

VICTOR LIMA DOS SANTOS

**COMPARAÇÃO DA VIRULÊNCIA ENTRE CLONES DE
Streptococcus dysgalactiae SUBESPÉCIE *equisimilis* CIRCULANTES NO
BRASIL USANDO UM MODELO EXPERIMENTAL DE *Caenorhabditis
elegans*.**



**Monografia apresentada ao Instituto de
Microbiologia Paulo de Góes, da
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
como pré-requisito para a obtenção do
grau de Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia.**

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
DEZEMBRO / 2017**

Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Médica, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação da Professora Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho.

CIP - Catalogação na Publicação

S194c Santos, Victor
COMPARAÇÃO DA VIRULÊNCIA ENTRE CLONES DE
Streptococcus dysgalactiae SUBESPÉCIE equisimilis
CIRCULANTES NO BRASIL USANDO UM MODELO EXPERIMENTAL
DE Caenorhabditis elegans. / Victor Santos. -- Rio
de Janeiro, 2017.
69 f.

Orientador: Bendadete Teixeira Ferreira Caravinho.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia, 2017.

1. Virulência. 2. C. elegans. 3. Streptococcus.
4. In vivo. 5. Clones. I. Ferreira Caravinho,
Bendadete Teixeira, orient. II. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

FOLHA DE APROVAÇÃO

VICTOR LIMA DOS SANTOS

COMPARAÇÃO DA VIRULÊNCIA ENTRE CLONES DE *Streptococcus dysgalactiae* SUBESPÉCIE *equisimilis* CIRCULANTES NO BRASIL USANDO UM MODELO EXPERIMENTAL DE *Caenorhabditis elegans*.

Rio de Janeiro, 06 de Dezembro de 2017.

(Prof. Tatiana de Castro Abreu Pinto, doutora, IMPG)

(Dra. Viviane Sant'Anna de Souza, doutora, IBCCF)

(Msc. Caroline Lopes Martini, doutoranda, IMPG)

(Prof. Sérgio Eduardo Longo Fracalanza, doutor, IMPG)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sua infinita bondade em me proporcionar mais essa conquista na minha vida.

Agradeço à minha família, em especial a minha mãe Luciana Andrade por todo o apoio e torcida durante essa caminhada, ao meu pai Marcos Carvalho por todo suporte que me deu para que eu pudesse continuar na faculdade. Agradeço às minhas tias por toda torcida, amor e confiança. Eu amo todos vocês.

Dedico essa conquista à minha avó Ana Maria, que embora não esteja presente, tinha o sonho de ver os netos bem encaminhados e sei que lá de cima sempre torceu por mim.

Aos melhores amigos que eu tive durante a graduação, Isabella Campelo, Larissa Oliveira, Juliana Carmo, Iva Paula, Fernanda Rei, Julia Ramos e o best friend Thiago Oliveira. Sem vocês a caminhada não seria fácil. Obrigado por todos os momentos de apoio, descidas do circular, discussões, sorrisos e não menos importante, as vergonhas que passamos e não deixaremos de passar. Somos um cachorro do outro e ninguém vai mudar isso. Agradeço também a Úrsula Lopez, Michel Leon, Roberto Guardatti e Déborah Caldeira e Anderson Madruga pela amizade e energias positivas.

À minha incrível orientadora prof^a Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho por ter me ensinado muito, por toda a dedicação, preocupação e amor como se eu fosse um filho. Agradeço pela confiança em me entregar um trabalho tão bonito, que me orgulho muito, e também pela liberdade e acessibilidade em criar junto comigo cada etapa deste trabalho. Espero poder corresponder à altura tudo que me foi passado. Obrigado por ser orientadora, amiga e uma mãezona. Te agradeço imensamente.

A todos os integrantes do super laboratório de Biologia Molecular de Bactérias, à prof^a Agnes Marie por todo o apoio, suporte e conhecimento transmitido ao longo do meu estágio, aos técnicos Marcos Correa, Cícera Carvalho, Raquel Neves e Marcia Guimarães, as “meninas de staphylo” Mariana Severo, Paula Terra, Marina Farrel, Ana Maria Botelho, Alzira Mesquita, Cris Beltrame, Deborah Nascimento e Alice Viana por todos os bons momentos e ensinamentos compartilhados. Agradeço aos “Streptos”, Ligia Guedes, Mariana Masello -nunca deixará de ser-, Bruno Scraminon, Carol Martini e, em especial, a Ísis Anjos por toda ajuda, principalmente na reta final. Vocês moram no meu coração. Agradeço também a Viviane Sant’anna (Lab. de Helmintos) por todo o amor, paciência e disponibilidade em me ensinar tudo que sei sobre *C. elegans*, muito obrigado por compartilhar comigo seu conhecimento.

Por fim, agradeço ao PIBIC-CNPq e a FAPERJ pela bolsa de iniciação científica e também a CAPES e a FAPERJ pelo apoio financeiro.

“Quem anda com Deus não fica parado, mas prossegue a cada dia em vitória!”

