animais infectados com a amostra GBS90356 Δ <i>bspC</i>	43
Figura 15 – Aspectos gerais do baço dos animais infectados com a amostra GBSCOH1.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APCs – Células apresentadas de antígenos

BHI – Infusão cérebro coração

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

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

DI – Diabético Infectado

DNI – Diabético Não-infectado

DO – Densidade Ótica

EGB – Estreptococos do Grupo B

EOGBS – early-onset Group B Streptococcus (Início precoce da infecção por Estreptococos do Grupo B)

HE – Hematoxilina e Eosina

IBRAG – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

LOGBS – late-onset Group B Streptococcus (Início tardio da infecção por Estreptococos do Grupo B)

LVB – Laboratório de Vacinas Bacterianas

NDI – Não-diabético Infectado

NDNI – Não-diabético Não-Infectado

PMNs – Neutrófilos polimorfonucleares

STZ – Estreptozotocina

UDO – Unidades de densidade ótica

UFC/mL – Unidades formadoras de colônia por mililitro

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	11
1 OBJETIVOS	19
1.1 Objetivo geral	19
1.2 Objetivos específicos	19
2 METODOLOGIA	20
2.1 Amostras bacterianas	20
2.2 Comitê de ética	20
2.3 Animais	20
2.4 Grupos de estudo	21
2.5 Indução da diabetes mellitus	22
2.6 Aferição da glicemia	23
2.7 Infecção com amostras bacterianas	23
2.8 Morte dos animais	23
2.9 Contagem bacteriana	24
2.10 Histologia de fígado e baço	24
2.10.1 <u>Coloração hematoxilina e eosina (HE)</u>	25
2.11 Análise estatística	25
3 RESULTADOS	26
3.1 Glicemia e confirmação do modelo de indução da diabetes	26
3.2 Contagem das unidades formadoras de colônias (UFC/mL) com 1 semana de infecção	28
3.3 Análises histológicas de baço e fígado de animais submetidos ao modelo de infecção aguda	35
4 DISCUSSÃO	45
CONCLUSÕES	51
REFERÊNCIAS	52

INTRODUÇÃO

Estreptococos do grupo B

Streptococcus agalactiae ou estreptococos do grupo B (EGB) são cocos patogênicos pertencentes à família *Streptococcaceae*, Gram-positivos, anaeróbio facultativos, encapsulados, beta-hemolíticos, catalase e oxidase negativos, hipurato e CAMP positivos. Atualmente, podem ser classificados em dez tipos capsulares (Ia, Ib, II-IX) de acordo com o polissacarídeo capsular tipo específico constituído por unidades repetidas de glicose, galactose, ramnose, N-acetil-D-glicosamina e ácido siálico (Kogan, 1996). Todos os dez tipos capsulares de *S. agalactiae* podem causar infecção humana. Na última década, uma distribuição mais equilibrada entre os tipos Ia, III e V em infecções neonatais, além de casos clínicos envolvendo gestantes e não-gestantes tem sido observada (Martins et al., 2017).

Inicialmente, o *S. agalactiae* foi identificado como agente etiológico de mastite bovina. A mastite causa perdas econômicas às fazendas leiteiras e indústria de laticínios, bem como problemas de saúde pública (Dalanezi, et al., 2020). Só a partir da década de 70, o *S. agalactiae* foi considerado como pertencente da microbiota anfibiótica dos tratos respiratório, gastrointestinal e urogenital humana (Dutra et al., 2014).

O *S. agalactiae* é um importante patógeno neonatal, sendo um dos principais agente etiológico de sepse, meningite e pneumonia em recém-nascidos. A colonização vaginal materna é o principal fator de risco para doença neonatal (Rosen et al., 2017). As infecções maternas ou fetais de forma geral causam 10–25% dos natimortos em países desenvolvidos e 50% ou mais em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento (Cools, Melin, 2017). A infecção neonatal pelo *S. agalactiae* pode se apresentar na forma de início precoce (“early-onset Group B Streptococcus”, EOGBS) ou de início tardio (“late-onset Group B Streptococcus”, LOGBS). Nas infecções de início precoce, a bactéria é transferida da mãe para o feto no útero, a partir da infecção ascendente das membranas placentares ou durante a passagem do feto pelo canal vaginal através da aspiração dos fluidos vaginais infectados durante o parto normal. A EOGBS pode se manifestar nas primeiras horas até 3 dias de vida,

apresentando quadros de pneumonia ou falha respiratória que pode progredir para sepse e choque séptico (Doran, Nizet, 2004). A infecção de início tardio causada pelo *S. agalactiae* pode ocorrer nos primeiros meses de idade, causando elevada taxa de infecção sanguínea (40- 60%) e progressão para a meningite (Tavares et al., 2022). Mundialmente a incidência da infecção causada por *S. agalactiae* é de 3/1000 nascimentos (Verani et al., 2010). Cerca de 1 a cada 20 adultos não-grávidos com infecções causadas por *S. agalactiae* são levados a óbito. A taxa de doenças invasivas é de aproximadamente 25 casos a cada 100.000 adultos com mais de 65 anos (Centers for Disease Control and Prevention, 2016).

A patogenicidade do *S. agalactiae* resulta de um processo multifatorial que inclui a habilidade da bactéria de aderir, colonizar e invadir células epiteliais e endoteliais, além de se multiplicar e evadir as defesas do sistema imunológico do hospedeiro (Nizet et al., 2002). Esse microrganismo é capaz de codificar uma ampla variedade de fatores de virulência, essenciais para sua capacidade de causar doenças. Esses fatores têm sido alvo de pesquisas em diversas partes do mundo (Schindler et al, 2023).

A virulência de *S. agalactiae* inclui vários elementos essenciais para a adesão e invasão das células do hospedeiro, além da evasão do sistema imunológico. Pesquisas indicaram que cepas do tipo sequencial ST-17 e ST-1 são consideradas hipervirulentas (Lartigue et al., 2011). *S. agalactiae* utiliza diversas estratégias para evitar ser detectado pelo sistema imunológico do hospedeiro durante uma infecção sistêmica. As proteínas ligantes ao fibrinogênio (Fbs) e as proteínas ligantes à laminina (Lmb) são dois fatores-chave responsáveis pela adesão do patógeno à matriz extracelular (Landwehr-Kenzel, Henneke, 2014). Para que a infecção se instale de forma eficaz, é necessário que os patógenos expressem seus produtos genômicos adequadamente em resposta ao ambiente do hospedeiro. Os principais fatores de virulência do EGB incluem: a cápsula polissacarídica, a hemolisina-citolisina, a C5a peptidase, proteínas que se ligam à matriz extracelular, adesinas imunogênicas, fator CAMP, proteína C, hialuronidase, ácido lipoteicoico, pili, entre outros que ainda estão sendo estudados (Doran e Nizet, 2014; Rajagopal, 2009).

Nos Estados Unidos, um grupo estudou a função de BspC, uma adesina da família do antígeno I/II, na patogênese da meningite por *S. agalactiae*. Em modelo murino de meningite hematogênica foi demonstrado que camundongos infectados com mutantes $\Delta bspC$ apresentaram menor mortalidade, contagens bacterianas

cerebrais mais baixas e infiltração inflamatória reduzida em comparação com aqueles infectados com cepas selvagens de *S. agalactiae* (Deng et al., 2019).

Mais recentemente, em um outro estudo utilizando modelo murino de colonização vaginal, foi possível notar que a cepa mutante $\Delta bspC$ apresentou uma deficiência de aptidão considerável em relação ao *S. agalactiae* selvagem (WT). Essa cepa foi menos eficiente em ascender pelo colo do útero e útero *in vivo*. Além disso, a cepa mutante $\Delta bspC$ reduziu a adesão bacteriana às células vaginais, ectocervicais e endocervicais, além de apresentar uma diminuição na autoagregação e na formação de biofilme em monocamadas celulares (Manzer et al., 2022).

Desde o final da década de 80, a doença por *S. agalactiae* ganhou reconhecimento como uma causa significativa e crescente de infecções graves entre adultos não gestantes, especialmente os idosos e pessoas com doenças subjacentes. Em particular, obesidade e diabetes têm sido associados a um risco aumentado da doença (Skoff et al., 2009; Francois Watkin et al., 2019; Raabe, Shane; 2019).

Estudos prévios realizados nos Estados Unidos e Europa demonstraram que a incidência de doenças invasivas por *S. agalactiae* em adultos tem aumentado de 3,6 casos/100.000 pessoas para 7,3 casos/100.000 pessoas no período de 18 anos. O aumento de adultos com condições crônicas continua a ser a explicação mais plausível para a duplicação da incidência de doenças em adultos (Chaiwarith et al., 2011). Dentre as manifestações clínicas em adultos com infecções causadas por *S. agalactiae* podemos citar as infecções na pele, tecido mole e trato urinário, bacteremia, pneumonia, artrite e endocardite (Rajagopal, 2009). Bacteremia primária e infecções de pele e tecidos moles são os diagnósticos mais frequentemente relatados (Sendi et al., 2008).

O tratamento indicado para infecções causadas pelo *S. agalactiae* continua sendo com o uso de antibióticos, onde a penicilina e a ampicilina são as drogas de primeira escolha. Clindamicina ou eritromicina são recomendadas como alternativas na profilaxia intraparto para mulheres alérgicas à penicilina. Todavia, em um estudo realizado no Brasil o nível de resistência à eritromicina e clindamicina foi de 4,1% e 3%, respectivamente (Dutra et al., 2014). Os dados demonstraram que, em um curto período, esses antibióticos não serão mais uma terapia alternativa confiável.

Resposta imune desencadeada por bactérias Gram-positivas

Composto por uma rede de células e moléculas efetoras, o sistema imune inato nos protege contra infecções após a exposição a patógenos. Além das barreiras físicas, como a pele e as mucosas epiteliais, mecanismos sofisticados permitem ao hospedeiro reconhecer padrões moleculares de microrganismos, levando à ativação de respostas inflamatórias. Nesse contexto, leucócitos especializados, como neutrófilos e macrófagos, desempenham um papel fundamental ao migrar para o local da infecção, realizar a fagocitose e produzir compostos microbicidas, eliminando o patógeno antes que ele se espalhe para outros tecidos (Abbas, Litchman, Pillai, 2015)

Falhas na imunidade inata são fundamentais para o desenvolvimento de doenças infecciosas, frequentemente devido a fatores intrínsecos do hospedeiro, como imaturidade ou envelhecimento das funções imunológicas, imunodeficiências genéticas ou adquiridas, comprometimento na integridade das barreiras, comportamentos de risco e desnutrição. Contudo, infecções graves também podem ocorrer em indivíduos saudáveis. Dentre os principais patógenos Gram-positivos responsáveis por infecções invasivas e potencialmente fatais estão o *Staphylococcus aureus*, o *Streptococcus pneumoniae*, o *Streptococcus pyogenes* e o *S. agalactiae* (Okumura, Nizet, 2014).

Quando ocorre a ligação com anticorpos específicos, a fagocitose de bactérias pelos neutrófilos e macrófagos é potencializada, permitindo que os anticorpos se adsorvam aos receptores Fc. Para evitar que as imunoglobulinas (Ig) ligadas ao antígeno sejam reconhecidas pelos receptores Fc e C1q do hospedeiro, as bactérias Gram-positivas adotam uma estratégia de reorientação do anticorpo, que passa a se ligar à própria região Fc do patógeno. Essa ação inibe, por meio da competição, as funções efetoras das células imunes (Kim et al., 2012; Okumura, Nizet, 2014).

A ativação do sistema complemento é rigorosamente regulada por fatores endógenos, a fim de minimizar os danos inflamatórios nos tecidos do hospedeiro. Quase todos os patógenos Gram-positivos relevantes apresentam moléculas que captam reguladores inibitórios do complemento presentes na fase fluida do hospedeiro, como o fator H ou a proteína de ligação ao C4b, na superfície das

bactérias. Isso possibilita que esses reguladores interajam com as convertases C3 e acelerem seu processo de degradação (Rooijackers, van Strijp, 2007).

A produção de citotoxinas que danificam as membranas de diferentes tipos de células do hospedeiro é uma característica comum das bactérias Gram-positivas, facilitando assim a passagem pelas barreiras endoteliais e epiteliais. Essa atividade citotóxica torna as células fagocíticas, como neutrófilos e macrófagos, frequentemente vulneráveis. Como resultado, um dos mecanismos de evasão da imunidade inata é a morte dessas células fagocíticas antes que a bactéria seja totalmente eliminada (Maisey et al., 2008; Okumura, Nizet, 2014).