RESUMO

VICTOR LIMA DOS SANTOS

COMPARAÇÃO DA VIRULÊNCIA ENTRE CLONES DE *Streptococcus dysgalactiae* SUBESPÉCIE *equisimilis* CIRCULANTES NO BRASIL USANDO UM MODELO EXPERIMENTAL DE *Caenorhabditis elegans*.

Orientador: Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Os estreptococos do grupo C podem causar infecções em humanos e em outros animais. Dentro deste grupo, *Streptococcus dysgalactiae* subespécie *equisimilis* (SDSE) é a espécie mais frequentemente relacionada com infecções em humanos. Em um estudo anterior realizado em nosso laboratório, observou-se que de um total de 115 amostras de SDSE - analisadas por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) - 57,5% pertenciam ao clone A, 26,1% ao B e 16,4% a clones esporádicos (raros). As amostras pertencentes ao clone B foram isoladas de humanos e de equinos, e duas amostras de hospedeiros distintos apresentaram mesmo perfil de PFGE e mesmo ST (ST129) quando analisadas por MLST. Em nosso estudo, visando elucidar os fatores envolvidos no predomínio das amostras desses dois pulstipos, avaliamos o potencial de virulência de representantes destes clones em comparação com clones esporádicos, usando dois modelos de *Caenorhabditis elegans* baseados na sobrevivência de nematoides e no ensaio de escolha binária. Em adição, realizamos microscopia ótica para avaliar a morfologia dos nematoides expostos às cepas de SDSE e fizemos a quantificação dos microrganismos presentes no intestino dos nematoides. No ensaio de escolha binária - onde os vermes foram depositados entre representantes de dois clones distintos de SDSE, semeados equidistantes - os nematoides que foram confrontados frente às cepas de SDSE e a amostra controle, apresentaram índice de escolha (+1) favorável a cepa controle, mesmo quando não treinados. Já quando foram confrontados apenas com amostras de SDSE, os nematoides demonstraram uma maior preferência para amostras dos clones esporádicos. Quando a opção de escolha era o clone A e o B, o índice de escolha foi maior para o clone B, nos grupos não treinados, porém quando treinados essa preferência mudava para as amostras do clone A, com exceção de um dos grupos em que a preferência não foi alterada. No ensaio de virulência onde os nematoides foram expostos por 3 dias a uma das cepas de SDSE, a taxa de sobrevivência do verme foi de $4,44 \pm 1,27\%$ para o clone B, $10,11 \pm 2,24\%$ para o clone A e $21,50 \pm 3,30\%$ para os clones esporádicos ao fim do experimento ($p < 0,0001$). Comparando-se isolados do clone B de origem equina e humana, observou-se variação no perfil de virulência frente ao modelo de *C. elegans*, demonstrando maior virulência da amostra isolada de equino. Em conjunto, estes resultados indicam um maior potencial de virulência para as amostras de SDSE dos clones A e B em comparação com a de

clones esporádicos, sendo os representantes do clone B mais virulentos do que os do clone A no ensaio de sobrevivência. A microscopia revelou uma série de alterações morfológicas nos vermes, associadas aos diferentes clones, sendo a maior parte delas associadas aos clones prevalentes. A quantificação de bactérias intracelulares demonstrou um menor número de UFCs/nematoide para as cepas representantes dos clones mais virulentos. De fato, estes resultados são coerentes com uma maior detecção de genes associados à virulência entre cepas dos clones predominantes (A e B) sugerindo que estes evoluíram para maior virulência em comparação com os esporádicos. Finalmente, nossos resultados demonstram que os isolados de SDSE (clone B) oriundos de hospedeiros diferentes, e exibindo o mesmo padrão de PFGE e tipo ST129, podem apresentar variações no perfil de virulência em modelos de *C. elegans*.

Palavras-chave: *Caenorhabditis elegans*, *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, sobrevivência, virulência, clones.

ABSTRACT

VICTOR LIMA DOS SANTOS

COMPARAÇÃO DA VIRULÊNCIA ENTRE CLONES DE *Streptococcus dysgalactiae* SUBESPÉCIE *equisimilis* CIRCULANTES NO BRASIL USANDO UM MODELO EXPERIMENTAL DE *Caenorhabditis elegans*.

Orientador: Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Group C streptococci can cause infections in humans and other animals. Within this group, *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis* (SDSE) is the species most frequently related to infections in humans. In an earlier study conducted in our laboratory, it was observed that of a total of 115 strains of SDSE - analyzed by pulsed field gel electrophoresis - 57.5% belonged to clone A, 26.1% to B and 16.4 % to sporadic (rare) clones. Strains belonging to clone B were isolated from humans and horses, and two strains of distinct hosts showed the same PFGE and ST profile (ST129) when analyzed by MLST. In our study, in order to elucidate the factors involved in the predominance of the strains of these two pulsotypes, we evaluated the virulence potential of representatives of these clones in comparison to sporadic clones using two models of *Caenorhabditis elegans* based on nematode survival and in the binary choice assay. In addition, we performed optical microscopy to evaluate the morphology of the nematodes exposed to SDSE strains and quantified the microorganisms present in the intestines of the nematodes. In the binary choice assay - where the worms were deposited between representatives of two distinct SDSE clones, seeded equidistant - the nematodes that were confronted against the SDS strains and the control strain, presented a favorable choice index (+1) to the control strain, even when not trained. When compared with only SDSE strains, nematodes showed a higher preference for strains from sporadic clones. When the choice option was clone A and B, the choice index was higher for clone B in the untrained groups, but when trained this preference changed to clone A strains, with the exception of one of the groups in which the preference was not changed. In the virulence assay where nematodes were exposed for 3 days to one of the SDSE strains, the survival rate of the worm was $4.44 \pm 1.27\%$ for clone B, $10.11 \pm 2.24\%$ for the clone A and $21.50 \pm 3.30\%$ for the sporadic clones at the end of the experiment ($p < 0.0001$). Comparing isolates of clone B of equine and human origin, variation in the virulence profile was observed in the *C. elegans* model, demonstrating greater virulence of the isolated equine strain. Taken together, these results indicate a greater virulence potential for the SDSE strains

of A and B clone's compared to those of sporadic clones, with clone B representatives being somewhat more virulent than clone A in the survival assay. Microscopy revealed many morphological changes in worms, associated with different clones, most of them associated with prevalent clones. Quantification of intracellular bacteria demonstrated a lower number of CFUs / nematodes for the strains representative of the most virulent clones. In fact, these results are consistent with increased detection of virulence-associated genes between strains of the predominant clones (A and B) suggesting that they evolved to greater virulence compared to sporadic ones. Finally, our results demonstrate that SDSE (clone B) isolates from different hosts, exhibiting the same pattern of pulsed field and type ST 129, may show variations in the profile of virulence in *C. elegans* models.

Key-words: *Caenorhabditis elegans*, *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, survival, virulence, clones.

ÍNDICE

RESUMO	v
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 <i>Streptococcus</i> spp.....	1
1.2 Estreptococos do grupo C de Lancefield	2
1.3 <i>Streptococcus dysgalactiae</i> subespécie <i>equisimilis</i> (SDSE).....	3
1.4 Fatores de virulência	5
1.5 Diversidade clonal em <i>Streptococcus dysgalactiae</i> subespécie <i>equisimilis</i>	8
1.6 Modelos <i>in vivo</i> para estudo de virulência bacteriana	9
1.7 <i>Caenorhabditis elegans</i>	10
1.7.1 Uso de <i>Caenorhabditis elegans</i> como modelo de estudo.....	13
2. JUSTIFICATIVA.....	17
3. OBJETIVOS	19
4. MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1 Lista de meios e soluções	20
4.2 Amostras bacterianas de SDSE.....	21
4.3 <i>Caenorhabditis elegans</i>	22
4.3.1 Cultivo e manutenção de <i>Caenorhabditis elegans</i>	22
4.3.2 Obtenção de <i>C. elegans</i> em estágio de desenvolvimento L4.....	22
4.4 Ensaio de sobrevivência	23
4.4.1 Teste de sobrevivência	23
4.5 Microscopia ótica de Contraste de Interferência Diferencial (CID) do <i>C. elegans</i> mantido na presença de SDSE.....	24
4.6 Quantificação de SDSE dentro do intestino dos <i>C. elegans</i>	24
4.7 Teste da escolha binária.....	25
5. RESULTADOS.....	27
5.1 Teste de sobrevivência em meio sólido.....	27
5.1.1 Teste de sobrevivência em meio sólido suplemento ou não com sangue.....	27
5.2 Microscopia ótica com Contraste de Interferência Diferencial (CID)	35
5.3 Ensaio de escolha binária.....	40
5.4 Quantificação de SDSE no intestino do <i>C. elegans</i>	43

6.	DISCUSSÃO	45
7.	CONCLUSÃO	51
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Streptococcus* spp.

Streptococcus compreende um gênero de cocos gram-positivos sendo vistos ao microscópio óptico com uma morfologia de cocos aos pares ou em curtas cadeias quando o crescimento bacteriano é oriundo de meio de cultura sólido, e em longas cadeias quando proveniente de meio líquido. O tamanho dos cocos varia de 0,75 a 1,25 μm de diâmetro, não são formadores de esporos, são imóveis e a maioria das espécies é anaeróbia facultativa. São microrganismos que apresentam uma complexa exigência nutricional e necessitam de meios enriquecidos com sangue ou soro (Murray, 2014).

O gênero *Streptococcus* pertence à família *Streptococcaceae* e nele estão classificadas 122 espécies e 23 subespécies (LPSN, 2017). Tais espécies podem ser encontradas compondo a microbiota anfiobiótica ou causando uma variedade de doenças em humanos e em outros animais.