O baço é o maior órgão linfoide secundário do corpo, desempenhando diversas funções imunológicas, além de participar da hematopoiese e da eliminação de glóbulos vermelhos. Sua estrutura permite filtrar o sangue de patógenos e células anormais, facilitando interações entre células apresentadoras de antígenos (APCs) e linfócitos (Lewis et al., 2019). Além do baço, o fígado é um órgão imunológico essencial, de primeira linha. Torna-se importante ressaltar que o fígado é imunotolerante; no entanto, sob condições apropriadas, este órgão é capaz de montar uma resposta imunológica rápida e robusta (Kubes, Jenne, 2018). A falha em remover estímulos "perigosos" ou regular os mecanismos imunológicos pode causar inflamação patológica e interromper a homeostase do tecido, levando a fibrose, cirrose e insuficiência (Robinson et al., 2016).

Um estudo recente realizado na China, utilizando tilápias infectadas por *S. agalactiae* foram feitas observações de seções patológicas que mostraram danos à estrutura do tecido hepático em resposta à infecção estreptocócica. Os resultados demonstraram que o *S. agalactiae* também pode causar lesão hepática, afetando a função da β -oxidação de ácidos graxos e biossíntese no fígado da tilápia, bem como causar danos à função do sistema imunológico (Du et al., 2022).

Órgãos diretamente envolvidos nos mecanismos do sistema imunológico, como o fígado, o baço e o intestino (Kiron, 2012), devem receber atenção especial, pois desempenham papéis vitais no enfrentamento de doenças. Contudo, a resposta do *S. agalactiae* às defesas do hospedeiro ainda requer mais investigação, principalmente os tecidos-alvos relevantes na resposta imune, visto que não há dados histológicos de modelos *in vivo* desses órgãos infectados por *S. agalactiae*.

Alterações histológicas causadas pela infecção por *S. agalactiae*

Mudanças nos tecidos causadas por infecções bacterianas podem ser analisadas por meio de metodologias histológicas, revelando aspectos da patogenicidade e do metabolismo do patógeno, além de contribuir para o diagnóstico da doença. Estudos histopatológicos oferecem uma visão mais clara da doença e de seus impactos nos tecidos, mantendo sua arquitetura intacta durante o processo de preparação (Gurcan et al., 2009). Pesquisas sobre o gênero *Streptococcus*, especialmente envolvendo *S. pneumoniae*, indicaram alterações significativas em órgãos de camundongos, como rins e bexiga. Brown e colaboradores (2014) observaram lesões microscópicas associadas à doença invasiva pneumocócica provocada por esse patógeno.

Em 2011, onde foi aplicado um modelo murino de infecção do trato urinário por *S. agalactiae* foram encontrados sinais histológicos elevados de inflamação e recrutamento de leucócitos no rim infectado por *S. agalactiae* (Kline et al., 2011). Outro estudo recente observou que o *S. agalactiae* pode se disseminar pela corrente sanguínea e colonizar diversos tecidos, com uma contagem bacteriana significativamente maior em camundongos diabéticos do que em camundongos saudáveis. Análises histológicas dos pulmões mostraram colapso dos septos, infiltração de células inflamatórias e extravasamento de hemácias no grupo diabético. Também foi identificado um aumento notável na deposição de colágeno e fibras elásticas nos pulmões. Além disso, foram registradas hemácias aderidas à parede da válvula e fibras musculares cardíacas desorganizadas no grupo com diabetes (Mendonça et al., 2023). Necrose, esplenomegalia, infiltrados linfocitários e eosinofílicos em órgãos internos como fígado, baço e intestino são alterações histológicas que podem ocorrer após infecção por *S. agalactiae* (Owatari et al., 2020). Desta forma, como não existem estudos que demonstrem alterações histológicas no fígado e no baço causadas por *S. agalactiae* em camundongos, estudos que analisem esses órgãos são relevantes.

Diabetes mellitus

A diabetes é uma condição metabólica em que ocorre uma resistência à insulina, resultando em níveis elevados de glicose no sangue. A insulina é responsável por permitir que a glicose entre nas células para ser convertida em energia, o que ajuda a controlar os níveis de açúcar no sangue. Quando há resistência ou deficiência de insulina, a glicose não é adequadamente absorvida pelas células, levando ao aumento da glicemia e ao desenvolvimento da diabetes (Martins et al., 2009).

Existem dois tipos principais de diabetes mellitus: o tipo 1, caracterizado por uma falta absoluta de insulina devido à destruição das células beta do pâncreas, e o tipo 2, que envolve resistência à insulina, levando a níveis elevados de glicose no sangue (Schmidt, 2018). A insulina, um hormônio anabólico fundamental, facilita a armazenagem de carboidratos da dieta, e sua produção, regulação e ação são meticulosamente coordenadas em diferentes partes do corpo por mecanismos intracelulares complexos (Tokarz et al., 2018). Além disso, a insulina tem sido atribuída às propriedades regulatórias da resposta antimicrobiana e inflamatória nas infecções (Martins et al., 2009; Martins et al., 2010).

Globalmente, a prevalência de diabetes cresceu significativamente, como evidenciado pelos dados dos Estados Unidos, onde o número de casos aumentou de 11,9 milhões em 2000 para 21,9 milhões em 2014 (CDC, 2016). O estilo de vida ocidental, caracterizado por sedentarismo e dietas ricas em calorias, está contribuindo para a crescente frequência da diabetes mellitus, tornando-a uma comorbidade comum em ambientes hospitalares (Frydrich et al., 2017). A reprodução da diabetes mellitus em modelos experimentais é uma abordagem promissora para investigar infecções bacterianas relacionadas a essa condição, e camundongos são frequentemente utilizados como biomodelos (Graham et al., 2011). A estreptozotocina (STZ), um antibiótico antineoplásico natural, destrói as ilhotas pancreáticas que produzem insulina e é amplamente utilizada em pesquisas sobre diabetes mellitus tipo 1 e tipo 2 (Deeds et al., 2011; Graham et al., 2011). Sua utilização oferece vantagens sobre outros métodos para induzir diabetes devido à sua eficácia e padronização no meio científico.

A diabetes mellitus é particularmente relevante no contexto de infecções por *S. agalactiae*, pois a resistência à insulina está associada a uma maior vulnerabilidade a infecções bacterianas invasivas (Kenzel et al., 2012). Contudo, são necessários mais estudos para entender melhor os mecanismos patogênicos do *S. agalactiae* em modelos de diabetes, com o objetivo de reduzir a mortalidade e as complicações associadas. Este estudo visa entender a patogenicidade do *S. agalactiae* em um modelo de infecção aguda utilizando camundongos *Swiss webster* diabéticos e as alterações histológicas provocadas em tecidos-alvo fígado e baço.

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

S. agalactiae vem emergindo como um dos principais microrganismos causadores de infecções invasivas em adultos imunocomprometidos, principalmente por diabetes mellitus. As razões para o aumento da incidência da doença por *S. agalactiae* entre adultos não gestantes não são bem compreendidos. Desta forma, entender os mecanismos que o *S. agalactiae* usa para desenvolver a patogênese é crucial, pois isso pode ajudar a desenvolver o tratamento e diminuir a incidência de infecções invasivas causadas por esse microrganismo.

1.2 Objetivos específicos

- Realizar a indução de diabetes mellitus em camundongos *Swiss Webster* com a droga estreptozotocina;
- Realizar a infecção via intraperitoneal dos animais diabéticos e não diabéticos com as amostras de *S. agalactiae* GBS90356, GBS90356 Δ bspC e GBSCOH1;
- Coletar fígado e baço dos animais submetidos ao modelo de infecção bacteriana;
- Análisar o crescimento bacteriano em unidades formadoras de colônias (UFC/mL) no fígado e baço coletados dos camundongos diabéticos e não diabéticos infectados por *S. agalactiae*;
- Realizar o processamento e análise histológica de fígado e baço dos animais submetidos ao modelo de infecção bacteriana.

2 METODOLOGIA

2.1 Amostras bacterianas

Para o estudo de infecção *in vivo*, as seguintes amostras bacterianas foram utilizadas: GBS90356 e sua mutante GBS90356 Δ *bspC*, ambas do tipo capsular III e ST-17, isolada de líquido de recém-nascido e sequenciada em nosso laboratório. A identificação e tipagem do microrganismo foram realizadas por PCR, conforme a metodologia descrita por Poyart et al. (2007). A terceira amostra utilizada foi a GBSCOH1, do tipo III, usada como padrão mundial para a 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) com 20% de glicerol. Para os experimentos, a bactéria foi cultivada em placas de agar contendo 5% de hemácias de carneiro (Plast Labor LTDA, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e, em seguida, em meio BHI até atingir uma densidade óptica de 0,2 unidades (UDO) a $\lambda = 540$ nm ($\sim 1 \times 10^5$ UFC/mL).

2.2 Comitê de ética

Os estudos com animais foram realizados com a aprovação do Comitê de Ética para o cuidado e uso de animais experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes (CEUA-IBRAG), registrado pelo número 010/2021.

2.3 Animais

Foram utilizados 39 animais, entre machos e fêmeas da linhagem *Swiss webster* com cerca de 45 dias de vida para a realização do modelo agudo de infecção por 1 semana (7 dias). Os animais foram cedidos pelo Dr. Alexandre Dias do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Departamento de Imunologia, Laboratório de Vacinas Bacterianas (LVB) – Fundação Oswaldo Cruz/RJ, com peso variando entre 30-40 gramas.

Todos os animais foram submetidos à dieta padrão do LVB e tiveram acesso livre à água e ração. Os dados de consumo e massa corporal foram aferidos a partir

de uma escala realizada a cada quatro dias e, posteriormente analisados estatisticamente utilizando o one-way ANOVA e o pós teste Newman-Keuls no GraphPad Prisma.

2.4 Grupos de estudo

Para realização do estudo os camundongos com 1 semana de infecção foram divididos em oito grupos:

Grupo 1 - Não diabético não-infectado (NDNI) e com acesso livre à água e ração;

Grupo 2 - Não diabético infectado com a amostra GBS90356 (NDI - GBS90356) e com acesso livre à água e ração;

Grupo 3 - Não diabético infectado com a amostra GBS90356 Δ bspC (NDI - GBS90356 Δ bspC) e com acesso livre à água e ração;

Grupo 4 - Não diabético infectado com a amostra GBSCOH1 (NDI - GBSCOH1) e com acesso livre à água e ração;

Grupo 5 - Diabético não infectado (DNI): animais tratados com estreptozotocina e não infectados com a nenhuma amostra bacteriana e com acesso livre à água e ração;

Grupo 6 - Diabético Infectado com a amostra de GBS90356 (DI - GBS90356) e com acesso livre à água e ração;

Grupo 7 - Diabético Infectado com a amostra de GBS90356 Δ bspC (DI - GBS90356 Δ bspC) e com acesso livre à água e ração;

Grupo 8 - Diabético Infectado com a amostra GBSCOH1 (DI - GBSCOH1) e com acesso livre à água e ração.

Quadro 1 - Modelo de infecção aguda de 1 semana

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 GBSCOH1	GBSCOH1	Intraperitoneal	Aguda
Diabético não infectado	DNI	-	Intraperitoneal	Aguda
Diabético infectado	DI GBS90356	GBS90356	Intraperitoneal	Aguda
Diabético infectado	DI GBS90356 Δ bspC	GBS90356 Δ bspC	Intraperitoneal	Aguda
Diabético infectado	DI GBSCOH1	GBSCOH1	Intraperitoneal	Aguda

Fonte: Autora, 2024.

2.5 Indução da diabetes mellitus

Os animais foram previamente pesados e marcados com uma caneta permanente para identificação.

A indução da diabetes foi realizada utilizando 180mg/kg da droga estreptozotocina (Sigma-Aldrich) diluída em tampão citrato em dose única por via intraperitoneal. Os animais controle foram tratados com tampão citrato 40mM pH 4,5. Após a indução, os animais receberam no primeiro dia 200 ml de água com adição de aproximadamente 100g de açúcar, além da ração já utilizada, a fim de evitar hipoglicemia neste período inicial após a indução.

2.6 Aferição da glicemia

A glicemia foi aferida 2h antes da indução da diabetes com a estreptozotocina e 48h após a indução à diabetes, com o auxílio de um monitor de glicemia AccuCheck Active e fitas glicêmicas. Para a dosagem glicêmica, os animais foram momentaneamente imobilizados e submetidos a um pequeno corte na ponta da cauda, o sangue foi diretamente colocado nas fitas glicêmicas para leitura pelo aparelho. Foi considerado diabético o animal com o índice glicêmico acima de 200 mg/dL, seguindo o parâmetro de Kasap e colaboradores (2017).

2.7 Infecção com amostras bacterianas

Os camundongos foram inicialmente tratados com o anestésico (0,17 mL xylazina, 2,83 mL solução salina, 0,33 mL ketamina) por via intraperitoneal. Cada animal recebeu entre 0,10 mL e 0,15 mL do anestésico, de acordo com seu peso. Em seguida, os animais receberam uma infecção com 30 μ L da suspensão bacteriana cultivada em meio BHI (0,2 UDO; $\sim 1 \times 10^5$ UFC/mL) por via intraperitoneal. Os grupos infectados foram alojados em caixas separadas, com 2 a 4 animais por caixa, até o momento da eutanásia para a coleta dos órgãos para análise.

2.8 Morte dos animais

Após uma semana de infecção, os animais foram anestesiados, imobilizados e cerca de 200 μ L de sangue foram retirados de cada animal com o auxílio de pipetas *Pasteur* de vidro. O sangue foi armazenado em tubos de 1,5 mL devidamente identificados. 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 utilizados neste estudo foram sacrificados por meio da administração de altas doses de anestésicos (xilazina e ketamina). Após a anestesia, foi realizada a deslocação cervical em cada animal. Os camundongos foram

submetidos a necropsia para a remoção dos órgãos de interesse: fígado e baço. Parte desses órgãos foi armazenada em refrigeração a 4°C em tubos cônicos (50 mL) com paraformaldeído a 4% para análises histológicas. O restante dos órgãos foi colocado em tubos de vidro separados com solução salina e macerado com um macerador de vidro individual para cada órgão. A diluição de 1:1000 em solução salina 0,9% foi usada para o plaqueamento em placas de agar com 5% de sangue de carneiro para a contagem bacteriana em UFC/mL.

2.9 Contagem bacteriana

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

Os grupos sem inóculo foram igualmente plaqueados para verificar uma possível contaminação. Para certificar de que se tratava da amostra de *S. agalactiae*, as colônias recuperadas dos órgãos dos animais foram submetidas aos testes de identificação bacteriana.

2.10 Histologia de fígado e baço

Para os ensaios histológicos, foram utilizados apenas os fígados e baços dos camundongos. Após a eutanásia dos animais, os respectivos órgãos foram retirados com o auxílio de pinças e tesouras estéreis. Cada órgão foi colocado separadamente em tubos cônicos (15 mL) previamente identificados com os seguintes volumes de paraformaldeído 4%: 10 mL para os tubos contendo fígado e baço. Em todos os tubos foi adicionada gaze estéril para que o órgão ficasse em contato direto com o paraformaldeído e foram reservados a 4°C até o processamento.

Em cortes histologicamente preparados, o tecido foi inserido dentro de um cassete nomeado e estes foram lavados em água corrente por 20 min, em álcool 80% por 10 min, três lavagens de álcool 95% por 15 min cada, e mais três lavagens em álcool 100% por 15 min cada. Em seguida, os cassetes foram submetidos a duas lavagens com álcool com xilol 1:1 por 15 min e então, duas vezes no xilol por 15 min cada. O material foi banhado na parafina por duas vezes, 15 min cada. Por último, foi realizada a inclusão definitiva em parafina e os cortes foram realizados com o auxílio de um micrótomo. Os cortes foram feitos com a espessura de 5 µm e em seguida foram fixados às lâminas de vidro. Por fim, foram feitas duas lâminas de cada corte para coloração com hematoxilina e eosina (HE). As lâminas coradas foram analisadas em diferentes aumentos no microscópio óptico e fotografadas em 10x, 20x e 40x.

2.10.1 Coloração hematoxilina e eosina (HE)

Essa coloração foi iniciada com os blocos colocados na estufa de 58°C durante 30 min e em seguida desparafinados e hidratados passando pelas etapas de lavagem com: xilol 1 e 2 por 5 min/cada, álcool 100% por 3 min, álcool 90%, álcool 70% por 1 min/cada e água destilada em 25 mergulhos. O material foi então corado com hematoxilina por 15 min, lavado em água corrente por mais 15 min e em água destilada em 10 mergulhos. Posteriormente, foi corado com eosina por 2 min e lavado em água destilada em 2 mergulhos. O passo seguinte foi a desidratação com álcool 70%, 90%, 100% por 1 min/cada, xilol 3 e 4 por 2 min. Por fim, foram montadas as lâminas. Nas imagens obtidas pelo microscópio os núcleos ficam corados de azul ou roxo enquanto o tecido conjuntivo, citoplasma e fibras extracelulares em geral ficam corados de vermelho ou rosa.

2.11 Análise estatística

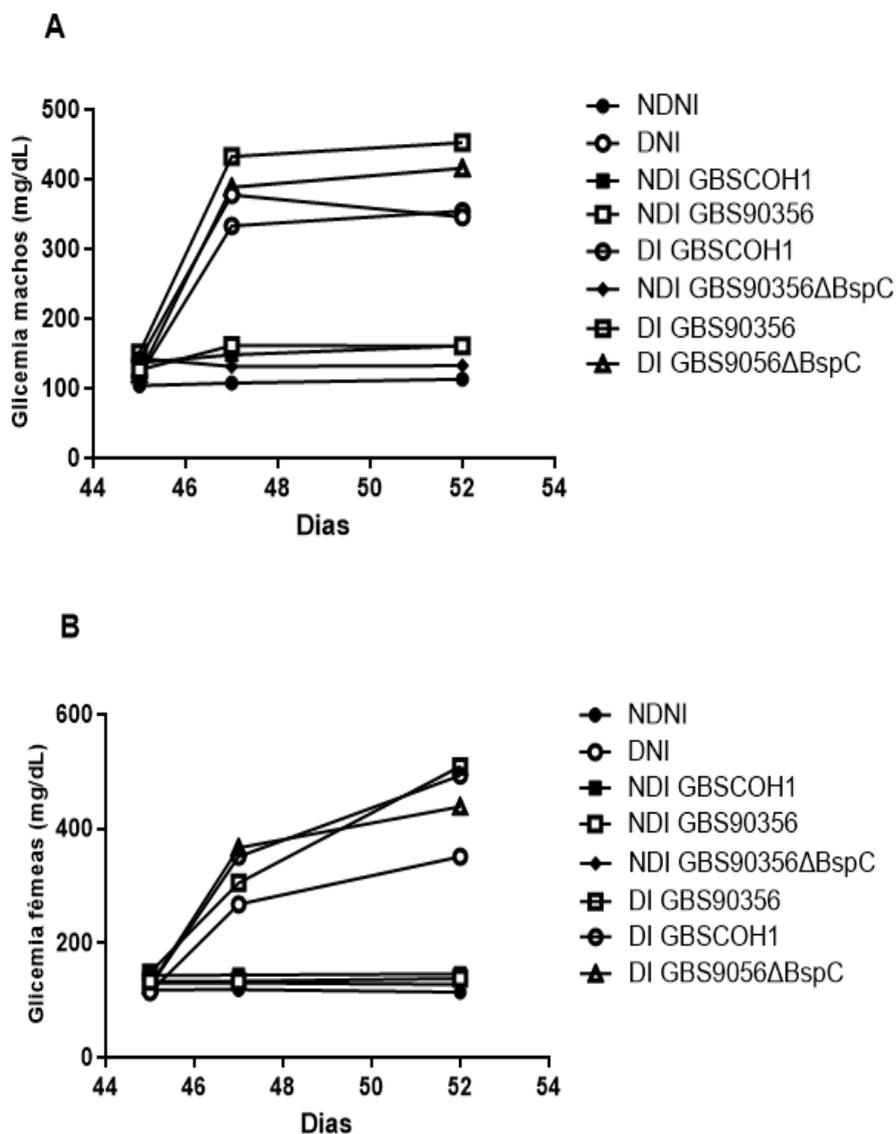
As análises estatísticas foram realizadas utilizando o GraphPad Prisma com o emprego do teste one-way ANOVA e o pós-teste Newman-Keuls.

3 RESULTADOS

3.1 Glicemia e confirmação do modelo de indução da diabetes

A glicemia de todos os animais do estudo foi aferida: (i) antes dos experimentos; (ii) após a indução da diabetes e, (iii) no dia da eutanásia. Todas as aferições foram realizadas após seis horas de jejum. A totalidade dos animais (machos e fêmeas) utilizados no experimento de 1 semana de infecção foram considerados diabéticos, apresentando dosagem glicêmica acima de 200 mg/dL (Figura 1). Os animais resistentes à insulina foram descartados, representando uma média de 10% do número total.

Figura 1 – Aferição dos níveis de glicemia dos camundongos com 1 semana de infecção



Fonte: Autora, 2024.

Legenda: (A) Glicemia dos machos nos dias P45, P47 e P52 de vida do animal. (B) Glicemia das fêmeas nos dias P45, P47 e P52 de vida do animal.

NDNI - Não diabético não-infectado; DNI – Diabético não-infectado; NDIGBSCOH1 - Não diabético infectado com a amostra GBSCOH1; NDIGBS904356- Não diabético infectado com a amostra GBS90356; NDIGBS90356Δ*bspC* - Não diabético infectado com a amostra GBS90356Δ*bspC*; DIGBS90356 - Diabético Infectado com a amostra de GBS90356; DIGBS90356Δ*bspC* - Diabético Infectado com a amostra de GBS90356Δ*bspC*; DIGBSCOH1- Diabético Infectado com a amostra COH1.

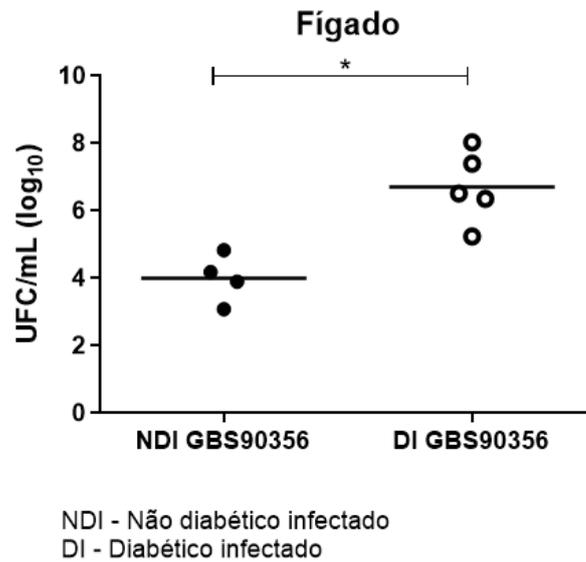
3.2 Contagem das unidades formadoras de colônias (UFC/mL) com 1 semana de infecção

A inoculação das amostras GBSCOH1, GBS90356 e GBS90356 Δ *bspC* realizadas por via intraperitoneal obteve sucesso, havendo crescimento bacteriano nos órgãos analisados. As contagens de unidades formadoras de colônia (UFC/mL) provenientes dos macerados do fígado e baço foram realizadas para determinar a efetividade da infecção intraperitoneal e a capacidade de disseminação através da corrente sanguínea (Figuras 1-6). Não houveram diferenças significativas entre as amostras bacterianas testadas.

Não houve crescimento bacteriano nos grupos controle e diabético não infectado. No fígado e no baço foi observado maior crescimento bacteriano no grupo diabético infectado quando comparado ao grupo não diabético infectado, com todas as amostras de *S. agalactiae* utilizadas no presente estudo ($p < 0,05$).

Os dados confirmam que em uma semana de infecção os animais já apresentavam um quadro de infecção aguda.

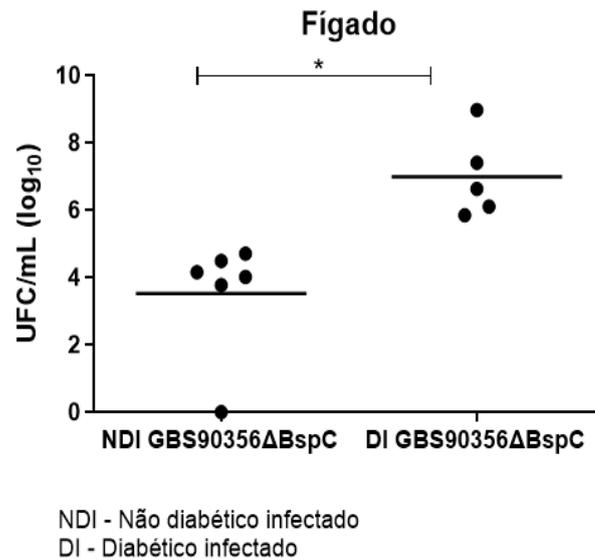
Figura 2 - Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) no fígado de animais não diabéticos infectados e diabéticos infectados após uma semana de infecção por GBS90356.



Fonte: Autora, 2024.

Legenda: Quantificação das unidades formadoras de colônia no fígado de camundongos não diabéticos infectados e diabéticos infectados por GBS90356, após uma semana. * $p < 0,05$, teste t no GraphPad Prism.