Existe uma complexidade na classificação dessas espécies dentro do gênero, onde diferentes testes são empregados de forma complementar ao outro na tentativa de diferenciar essas espécies. Uma das técnicas, proposta por Shottmuller, em 1903, baseia-se na diferenciação das espécies de acordo com a hemólise observada em ágar suplementado com 5% de sangue defibrinado de carneiro, sendo chamados de beta-hemolíticos os que causam hemólise total, alfa-hemolíticos os que apresentam hemólise parcial, ou ainda, gama- ou não hemolíticos os que não promovem hemólise (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2014). Rebeca Lancefield, em 1933, agrupou os estreptococos beta-hemolíticos, em função de um antígeno específico presente em sua parede celular. Este antígeno, o carboidrato C, é um polissacarídeo que permitiu a classificação destes estreptococos em grupos sorológicos, compreendidos de A-H e K-V. Os grupos D e N são classificados de acordo com o ácido teicóico, e o grupo H, tem sua classificação com base no ácido lipoteicóico.

A grupagem proposta por Rebeca Lancefield não englobava todas as espécies, e alguns anos depois Sherman propôs uma classificação baseada na sorogrupagem de Lancefield, hemólise e nas características fenotípicas muitas vezes avaliadas pelas propriedades bioquímicas (Sherman, 1937). Tal classificação incluía todas as espécies de estreptococos descritos na época. Ele dividiu os estreptococos em quatro categorias, sendo

chamados de piogênicos ("formadores de pus") os beta-hemolíticos que apresentavam antígenos de Lancefield. Viridans foi o nome dado ao grupo de estreptococos geralmente alfa ou gama-hemolíticos, que não eram tolerantes a valores altos de pH nem a concentrações elevadas de NaCl e que também não cresciam a 10°C. Os outros dois grupos descritos foram o dos enterococos e dos lactococos (Sherman, 1937). Posteriormente os dois últimos grupos foram reclassificados nos gêneros *Lactococcus* (Schleifer *et al.*, 1986) e *Enterococcus* (Schleifer & Kilpper-Blaz, 1984).

1.2 Estreptococos do grupo C de Lancefield

Estreptococos pertencentes ao grupo C (EGC), segundo a classificação proposta por Rebeca Lancefield (1933), possuem o carboidrato C grupo-específico composto de uma cadeia central de ramnose à qual estão ligados resíduos de N-acetilgalactosamina (Fung, Wichier e McCarty, 1982).

EGC podem ser diferenciados em espécies com base nos fenótipos apresentados em testes bioquímicos como o da produção de ácido a partir de trealose, sorbitol e ribose; o teste de Voges-Proskauer, para a detecção de acetoína; a hidrólise de hipurato de sódio; detecção de pirolidonilarilamidase (PYR); hidrólise da esculina na presença de bile; hidrólise do amido em carboidratos menores; detecção de fator CAMP; o teste de susceptibilidade a bacitracina; a hemólise em placa de ágar sangue; dentre outros (Facklam, 2002).

Com o passar do tempo ocorreram diversas mudanças na classificação taxonômica do EGC e, atualmente, o grupo compreende as espécies: *Streptococcus dysgalactiae*, com duas subespécies, *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* e *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*; *Streptococcus equi* onde são encontradas três subespécies: *Streptococcus equi* subsp. *equi*, *Streptococcus equi* subsp. *zoepidemicus* e *Streptococcus equi* subsp. *ruminatorum*; *Streptococcus anginosus* (*Streptococcus anginosus*, *Streptococcus constellatus* subsp. *constellatus*, *Streptococcus constellatus* subsp. *pharyngis* e *Streptococcus intermedius*); *Streptococcus uberis*; *Streptococcus phocae*; *Streptococcus marimammalium* e *Streptococcus parasanguinis* (Facklam, 2002; Köhler, 2007).

Os EGC foram inicialmente associados apenas a infecções em animais, embora pudessem ser encontrados como microbiota humana (Köhler, 2007). *Streptococcus equi*

subespécie *equi* é comumente encontrado causando uma doença infecciosa denominada adenite equina ou garrotilho, mais frequentemente diagnosticada em cavalos, e que pode ser caracterizada por abscessos nos gânglios linfáticos da cabeça e pescoço. *Streptococcus equi* subespécie *zooepidemicus* pode ser responsável por septicemia, meningite, artrite purulenta, endocardite e mastite em uma ampla gama de espécies de mamíferos, incluindo cavalos, porcos, ovelhas, vacas e outras. Em seres humanos têm sido associadas com infecções promovidas pelo contato íntimo com animais ou o consumo de produtos lácteos não pasteurizados (Harrington *et al.*, 2000; Waller, Paillot e Timoney, 2011; Acke *et al.*, 2015).