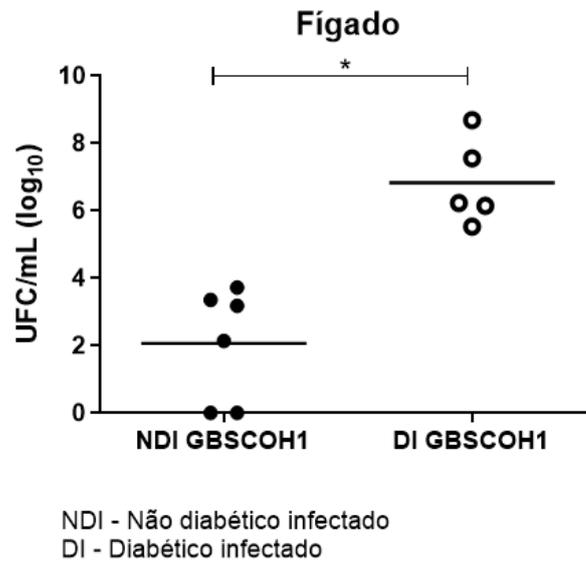
Figura 3 - Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) no fígado de animais não diabéticos infectados e diabéticos infectados após uma semana de infecção por GBS90356 Δ bspC.



Fonte: Autora, 2024.

Legenda: Quantificação das unidades formadoras de colônia no fígado de camundongos não diabéticos infectados e diabéticos infectados por GBS90356 Δ bspC, após uma semana. * $p < 0,05$, teste t no GraphPad Prism.

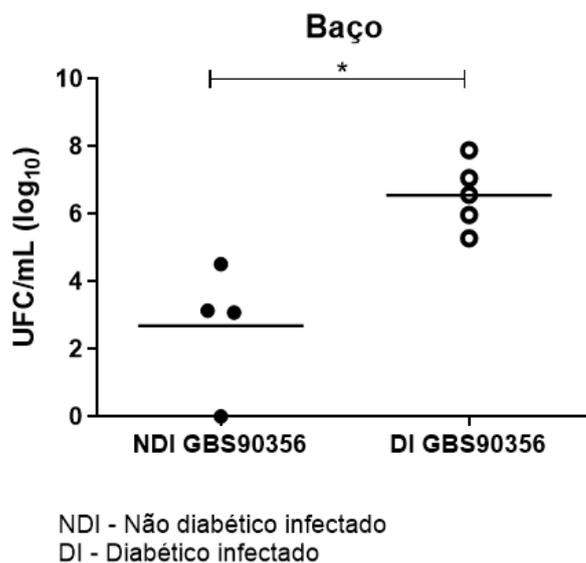
Figura 4 - Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) no fígado de animais não diabéticos infectados e diabéticos infectados após uma semana de infecção por GBSCOH1.



Fonte: Autora, 2024.

Legenda: Quantificação das unidades formadoras de colônia no fígado de camundongos não diabéticos infectados e diabéticos infectados por GBSCOH1, após uma semana. * $p < 0,05$, teste t no GraphPad Prim.

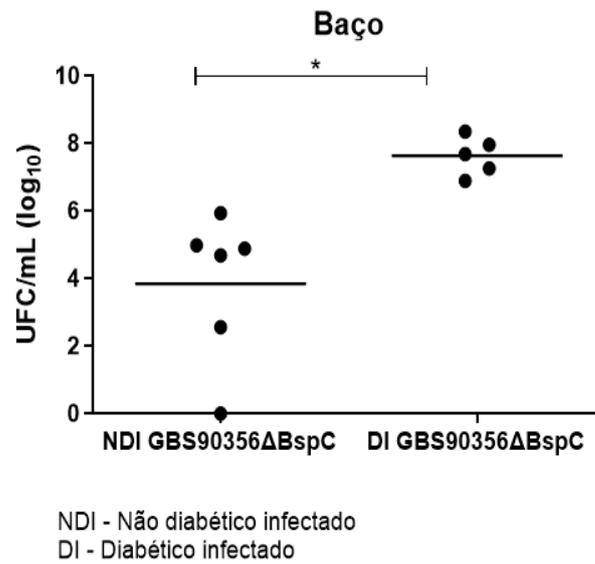
Figura 5 - Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) no baço de animais não diabéticos infectados e diabéticos infectados após uma semana de infecção por GBS90356.



Fonte: Autora, 2024.

Legenda: Quantificação das unidades formadoras de colônia no baço de camundongos não diabéticos infectados e diabéticos infectados por GBS90356, após uma semana. * $p < 0,05$, teste t no GraphPad Prim.

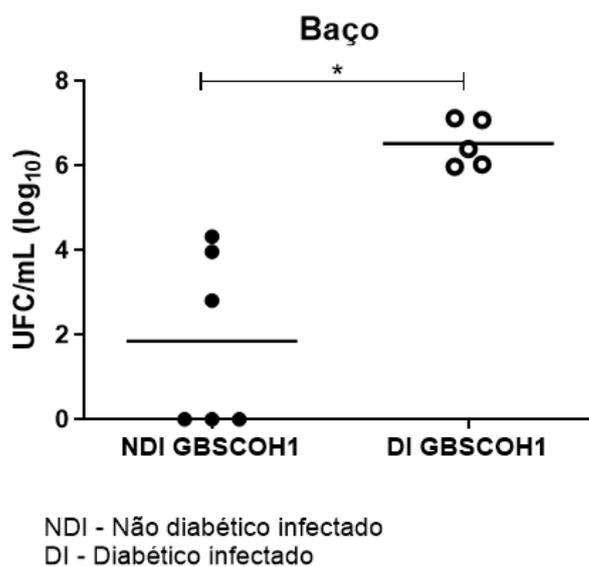
Figura 6 - Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) no baço de animais não diabéticos infectados e diabéticos infectados após uma semana de infecção por GBS90356 Δ *bspC*.



Fonte: Autora, 2024.

Legenda: Quantificação das unidades formadoras de colônia no baço de camundongos não diabéticos infectados e diabéticos infectados por GBS90356 Δ *bspC*, após uma semana. $*p < 0,05$, teste *t* no GraphPad Prism.

Figura 7 - Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) no baço de animais não diabéticos infectados e diabéticos infectados após uma semana de infecção por GBSCOH1.



Fonte: Autora, 2024.

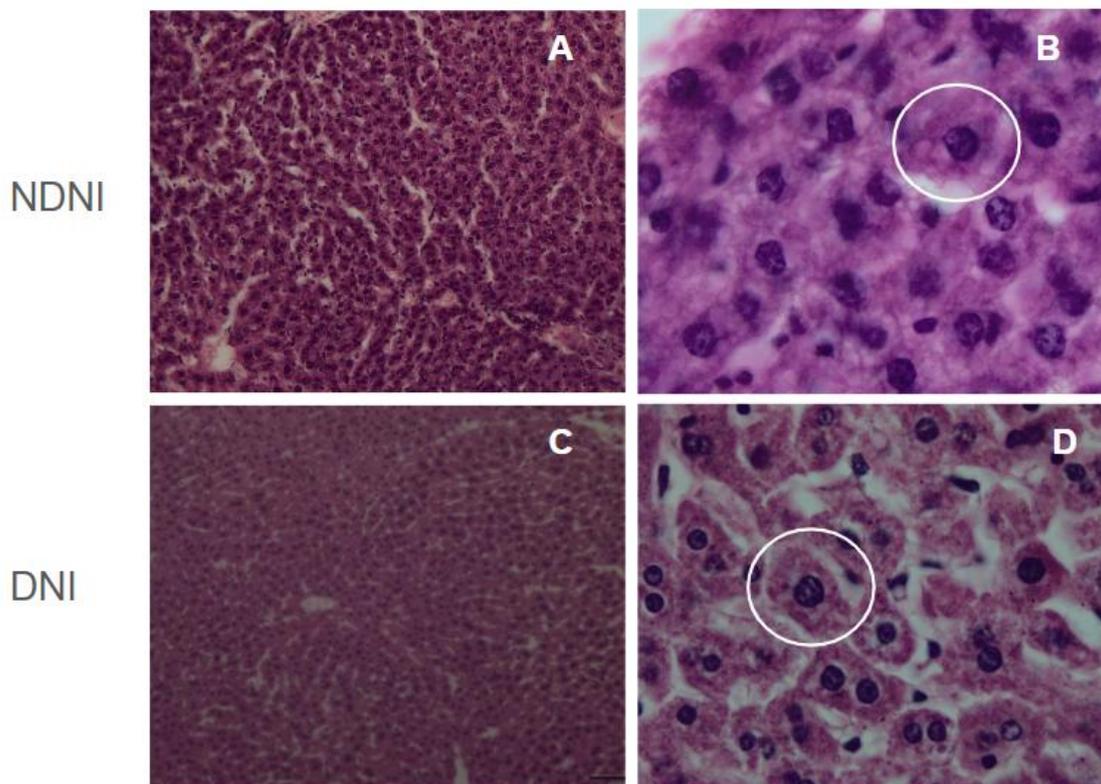
Legenda: Quantificação das unidades formadoras de colônia no baço de camundongos não diabéticos infectados e diabéticos infectados por GBSCOH1, após uma semana. * $p < 0,05$, teste t no GraphPad Prism.

3.3 Análises histológicas do fígado e baço de animais submetidos ao modelo de infecção aguda

A coloração por hematoxilina e eosina (HE) permite ter uma visão geral do órgão a ser estudado. Os parâmetros analisados a partir das imagens de HE foram baseados nas alterações observadas em comparação com um tecido saudável.

As análises histológicas do fígado demonstraram que o grupo controle não-diabético não-infectado (NDNI) apresentou lóbulo hepático e estruturas preservadas, com cordões de hepatócitos entremeados por capilares sinusoides normais (Figura 8A-B). O grupo controle diabético não-infectado (DNI) também apresentou lóbulo hepático e estruturas preservadas (Figura 8C-D). Contudo, após a infecção com as amostras GBS90356 (Figura 9A-B) ou GBS90356 Δ bspC (Figura 10A-B), os animais não diabéticos infectados (NDI) apresentaram infiltrado inflamatório de polimorfonucleares (PMN) nos vasos sanguíneos e proximidades, bem como marcadores de necrose como cariopicnose, cariorrexe e cariolise. O grupo diabético infectado (DI) apresentou maior quantidade de infiltrado inflamatório de PMN nos vasos, bem como hepatócito binucleado e marcadores de necrose como cariopicnose, cariorrexe e cariolise, após a infecção com ambas amostras bacterianas GBS90356 e GBS90356 Δ bspC (Figuras 9C-D e 10C-D). Com relação aos animais NDI com a amostra GBSCOH1, a presença de infiltrado inflamatório de PMN nos vasos e proximidades, hepatócitos binucleados e marcadores de necrose como cariopicnose, cariorrexe e cariolise também foi observada (Figura 11A-B). Contudo, nos animais DI com a amostra GBSCOH1, além do infiltrado inflamatório de PMN, hepatócito binucleado e marcadores de necrose houve também a presença de muitas células de Kupffer nos sinusóides que não havia sido visualizada nas infecções com as amostras bacterianas GBS90356 e GBS90356 Δ bspC (Figura 11C-D).

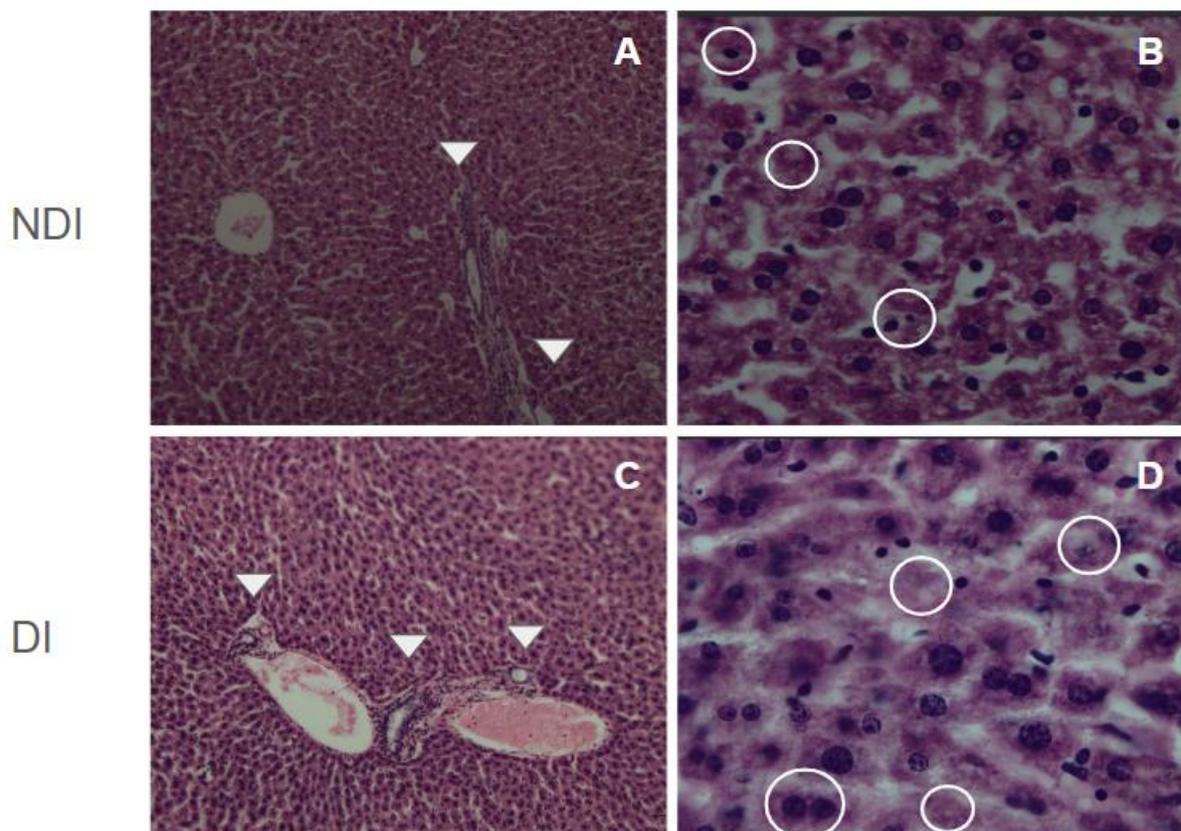
Figura 8 – Aspectos gerais do fígado dos animais controles diabéticos e não diabéticos não-infectados.



Fonte: Autora, 2024.

Legenda: (A) Grupo não-diabético não-infectado (NDNI) apresentando lóbulo hepático e estruturas preservadas, aumento de 20x; (B) Grupo NDNI apresentando cordões de hepatócitos entremeados por capilares sinusoides em normalidade (círculo), aumento de 100x; (C) Grupo diabético não-infectado (DNI) apresentando lóbulo hepático e estruturas preservadas, aumento de 20x; (D) Grupo DNI apresentando cordões de hepatócitos entremeados por capilares sinusoides em normalidade (círculo), aumento de 100x.

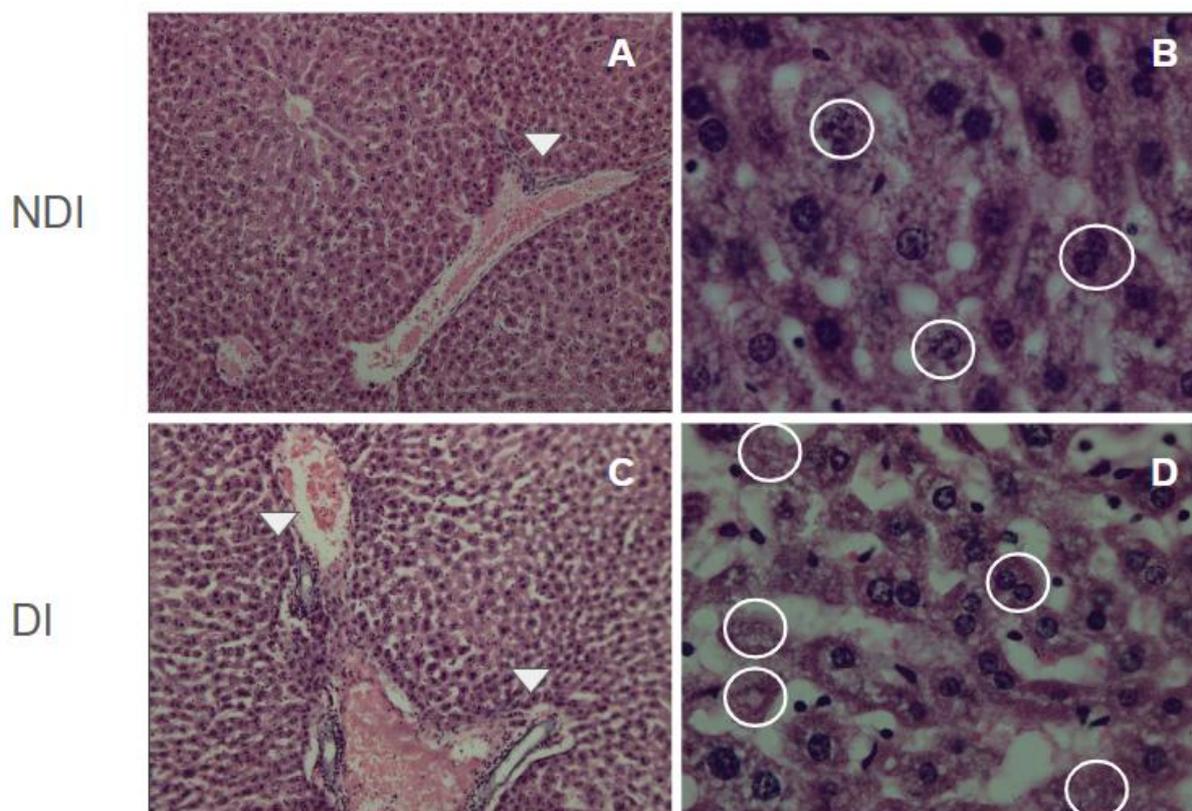
Figura 9 – Aspectos gerais do fígado dos animais infectados com a amostra GBS90356.



Fonte: Autora, 2024.

Legenda: (A) Grupo não-diabético infectado (NDI) com a amostra GBS90356 apresentando infiltrado inflamatório de PMN nos vasos sanguíneos e proximidades (seta), aumento de 20x; (B) Grupo NDI com a amostra GBS90356 apresentando marcadores de necrose como cariopícnose, cariorrexe e cariolise (círculo), aumento de 100x; (C) Grupo diabético infectado (DI) com a amostra GBS90356 apresentando infiltrado inflamatório de PMN nos vasos sanguíneos e proximidades (seta), aumento de 20x; (D) Grupo DI com a amostra GBS90356 apresentando hepatócito binucleado e marcadores de necrose como cariopícnose, cariorrexe e cariolise (círculo), aumento de 100x.

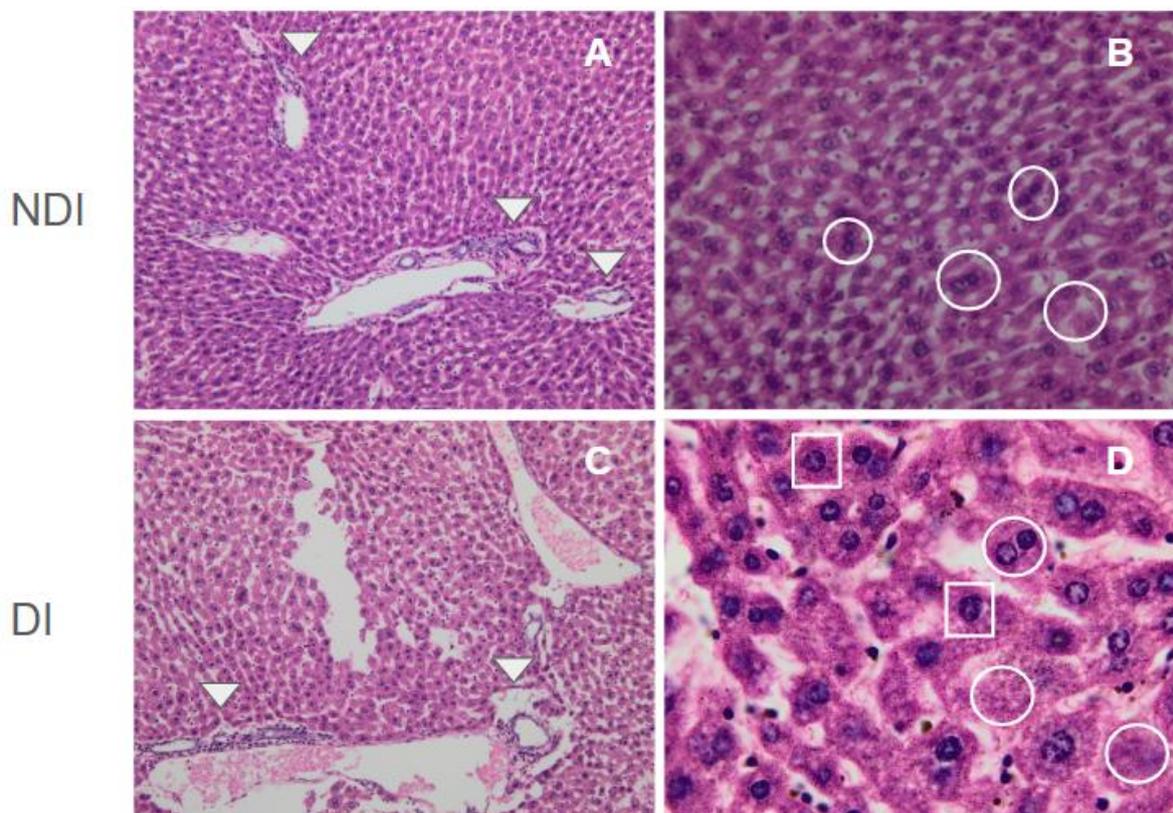
Figura 10 – Aspectos gerais do fígado dos animais infectados com a amostra GBS90356 Δ bspC.



Fonte: Autora, 2024.

Legenda: (A) Grupo não-diabético infectado (NDI) com a amostra GBS90356 Δ bspC apresentando infiltrado inflamatório nos vasos sanguíneos de PMN nos vasos e proximidades (seta), aumento de 20x; (B) Grupo NDI com a amostra GBS90356 Δ bspC apresentando hepatócito binucleado e marcadores de necrose como cariopícnose, cariorrexe e cariólise (círculo), aumento de 100x; (C) Grupo diabético infectado (DI) com a amostra GBS90356 Δ bspC apresentando infiltrado inflamatório de PMN nos vasos sanguíneos e proximidades (seta), aumento de 20x; (D) Grupo DI com a amostra GBS90356 Δ bspC apresentando hepatócito binucleado e marcadores de necrose como cariopícnose, cariorrexe e cariólise (círculo), aumento de 100x.

Figura 11 – Aspectos gerais do fígado dos animais infectados com a amostra GBSCOH1.



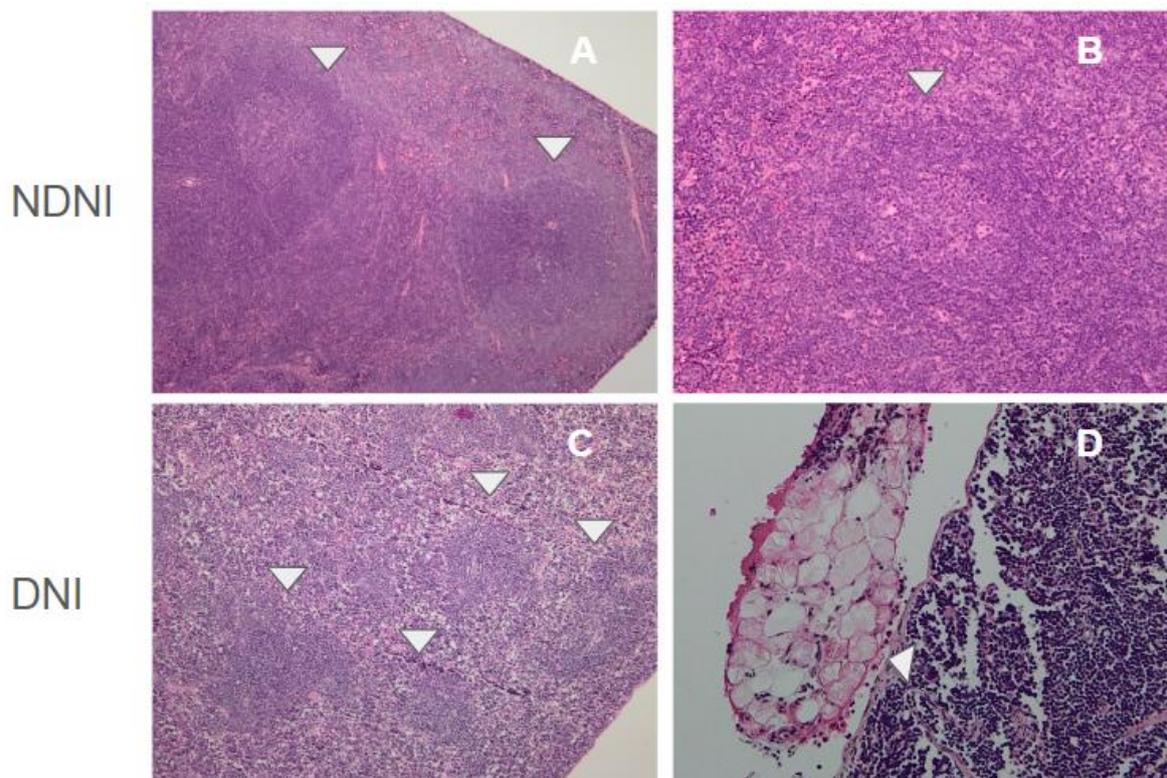
Fonte: Autora, 2024.