No final da década de 1970 e início dos anos 1980 os EGC juntamente com os estreptococos do grupo G (EGG) surgiram como importantes patógenos humanos (Gaunt e Seal, 1987; Efstratiou, 1997). Um estudo realizado por Turner e colaboradores, em 1997, encontrou evidências epidemiológicas de estreptococos beta-hemolíticos do grupo C relacionados à faringite exsudativa em estudantes universitários nos EUA (Turner *et al.*, 1997). Já no ano de 2006, Mobin relatou um caso de faringite aguda grave por EGC (Mobin, 2006). Ao longo dos últimos anos o número de relatos de infecções graves e invasivas associadas aos EGC tem crescido (Pathak, Hurtado e Smina, 2012; Bastaki, 2015; Naik, Nadagir e Biradar, 2016). Estes ocorridos despertam uma nova visão sobre os estreptococos pertencentes a este grupo, que passam a ter uma maior relevância no contexto de importantes patógenos humanos.

Dentre as espécies de estreptococos pertencentes ao grupo C de Lancefield, *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (SDSE) é a de maior importância médica, por estar associada a diferentes casos de infecções em humanos, casos esses que têm aumentado consideravelmente ao longo dos últimos anos (Brandt e Spellerberg, 2010; Takashi, Ubukata e Watanabe, 2010; Watanabe *et al.*, 2016).

1.3 *Streptococcus dysgalactiae* subespécie *equisimilis* (SDSE)

O nome dado à espécie refere-se à perda ou comprometimento na secreção do leite (mastite bovina), que é uma característica vista em animais infectados por esse microrganismo. Já o nome dado à subespécie, tem relação com sua semelhança com o *Streptococcus equi* (LPSN, 2017). Inicialmente eram relatadas espécies de SDSE pertencentes apenas aos grupos C e G de Lancefield, porém, estudos posteriores, baseados em técnicas de

hibridização DNA-DNA e *multilocus enzyme electrophoresis* (MLEE), apresentaram raros relatos de SDSE classificados como pertencentes aos grupos L e A.

Inicialmente o SDSE era considerado como um microrganismo não patogênico ao homem, porém, ao longo dos últimos anos essa visão tem mudado. Atualmente sabe-se que tanto em humanos como em outros animais, o SDSE pode estar tanto colonizando, e, portanto fazendo parte da microbiota anfibiótica, como causando doença (Vieira, 1998; Köhler, 2007; Jourani *et al.*, 2017).

A literatura aponta o SDSE como causador de faringite, infecções de pele, pneumonia, peritonite, salpingite, bacteremia, endocardite, endoftalmite, artrite séptica, gangrena gasosa, meningite, sepse, síndrome do choque tóxico estreptocócico e sequelas pós-estreptocócicas, como glomerulonefrite pós-infecciosa e febre reumática (Brandt e Spellerberg, 2009; Traverso *et al.*, 2016; Watanabe *et al.*, 2017). Entre estes relatos, em 2015 foi descrito pela primeira vez, um caso de artrite bacteriana aguda da articulação glenoumeral, que é uma articulação sinovial presente no ombro, causada por SDSE (Handford e Kalogrianitis, 2015). No Japão, um quadro de endocardite acompanhada de aneurisma infectado associado à SDSE foi diagnosticado em um homem de 31 anos, sendo a primeira associação dessa espécie com uma complicação grave de endocardite, o aneurisma infectado (Watanabe *et al.*, 2017). No oeste da Noruega, foram relatados casos de infecções cutâneas necrotizantes diretamente associadas ao SDSE e também ao *Streptococcus pyogenes* (Bruun, 2013).

A semelhança de SDSE com *S. pyogenes* vai além do vasto quadro de infecções que as duas espécies compartilham. Esses microrganismos são filogeneticamente próximos e além de colonizarem os mesmos sítios no corpo humano, estudos genômicos mostraram uma homologia de 72% entre as duas espécies (Shimomura *et al.*, 2011). Em 2002, 24 amostras clínicas de SDSE obtidas de pacientes com otite média, lesões supurativas e choque séptico foram analisadas por Sasche e colaboradores, que detectaram em SDSE um superantígeno (SAg) similar à exotoxina pirogênica estreptocócica G (SpeG) de *S. pyogenes*, a qual foi chamada de SpeG^{dys} ou Spegg. A literatura também aponta fenômenos de transferência horizontal de genes e recombinação como atuantes na troca de genes entre o SDSE e *Streptococcus pyogenes*. Tais fenômenos podem desempenhar um papel significativo na diversidade genética do SDSE e de alguma forma dar origem a clones bacterianos mais adaptados e dominantes (McNeilly e McMilan, 2014; Watanabe *et al.*, 2016).

1.4 Fatores de virulência

Os fatores de virulência detectados nos SDSE têm uma grande semelhança com os encontrados em *S. pyogenes*, sustentando a relação direta entre essas duas espécies (Watanabe *et al.*, 2016). Os determinantes de virulência do SDSE podem ser divididos em quatro categorias: fatores de adesão às células hospedeiras; fatores utilizados para o escape do sistema imune; toxinas e proteases; e fatores que regulam a expressão desses produtos (Figura 1).

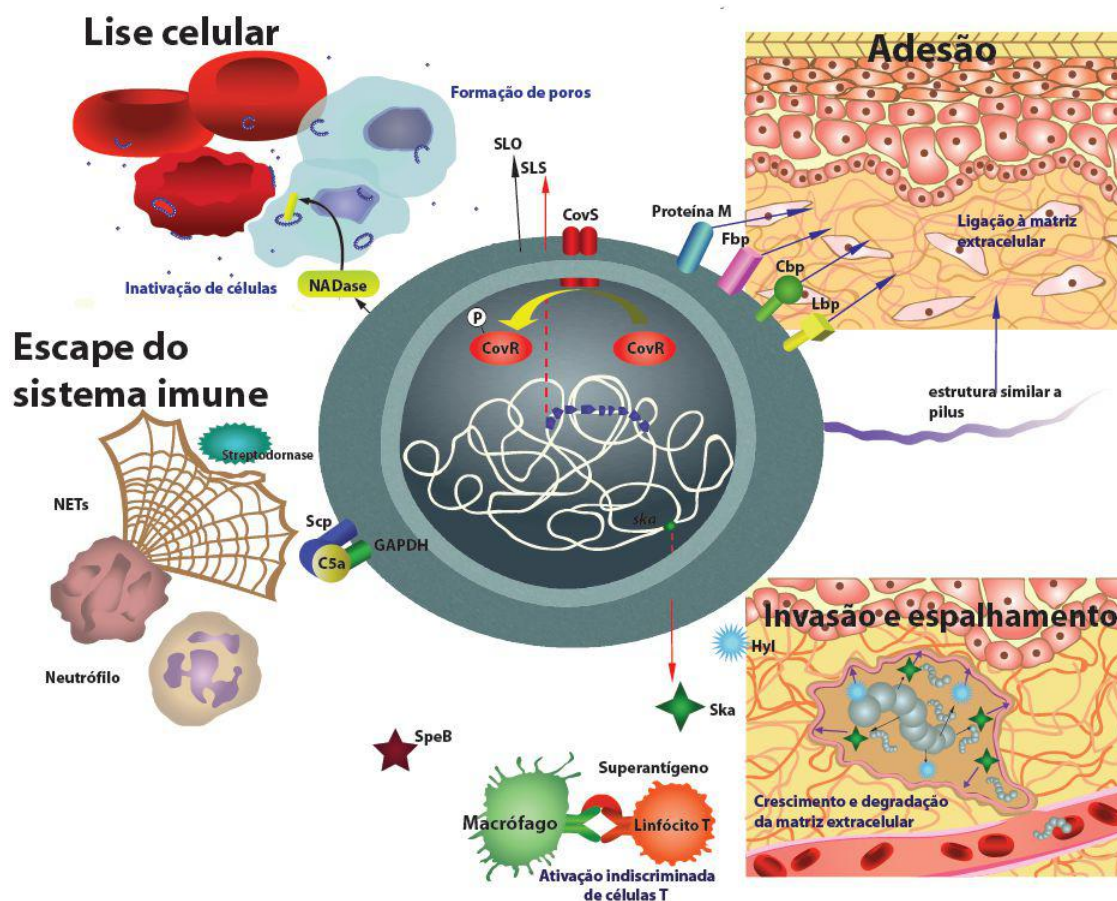


Figura 1 - Fatores de virulência putativos em SDSE e suas respectivas funções. Adaptado de Shimomura *et al.*, 2011 por Mariana Vinagre.

A proteína M está presente na superfície de *S. pyogenes* e também é constitutivamente encontrada em SDSE. Codificada pelo gene *emm*, este importante fator de virulência está envolvido na evasão do sistema imune do hospedeiro, conferindo resistência à fagocitose, e também atua como uma importante adesina. Além disso, atua também como um ligante para

diversas proteínas de matriz extracelular e proteínas associadas ao sistema imune, como fibronectina, fibrinogênio, albumina, colágeno, anticorpos e a proteína ligadora de C4b (McNeilly e McMilan, 2014). A proteína M possui regiões que se assemelham a epítomos presentes no tecido conjuntivo e músculo cardíaco do hospedeiro humano, sendo este o mecanismo pelo qual alguns autores acreditam ser possível o desenvolvimento de sequelas não supurativas associadas ao *S. pyogenes* e também ao SDSE: febre reumática e glomerulonefrite (Metzgar e Zampolli, 2011).

A porção N-terminal da proteína M pode induzir a produção de anticorpos protetores. Esta porção da proteína M possui uma alta variabilidade, resultando em sua variação antigênica. Sendo assim, a proteína M tem sido alvo para tipagem sorológica ou molecular, sendo a última baseada no sequenciamento da porção amino-terminal do gene *emm* (CDC Streptococcus Laboratory, acesso em 19/11/2017. <http://www2a.cdc.gov/ncidod/biotech/strepblast.asp>).

Além da proteína M, as proteínas ligadoras de fibronectina (Fbp), colágeno (Cbp), laminina (Lbp) e plasminogênio (GAPDH) também estão envolvidas com a adesão do SDSE a células hospedeiras (Creti *et al.*, 2007; Nobbs, Lamont e Jenkinson, 2009).