Legenda: (A) Grupo não-diabético infectado (NDI) com a amostra GBSCOH1 apresentando infiltrado inflamatório de PMN nos vasos e proximidades (seta), aumento de 20x; (B) Grupo NDI com a amostra GBSCOH1 apresentando hepatócito binucleado e marcadores de necrose como cariopícnose, cariorrexe e cariólise (círculo), aumento de 40x; (C) Grupo diabético infectado (DI) com a amostra GBSCOH1 apresentando infiltrado inflamatório de PMN nos vasos e proximidades (seta), aumento de 20x; (D) Grupo DI com a amostra GBSCOH1 apresentando muitas células de Kupffer nos sinusóides (quadrado), hepatócito binucleado e marcadores de necrose como cariopícnose, cariorrexe e cariólise (círculo), aumento de 100x.

As análises histológicas do baço demonstraram que os grupos controles não diabético não infectado (NDNI) apresentaram polpa branca e polpa vermelha (restante em torno) com características normais (Figura 12A-B). O grupo diabético não infectado (DNI) apresentou muita gordura próxima ao baço, além de polpa branca e polpa vermelha (restante em torno) com características normais (Figura 12C-D). Os animais não diabéticos infectados (NDI) com a amostra GBS90356 apresentaram polpa branca normal e infiltrado inflamatório de PMN próximo aos vasos sanguíneos (Figura 13A-B). No grupo diabético infectado (DI) com a amostra GBS90356 houve a presença de polpa branca mais espessa (Figura 13C), sugerindo uma possível esplenomegalia e maior infiltrado inflamatório de PMN quando comparado ao não diabético (Figura 13D).

Com relação à infecção com as amostras mutante GBS90356 Δ *bspC* e COH1, ambas apresentaram resultados semelhantes, onde o grupo NDI apresentou infiltrado inflamatório de PMN e polpa branca aumentada (Figuras 14A-B e 15A-B); contudo, os animais DI apresentaram além da polpa branca aumentada e do infiltrado inflamatório de PMN, vários macrófagos espalhados na região da polpa branca foram observados (Figura 14C-D e 15C-D).

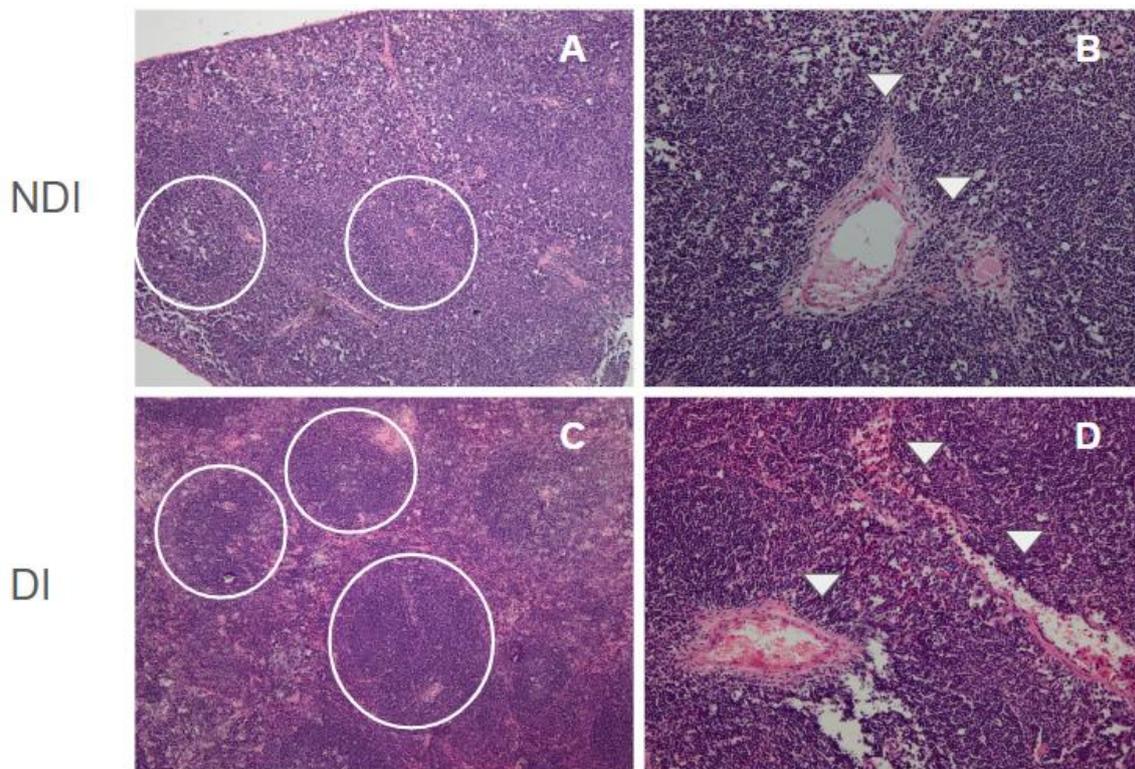
Figura 12 – Aspectos gerais do baço dos animais controles diabéticos e não diabéticos não infectados.



Fonte: Autora, 2024.

Legenda: (A) Grupo não-diabético não-infectado (NDNI) apresentando polpa branca (seta) e polpa vermelha (restante em torno) em normalidade, aumento de 10x; (B) Grupo NDNI apresentando polpa branca (seta) e polpa vermelha (restante em torno) em normalidade, aumento de 20x; (C) Grupo diabético não-infectado (DNI) apresentando polpa branca (seta) e polpa vermelha (restante em torno) em normalidade, aumento de 10x; (D) Grupo DNI apresentando gordura rente ao baço (seta), aumento de 20x.

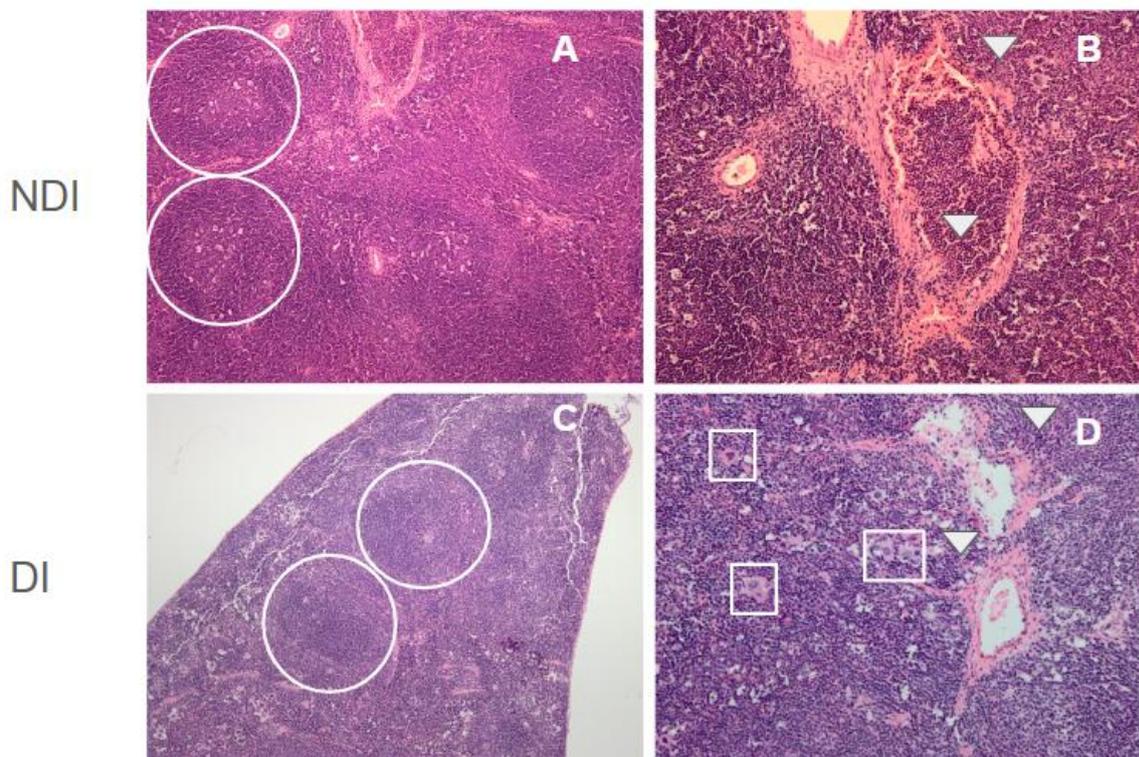
Figura 13 – Aspectos gerais do baço dos animais infectados com a amostra GBS90356.



Fonte: Autora, 2024.

Legenda: (A) Grupo não-diabético infectado (NDI) com a amostra GBS90356 apresentando polpa branca normal (círculo), aumento de 10x; (B) Grupo NDI com a amostra GBS90356 apresentando infiltrado inflamatório (seta), aumento de 20x; (C) Grupo diabético infectado (DI) com a amostra GBS90356 apresentando polpa branca mais espessa (círculo); aumento de 20x; (D) Grupo DI com a amostra GBS90356 apresentando infiltrado inflamatório (seta); aumento de 20x.

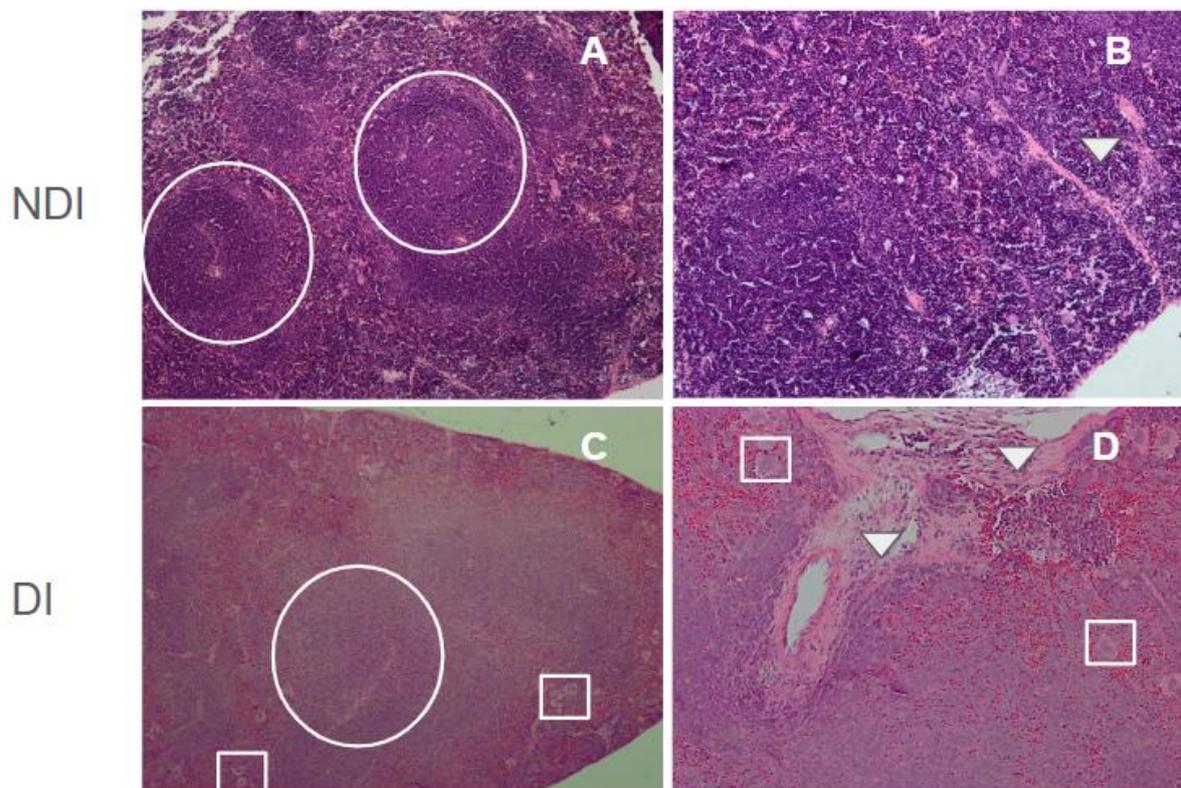
Figura 14 – Aspectos gerais do baço dos animais infectados com a amostra GBS90356 Δ bspC.



Fonte: Autora, 2024.

Legenda: (A) Grupo não-diabético infectado (NDI) com a amostra GBS90356 Δ bspC apresentando polpa branca aumentada (círculo), aumento de 20x; (B) Grupo NDI com a amostra GBS90356 Δ bspC apresentando infiltrado inflamatório (seta), aumento de 20x; (C) Grupo diabético infectado (DI) com a amostra GBS90356 Δ bspC apresentando polpa branca aumentada (círculo); aumento de 10x; (D) Grupo DI com a amostra GBS90356 Δ bspC apresentando infiltrado inflamatório (seta) e macrófagos recrutados (quadrado); aumento de 20x.

Figura 15 – Aspectos gerais do baço dos animais infectados com a amostra GBSCOH1.



Fonte: Autora, 2024.

Legenda: (A) Grupo não-diabético infectado (NDI) com a amostra GBSCOH1 apresentando polpa branca aumentada (círculo), aumento de 20x; (B) Grupo NDI com a amostra GBSCOH1 apresentando infiltrado inflamatório (seta), aumento de 20x; (C) Grupo diabético infectado (DI) com a amostra GBSCOH1 apresentando polpa branca aumentada (círculo) e macrófagos recrutados (quadrado); aumento de 10x; (D) Grupo DI com a amostra GBSCOH1 apresentando infiltrado inflamatório (seta) e macrófagos recrutados (quadrado); aumento de 20x.

4 DISCUSSÃO

Embora a mortalidade associada a infecções por *S. agalactiae* tenha diminuído nas últimas duas décadas, os índices de sepse em adultos não-grávidos ainda são preocupantes, com aproximadamente 5% dos casos resultando em óbito (Edwards, Baker, 2005). Pesquisas identificam o *S. agalactiae* como uma das bactérias mais relevantes em infecções invasivas, afetando neonatos, idosos e adultos com imunossupressão (Santos et al., 2013). Segundo dados de bancos de dados internacionais, aproximadamente 30% das mulheres apresentam *S. agalactiae* nas regiões retal e/ou vaginal, podendo ser classificada como permanente, intermitente ou transitória (Verani & Schrang et al., 2010). Ademais, estudos indicam que 52,4% dos neonatos nascidos de mães portadoras de *S. agalactiae* estavam colonizados por esse microrganismo (Madzi Handl et al., 2011).

A situação é especialmente crítica entre adultos com doenças crônicas, como diabetes mellitus, cuja taxa de infecções invasivas por esse patógeno tem crescido significativamente. Para indivíduos com mais de 65 anos, a incidência de doenças invasivas é de cerca de 25 casos a cada 100.000 pessoas (CDC, 2016). Entre 2008 e 2016, um estudo realizado nos Estados Unidos identificou 21.250 casos de infecção invasiva por *S. agalactiae* em adultos não grávidos. Durante esse período, a incidência de infecções invasivas aumentou de 8,1 para 10,9 casos por 100.000 habitantes, sendo a obesidade e a diabetes as condições subjacentes mais frequentemente associadas (Watkin et al., 2019). Na Inglaterra, um estudo conduzido entre 2015 e 2016 reportou 2.506 casos de infecção invasiva por *S. agalactiae* em adultos com mais de 15 anos, resultando em uma incidência anual de 3,48 por 100.000 habitantes. A diabetes foi identificada em 39,9% dos casos (1.000 de 2.506) (Collin et al., 2020). Na França, uma pesquisa que incluiu pacientes adultos não-grávidos hospitalizados entre 1997 e 2006 revelou que 90,6% dos 64 pacientes identificados apresentavam pelo menos uma condição médica subjacente, sendo a diabetes a mais prevalente, observada em 43,7% dos casos (Lefebvre et al., 2007). Mesmo com os avanços nas técnicas de profilaxia neonatal e nos tratamentos recomendados pelo CDC, a taxa de doenças invasivas por esse patógeno em adultos com doenças crônicas, particularmente diabetes mellitus, tem apresentado um aumento considerável (CDC, 2020).

Apesar da diabetes ser a doença mais frequentemente associada às infecções por *S. agalactiae*, ainda são escassos os estudos sobre suas interações em modelos diabéticos. Estudos com modelos animais sugerem que a indução de diabetes mellitus é efetivamente realizada com a droga estreptozotocina, que é isolada de *Streptomyces achromogenes var. streptozoticus* e causa danos irreversíveis às células beta do pâncreas (Edwards, Fuselier, 1983). Em nossos experimentos com camundongos da linhagem *Swiss webster*, observamos que todos os animais dos grupos diabético não-infectado (DNI) e diabético infectado (DI) apresentaram aumento nos níveis de glicose, confirmando a eficácia da estreptozotocina na indução do diabetes. Cabe ressaltar que este trabalho é pioneiro em analisar infecções por *S. agalactiae* em modelo murinho de diabetes induzida afetando o fígado e o baço. Desta forma, não foram encontradas publicações prévias que corroborassem ou não com os resultados obtidos. Sendo assim, utilizamos como dados de comparação alguns estudos realizados com tilápias infectadas pelo *S. agalactiae*. Adicionalmente, como não houveram diferenças significativas entre as diferentes amostras bacterianas utilizadas, incluindo a mutante para proteína BspC, os resultados serão discutidos para a espécie *S. agalactiae*.

Estudo com tilápias realizado por Marcusso (2014) evidenciou a presença de colônias bacterianas em diversos órgãos, como fígado, baço, rins e cérebro, demonstrando a capacidade das bactérias de causar necrose local, invadir e proliferar dentro de fagócitos, além de se disseminar por diferentes órgãos, incluindo a transposição da barreira hematoencefálica. Em nosso trabalho, a inoculação das amostras GBS90356, GBS90356 Δ bspC e GBSCOH1 realizadas por via intraperitoneal obteve sucesso, onde todos os animais infectados apresentaram crescimento bacteriano. Após a inoculação intraperitoneal, o *S. agalactiae* foi capaz de se estabelecer no fígado e baço, demonstrando a eficácia do modelo de inoculação intraperitoneal empregado nesse estudo, bem como a capacidade de disseminação do microrganismo.

Como a colonização é uma etapa da progressão para a infecção, torna-se importante compreender os mecanismos dessa progressão (Martin, Bachman, 2018). Sabe-se que bactérias podem empregar duas estratégias distintas, seja causando uma infecção aguda, crescendo e se espalhando rapidamente no hospedeiro, ou, alternativamente, adotando uma estratégia de infecção crônica, a replicação no

contexto da infecção crônica é provavelmente menos rápida; porém, o micro-organismo envolvido nessas infecções de longo prazo pode persistir por longos períodos de tempo (Furukawa et al., 2006). No presente trabalho foi possível notar que *S. agalactiae* com o tempo de 1 semana de infecção causou uma infecção generalizada, desenvolveu doença aguda, invadindo órgãos e se multiplicando de forma acelerada.

A amostra GBS90356 é considerada uma amostra padrão do nosso laboratório, tendo sido utilizada no LBMFE como modelo para interação com várias linhagens celulares (Miranda et al., 2018). Ao analisar a linhagem genética da amostra GBS90356, que contém o gene *hvgA* (ST-17), podemos classificá-la como hiperinvasiva (Hoshina et al., 2002). Dados do nosso grupo indicaram que a amostra GBS90356 do tipo capsular III, isolada de líquido, apresentou uma alta capacidade invasiva em diversos tipos celulares (Costa et al., 2011; Soares et al., 2013). Esses resultados estão em concordância com pesquisas de outros autores, que também afirmam que amostras do tipo III ST-17 apresentam maior virulência. Experimentos realizados com a técnica de MLST demonstraram que a sequência ST-17 caracteriza um clone que é "altamente virulento e invasivo", uma propriedade observada na maioria das amostras do tipo capsular III, frequentemente relacionada às infecções invasivas em neonatos (Lamy et al., 2006). A amostra GBSCOH1 foi isolada também de um recém-nascido septicêmico, sendo mundialmente utilizada como cepa controle em estudos de virulência de cepas ST-17 isoladas de infecções invasivas (Zaschke-Kriesche et al., 2019; Ravi et al., 2023).

Trabalhos anteriores mostram que as interações entre a proteína bacteriana BspC e a vimentina da célula hospedeira participam do processo de invasão das meninges por *S. agalactiae* (Deng et al., 2019). A cepa mutante GBS90356 Δ bspC foi utilizada nesse estudo para analisarmos se a proteína BspC está envolvida de forma importante na invasão de tecidos além do cérebro; pois recentemente, foi demonstrado que a BspC contribuiu para a adesão do *S. agalactiae* às células vaginais e cervicais humanas. Houve também uma maior capacidade de colonizar o lúmen vaginal e causar infecção ascendente, resultando em aumento da sinalização de neutrófilos dentro da vagina, colo do útero e útero (Manzer, 2022). Contudo, neste trabalho, não foram verificadas diferenças significativas entre a amostra selvagem GBS90356 com a mutante GBS90356 Δ bspC, sugerindo que a proteína BspC não

possui relevância durante a disseminação bacteriana no fígado e baço dos animais diabéticos e não diabéticos infectados.

Indivíduos diabéticos normalmente demonstram maior susceptibilidade às infecções bacterianas, associadas a diversos fatores de risco, incluindo alterações vasculares, obesidade, nefropatia e neuropatia, além de modificações nas respostas imune inata e humoral dos pacientes afetados (Rajagolapan, 2005; Johargy, 2016). Órgãos como o fígado e baço estão diretamente envolvidos nos mecanismos de defesa do sistema imunológico e desempenham papéis vitais no enfrentamento de doenças (Kiron, 2012). O fígado é um órgão vital responsável pela remoção de toxinas, produção de proteínas e manutenção da homeostase metabólica. A estrutura funcional, abriga um sistema imunológico complexo crucial para a homeostase local e sistêmica, influenciando a inflamação hepática e sua resolução. Estudos estão sendo realizados para compreender os processos imunológicos em fígados saudáveis e doentes, visando entender a inflamação e identificar caminhos para restaurar a homeostase (Cheng et al, 2021). O fígado parece projetado para detectar, capturar e limpar bactérias, vírus e macromoléculas, possuindo a maior coleção de células fagocíticas do corpo e, atuando como uma barreira importante entre o ser humano e o mundo exterior (Kubes e Jenne, 2018). Células endoteliais sinusoidais do fígado são capazes de detectar o microbioma, orquestrando ativamente a localização das células imunes, para otimizar a defesa do hospedeiro (Gola et al, 2021).

Todavia, o baço, o maior órgão linfóide secundário do corpo, também desempenha funções imunológicas, além de participar da hematopoiese e da remoção de glóbulos vermelhos. A estrutura do baço permite a filtração do sangue, eliminando patógenos e células anormais, além de promover interações entre células apresentadoras de antígenos (APCs) e linfócitos. APCs específicas do baço regulam a resposta das células T e B a alvos antigênicos presentes no sangue (Lewis et al, 2019). Além disso, o baço é responsável pela remoção de eritrócitos envelhecidos, microrganismos no sangue e detritos celulares. Essa combinação de funções, associada ao seu compartimento linfóide altamente estruturado, torna o baço fundamental para a reatividade imunológica contra bactérias e fungos (Mebius e Kraal, 2005).

No presente estudo, houve maior crescimento bacteriano no fígado do grupo diabético infectado quando comparado ao grupo não diabético infectado. Dados

previamente publicados verificaram que o fígado de tilápias infectadas por *S. agalactiae* ficou congestionado com necrose focal (Zamri-Saad et al., 2010). Da mesma forma ocorreu no baço, onde houve maior crescimento bacteriano no baço do grupo diabético infectado quando comparado ao grupo não-diabético infectado, corroborando os dados publicados com tilápias, onde o *S. agalactiae* foi encontrado no baço e fígado desse hospedeiro (Wende Wu et al., 2019).

O estudo histopatológico tem fornecido informações atualizadas sobre as alterações provocadas por patógenos em órgãos específicos, permitindo diagnósticos mais precisos e melhorando o tratamento das doenças. As análises histológicas são, portanto, fundamentais para compreender de maneira geral os diversos órgãos após infecções bacterianas, incluindo aqueles que não apresentam alterações macroscópicas. Estudo realizado por Kline e colaboradores (2011), demonstrou através de imagens histológicas coradas por HE (hematoxilina e eosina) que camundongos infectados por *S. agalactiae* em durante 3 h e 24 h, apresentaram a presença de numerosos polimorfonucleares, monócitos e linfócitos nos rins e bexiga dos animais infectados. Nos controles tratados com PBS não houveram indicativos de infecção. Nosso trabalho corrobora os dados acima, onde também foi observada uma quantidade superior de infiltrado de células inflamatórias no fígado e baço dos animais infectados, além de esplenomegalia.

No Brasil, um grupo realizou análises histopatológicas de fígado, baço e intestino médio de tilápias infectadas por *S. agalactiae* e foi observado que análises histológicas pré-infecção mostraram integridade de órgãos nos peixes examinados. No entanto, após a infecção foram encontrados infiltrados eosinofílicos e linfocíticos, micro e macroesteatose em todos os fígados analisados; uma baixa ocorrência de necrose também foi observada. No baço, ocorreram centros de melanomacrófago e melanomacrófago severos, necrose esplênica, infiltrado eosinofílico, macroesteatose, microesteatose e congestão (Owatari et al., 2019).