Alguns desses mecanismos de adesão auxiliam também na invasão, porém existem algumas moléculas que são especializadas neste segundo processo. Dentre estas temos as integrinas, que formam uma ampla família de glicoproteínas que regulam processos celulares como migração, proliferação e adesão às células do hospedeiro (Tarone *et al.*, 2000). Diferentes espécies de estreptococos utilizam essas glicoproteínas nos processos de adesão, colonização e invasão. Tais mecanismos são capazes de promover a internalização da bactéria por fagócitos não profissionais. Essa habilidade fornece à bactéria maiores chances de sobrevivência. Após a internalização, a bactéria pode ficar protegida contra as defesas do hospedeiro e de alguns antimicrobianos – o que explica, em parte, a recorrência de algumas infecções. A internalina é uma glicoproteína encontrada tanto em *S. pyogenes* quanto em SDSE e que apresenta homologia com a internalina observada em *Listeria monocytogenes* (Reid *et al.*, 2003; Shimomura *et al.*, 2011).

Os fatores de virulência de SDSE relacionados à evasão do sistema imune do hospedeiro são a estreptoquinase A, codificada pelo gene *ska* e que dissolve a fibrina humana, e C5a peptidase, codificada pelo gene *scpA* e que degrada o componente C5a do complemento e com isso inibe a migração de neutrófilos (Takahashi, Ubukata e Watanabe, 2011).

Tanto o *S. pyogenes* como o SDSE são capazes de produzir estreptodornase, que é uma enzima com o papel de quebrar a rede de DNA extracelular liberada por neutrófilos, as chamadas NETs, que capturam e subsequentemente destroem bactérias no local da infecção inicial. Essa enzima é codificada pelo gene *spd*, que em geral se localiza em profagos (Cole *et al.*, 2011). Outro fator considerado muito importante para evasão do sistema imune do hospedeiro é a produção de hialuronidase, através da qual o SDSE modula a expressão da cápsula de ácido hialurônico ao redor da célula do microrganismo, impedindo o seu reconhecimento pelo sistema imune e permitindo que o próprio SDSE utilize o ácido hialurônico como uma fonte de energia (Shimomura *et al.*, 2011).

Vários mecanismos colaboram para o espalhamento do SDSE no hospedeiro, principalmente a produção de toxinas e proteases, como a estreptolisina O (SLO), a NADase e a estreptolisina S. A SLO é responsável pela formação de poros na membrana do hospedeiro e necessária para o escape do para o citosol, permitindo a permanência na célula. NADase, age junto com a SLO e só começa a ser expressa após a entrada da SLO na célula hospedeira, e tem por função acelerar o processo de apoptose da mesma. Já a estreptolisina S (SagA), apontada como uma bacteriocina citolítica (Markley, Jensen e Lee, 2012), é responsável pela ampla β -hemólise observada em placas de AS e parece da mesma forma possuir um papel importante no desenvolvimento de infecções (Nobbs, Lamont e Jenkinson, 2009; Abdelsalam, Chen e Yoshida, 2010a).

Algumas cepas de SDSE expressam exotoxinas pirogênicas estreptocócicas (Spe), que desempenham um importante papel em infecções invasivas causadas por *S. pyogenes*. Algumas dessas toxinas pertencem a família dos superantígenos (SAGs), que se ligam à molécula de MHC de classe II e ao receptor da célula T (TCR) concomitantemente, sem prévio processamento na célula apresentadora de antígeno, estimulando assim a produção exacerbada de citocinas, que podem causar febre e choque tóxico (Anand *et al.*, 2012). Os superantígenos mais encontrados em cepas de SDSE são SpeA, SpeC, SmeZ, SpeF, SpeI, SpeM, SpeH, SpeG (Hashikawa, 2004; Anand, 2012; Behera, 2014). A cisteína protease SpeB é um importante fator de virulência, inicialmente descrita como um superantígeno, que atua degradando proteínas humanas que exercem um papel protetor na defesa do hospedeiro (Kapur *et al.*, 1993). Até o momento apenas um estudo afirma ter encontrado a toxina SpeB em SDSE (Behara *et al.*, 2014).

Junto à estreptolisina S, os superantígenos são considerados por alguns autores como os fatores de virulência que mais contribuem para o desenvolvimento de infecções estreptocócicas invasivas (Abdelsalam, Chen e Yoshida, 2010), e ambos podem ser encontrados em SDSE. Outros autores adicionam também a estreptoquinase A e a C5a peptidase, juntamente a estreptolisina S e os superantígenos, como importantes componentes associados às infecções invasivas por SDSE (Takahashi, Ubukata e Watanabe, 2011).