No fígado de camundongos infectados, foi possível visualizarmos características semelhantes, como infiltrado de neutrófilos polimorfonucleares e marcadores de necrose em todas as cepas utilizadas. Enquanto que no fígado não-infectado não foram observadas alterações. Da mesma forma, no baço de camundongos infectados observamos infiltrado inflamatório. Assim como, no baço não-infectado não foram encontradas alterações. Entretanto, no baço do grupo diabético não-infectado, foi encontrada gordura rente ao tecido, que pode ser

explicada pela diabetes, visto que adiposidade é frequentemente associada à resistência à insulina (Okla et al., 2017)

No baço dos camundongos infectados foi possível notar a poupa branca aumentada, que é um achado não visto anteriormente na literatura pela infecção por *S. agalactiae*. No entanto, em um estudo de Wang e colaboradores (2022), foi descoberto que *S. suis* induziu esplenomegalia em baços de camundongos C57BL/6, demonstrada através da expansão da polpa branca. Esplenomegalia é o termo médico usado para designar o aumento de tamanho do baço, e pode ter diversas causas, inclusive por infecções agudas ou crônicas.

Diante do exposto, o presente trabalho evidenciou pela primeira vez o comprometimento do fígado e baço após infecção pelo *S. agalactiae*, principalmente nos animais diabéticos, sugerindo maior comprometimento das funções vitais de ambos os órgãos durante a ativação da resposta imune. Desta forma, análises mais aprofundadas dos mecanismos afetados são necessárias para maior compreensão da patogênese do *S. agalactiae* em pacientes diabéticos. Além disso, o modelo de inoculação intraperitoneal mostrou-se adequado para análise do processo de infecção em modelo de diabetes induzida, podendo ser ampliado para outros microrganismos, podendo auxiliar em novas estratégias terapêuticas e profiláticas.

CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados podemos concluir que:

- A via de infecção intraperitoneal foi bem-sucedida, possibilitando a disseminação bacteriana nos animais;

- As amostras bacterianas GBS90356, GBS90356 Δ *bspC* e GBSCOH1 foram capazes de se disseminar pelo fígado e baço dos camundongos;

- O número de unidades formadoras de colônias foi superior nos grupos diabéticos infectado;

- As amostras bacterianas GBS90356, GBS90356 Δ *bspC* e GBSCOH1 foram capazes de causar alterações histológicas no fígado e baço dos camundongos;

- Todos os grupos infectados apresentaram casos de infiltrados inflamatórios no fígado e baço;

- No fígado dos animais infectados foram observados marcadores de necrose, como cariopícnose, cariorrexe e cariólise;

- No baço dos animais infectados foi observado polpa branca aumentada, podendo indicar esplenomegalia.

REFERÊNCIAS

ABAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. Immunology. Elsevier, 2015.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Manual de métodos de controle microbiológico de produtos. Brasília: Anvisa, 2008.

BROWN, J. S. et al. Invasive disease caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Nature Reviews Microbiology*, v. 12, n. 5, p. 365-379, 2014.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019. Atlanta, GA: CDC, 2020.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Invasive Group B *Streptococcus* Disease in Adults. Atlanta, GA: CDC, 2016.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Active Bacterial Core surveillance report, Emerging Infections Program Network. 2016.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Group B Streptococcal Disease. CDC, 2016.

CHAIWARITH, R. et al. Invasive group B *Streptococcus* disease in adults. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 17, n. 6, p. 789-796, 2011.

COLLINS, S. M. et al. Invasive group B streptococcal disease in England, 2015-2016: a report on adult cases. 2020.

COOLS, P.; MELIN, P. The burden of group B *Streptococcus*. *Journal of Infectious Diseases*, v. 216, Suppl. 2, p. S175-S181, 2017.

DALANEZI, F. M. et al. Impact of *Streptococcus agalactiae* in dairy production. *Journal of Dairy Science*, v. 103, n. 2, p. 1025-1037, 2020.

DEEDS, J. D. et al. Streptozotocin and its role in diabetes research. *Journal of Diabetes Research*, v. 2011, Article ID 534020, 2011.

DENG, H. et al. Role of BspC in group B Streptococcus meningitis. *Infection and Immunity*, v. 87, n. 7, p. e00045-19, 2019.

DENG, Y. et al. Bacterial Protein BspC and Its Role in Group B Streptococcus Meningitis. *Infection and Immunity*, v. 87, n. 4, e00990-18, 2019.

DORAN, K. S.; NIZET, V. Group B Streptococcus: A global perspective. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 52, n. 2, p. 417-425, 2014.

DORAN, K. S.; NIZET, V. Streptococcus agalactiae: a neonatal pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 17, n. 2, p. 222-227, 2004.

DU, H. et al. Pathological impacts of Streptococcus agalactiae in tilapia. *Aquaculture Research*, v. 53, n. 8, p. 2359-2371, 2022.

DUTRA, R. A. et al. Epidemiology and resistance patterns of group B Streptococcus. *Infection*, v. 42, n. 3, p. 567-572, 2014.

EDWARDS, M. S.; BAKER, C. J. Group B Streptococcus: A Review. *The New England Journal of Medicine*, v. 352, n. 6, p. 580-589, 2005.

EDWARDS, M. S.; FUSELIER, P. J. Streptozotocin-Induced Diabetes in Mice: Effects on Insulin Secretion and Sensitivity. *Diabetes*, v. 32, n. 5, p. 440-444, 1983.

FRANCOIS WATKIN, et al. Trends in Invasive Group B Streptococcal Disease in Adults. *Clinical Infectious Diseases*, v. 69, n. 3, p. 456-463, 2019.

FRYDRICH, A. et al. Diabetes Mellitus and Group B Streptococcus Infections. *Journal of Medical Microbiology*, v. 66, n. 1, p. 34-41, 2017.

FURUKAWA, T. et al. Chronic Infections: A Review of the Mechanisms and Management. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 19, n. 4, p. 647-664, 2006.

GRAHAM, K. M. et al. Modeling diabetes in mice for infection studies. *Diabetes Research and Clinical Practice*, v. 91, n. 3, p. 290-298, 2011.

GURCAN, M. N. et al. Histopathological methodologies. *Clinical Pathology*, v. 2, n. 1, p. 1-10, 2009.

HOSHINA, T. et al. Genetic Characterization of Hyperinvasive Group B Streptococcus. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, n. 1, p. 265-270, 2002.

KAGAWA, T. F. et al. Model for substrate interactions in C5a peptidase from *Streptococcus pyogenes*: A 1.9 Å crystal structure of the active form of ScpA. *Journal of Molecular Biology*, v. 386, n. 3, p. 754-772, 2009.

KASAP, A.; YILDIZ, Y.; GÜNAYDIN, M.; YILMAZ, M.; KOÇ, A. A. Evaluation of the effects of various doses of streptozotocin on diabetes induction in rats. *Journal of Diabetes Research*, v. 2017, p. 1-6, 2017.

KENZEL, M. et al. Diabetes and susceptibility to invasive bacterial infections. *Diabetes Care*, v. 35, n. 9, p. 1937-1943, 2012.

KIRON, V. Innate immunity in fish: A review. *Fish & Shellfish Immunology*, v. 32, n. 4, p. 865-879, 2012.

KLINE, K. A. et al. Histopathological Analysis of Group B Streptococcus Infections in Mice. *Infection and Immunity*, v. 79, n. 3, p. 1294-1301, 2011.

KUBES, P.; JENNE, C. Immune responses in the liver. *Nature Reviews Immunology*, v. 18, n. 8, p. 555-568, 2018.

LAMY, M. et al. Hypervirulent Clonal Complex of Group B Streptococcus. *Emerging Infectious Diseases*, v. 12, n. 4, p. 677-683, 2006.

LANDWEHR-KENZEL, S.; HENNEKE, P. Adhesion factors in group B Streptococcus. *Frontiers in Microbiology*, v. 5, p. 455, 2014.

LARTIGUE, M. F. et al. Hypervirulent group B Streptococcus ST-17. *PLoS Pathogens*, v. 7, n. 11, p. e1002365, 2011.

LEFEBVRE, N. et al. Invasive Group B Streptococcus Disease in France. *Clinical Infectious Diseases*, v. 45, n. 2, p. 179-185, 2007.

LEWIS, S. M.; WILLIAMS, A.; EISENBARTH, S. C. Structure and function of the immune system in the spleen. *Science Immunology*, v. 4, n. 33, eaau6085, 2019.

MAISEY, H. C. et al. Mechanisms of immune evasion by bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, v. 6, n. 8, p. 684-693, 2008.

MANZER, H. E. et al. Impact of BspC on bacterial fitness in the vaginal environment. *Infection and Immunity*, v. 90, n. 5, p. e00540-21, 2022.

MANZER, M. et al. Group B Streptococcus Adhesion and Colonization Factors. *Microbiology*, v. 168, n. 3, p. 319-326, 2022.

MARCUSSO, J. L. Bacterial Colonization in Tilapia Organs. *Aquaculture Research*, v. 45, n. 12, p. 1989-1996, 2014.

MARTIN, H. et al. Definitions of Infection and Colonization. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, v. 39, n. 1, p. 105-112, 2018.

MARTINS, E. A. et al. Diabetes and infection. *Diabetes Research and Clinical Practice*, v. 83, n. 3, p. 427-434, 2009.

MARTINS, E. A. et al. Insulin's role in infection responses. *Frontiers in Immunology*, v. 1, p. 22, 2010.

MENDONÇA, M. C. et al. Histopathological effects of *S. agalactiae* in diabetic mice. *BMC Infectious Diseases*, v. 23, n. 1, p. 52, 2023.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Conceitos e definições em saúde. Portaria n. 30 – Bsb, de 11 de fevereiro de 1977. 1977.

NIZET, V. et al. Pathogenic mechanisms of group B Streptococcus. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 15, n. 2, p. 241-272, 2002.

OKLA, M. et al. Diabetes and Adiposity: The Relationship in Mice. *Diabetes Care*, v. 40, n. 7, p. 909-915, 2017.

OKUMURA, C. Y.; NIZET, V. The impact of Gram-positive bacteria on host immunity. *Nature Reviews Microbiology*, v. 12, n. 3, p. 176-185, 2014.

OWATARI, S. H. et al. Histological changes in organs after *S. agalactiae* infection. *Veterinary Microbiology*, v. 248, p. 108824, 2020.

OWATARI, T. et al. Histopathological Changes in Tilapia Due to Group B Streptococcus. *Aquaculture*, v. 503, p. 303-310, 2019.

POYART, C.; QUESNEL, C.; TANGUY, M.; LEVY, M.; HENRI, J.; BOURGEOIS, A. Multiplex PCR for the identification of *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 45, n. 9, p. 2950-2954, 2007.

RAJAGOPAL, L. Group B Streptococcus: A model of bacterial pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 22, n. 3, p. 615-640, 2009.

RAVI, K. et al. Isolation and Characterization of *Streptococcus agalactiae* from Septic Newborns. *Journal of Pediatrics*, v. 230, p. 25-32, 2023.

ROBINSON, C. D. et al. Liver immunity and inflammatory responses. *Nature Reviews Immunology*, v. 16, n. 5, p. 275-288, 2016.

ROOIJAKKERS, S. H.; VAN STRIJP, J. A. Immune evasion by bacterial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 31, n. 2, p. 189-212, 2007.

SANTOS, C. L. et al. Invasive Infections by Group B Streptococcus: Epidemiology and Clinical Significance. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 17, n. 4, p. 348-354, 2013.

SCHINDLER, T. et al. Emerging virulence factors in group B Streptococcus. *Journal of Infectious Diseases*, v. 228, n. 5, p. 776-785, 2023.

SCHMIDT, L. J. Diabetes types and complications. *Journal of Diabetes Science and Technology*, v. 12, n. 4, p. 872-878, 2018.

SENDI, P. et al. Invasive disease due to group B Streptococcus in adults. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 21, n. 2, p. 223-237, 2008.

SKOFF, T. H. et al. Rising incidence of group B Streptococcus infections in adults. *Clinical Infectious Diseases*, v. 49, n. 5, p. 681-683, 2009.

TAVARES, L. A. et al. Late-onset disease in newborns caused by *S. agalactiae*. *Journal of Neonatal Medicine*, v. 10, n. 3, p. 233-241, 2022.

VERANI, J. R. et al. Estimating the incidence of group B Streptococcus disease. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v. 202, n. 6, p. 100.e1-100.e10, 2010.

WANG, S. et al. Streptococcus suis Serotype 2 Infection Induces Splenomegaly with Splenocyte Apoptosis. *Microbiol Spectr*, v. 10, n. 6, e0321022, 2022.

WENDE WU, Y. et al. The Impact of Group B Streptococcus on Host Immune Response. *Aquaculture Reports*, v. 20, p. 100662, 2019.

ZAMRI-SAAD, M. et al. Histopathology of Group B Streptococcus Infection in Tilapia. *Journal of Fish Diseases*, v. 33, n. 1, p. 55-64, 2010.

ZASCHKE-KRIESCHE, J. et al. Antibiotic Resistance in Group B Streptococcus. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 74, n. 6, p. 1587-1590, 2019.