1.5 Diversidade clonal em *Streptococcus dysgalactiae* subespécie *equisimilis*

O estudo da diversidade clonal de diferentes bactérias patogênicas é uma ferramenta que resulta em informações importantes acerca da epidemiologia, ajudando a compreender o papel desses microrganismos no estabelecimento de infecções, o aparecimento de epidemias e os mecanismos evolutivos de uma determinada espécie. Para SDSE, as técnicas mais utilizadas para análise da diversidade clonal são a tipagem da proteína M, tipagem através do sequenciamento de múltiplos locus (MLST) e eletroforese em gel utilizando campos elétricos alternados (*pulsed-field gel electrophoresis* - PFGE), entre outras técnicas. Dentre as técnicas citadas, a de PFGE, que é capaz de separar grandes fragmentos de DNA cortados por endonucleases de restrição de cortes pouco frequentes no DNA que está sendo analisado, tem sido bastante utilizada para compreender a diversidade clonal dos SDSE (McMilian, 2010).

Em 2006, Pinho e colaboradores, analisaram 116 amostras de SDSE isoladas em Portugal, no período de 1998 a 2004, de processos invasivos e não invasivos pertencentes aos grupos C e G, utilizando a técnica de PFGE. O grupo identificou 14 perfis clonais distintos e mais da metade das amostras foram classificadas em apenas três desses clones. Nenhum desses genótipos foi originado de um surto. Os autores sugeriram que algumas características no genoma dessas amostras possibilitaram a predominância desses três perfis clonais (Pinho, 2006).

Em 2010, Sunaoshi e colaboradores, através da técnica de PFGE avaliaram a diversidade clonal de 145 cepas de SDSE coletadas de 11 instituições médicas no Japão, entre 2003 e 2005. Estes isolados foram obtidos de processos infecciosos invasivos e não invasivos, sendo 5 do grupo A (raramente encontrado), 18 do grupo C e 122 do grupo G de Lancefield. As cepas de SDSE do grupo C concentraram-se em apenas 4 genótipos distintos, demonstrando uma tendência dessa espécie em apresentar poucos genótipos no PFGE

(Sunaoshi, 2010). Em 2012, Yin e colaboradores analisaram 69 amostras de SDSE obtidas de infecções e de indivíduos saudáveis da China. Através desta análise, utilizando a técnica de PFGE, identificaram 10 genótipos distintos, porém 80% das amostras foram classificadas em apenas três desses genótipos (Yin, 2012).

Em um estudo anterior realizado em nosso laboratório de pesquisa foi analisada uma coleção de amostras de SDSE do grupo C provenientes de diferentes cidades do sudeste brasileiro, obtidas de colonização e de quadros clínicos, tanto de humanos como de outros animais. A análise, realizada através da técnica de PFGE, demonstrou que as 115 amostras isoladas entre 1979 e 2008 se alocaram em 15 perfis clonais distintos. No entanto, 83,5% das amostras foram grupadas em apenas dois clones, denominados: A (57,5%) e B (26,1%). As demais amostras (16,5%) ~~das~~ foram classificadas em 13 clones distintos, denominados como clones esporádicos (Silva *et al.*, 2015). Estes resultados foram enriquecedores para a literatura, uma vez que ampla diversidade genética é uma característica comumente atribuída aos *Streptococcus* spp (Bert *et al.*, 1997; McMillan *et al.*, 2010) e podem indicar uma persistência clonal de amostras que são mais adaptadas e mais virulentas para humanos e outros animais (Bert *et al.*, 1997; Corrêa, 2002; McMillan *et al.*, 2010).

1.6 Modelos *in vivo* para estudo de virulência bacteriana

A experimentação animal tem desempenhado um papel importante no avanço de pesquisas biomédicas. Dentre os modelos animais, os murinos tem sido os mais utilizados ao longo da história. Estima-se que os murinos (sobretudo ratos – *Rattus norvegicus* – e camundongos – *Mus musculus*) divergiram dos humanos há cerca de 96 milhões de anos atrás (Nei e Glazko, 2002). Assim, diversas características genéticas, biológicas e de comportamento em ambos os animais são bastante similares, tornando-os úteis para o estudo de doenças humanas (Spencer, 2002).

Modelos murinos e também de outros roedores como coelhos, hamsters e gerbis, são pequenos, exigem uma fácil manutenção e são capazes de se adaptar a novos ambientes. O ciclo de vida destes animais dura em torno de dois a três anos, e se reproduzem rapidamente. Esses animais podem ser adquiridos de produtores que os criam para fins de pesquisa. Além disso, a manipulação genética desses animais permite a compreensão de diversos processos, incluindo os de infecções bacterianas (Sun *et al.*, 2012; Mason *et al.*, 2013; Cusumano,

Watson e Caparon, 2014; Vandamme, 2014; Zeppa *et al.*, 2016). Embora seja um excelente modelo para o estudo de mecanismos de virulência bacteriana, a utilização desses animais em pesquisa de laboratório requer o seguimento de uma série de normas e padronizações que devem ser autorizadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais (Brasil, Lei número 11.794 de 8 de Outubro de 2008).

Visando facilitar e aperfeiçoar a pesquisa em laboratórios, novos organismos têm sido propostos para substituição completa de murinos em diferentes áreas da pesquisa. Para o estudo da virulência de microrganismos, alguns organismos têm sido introduzidos ao longo dos últimos anos, dentre eles *Galleria mellonella*, *Drosophila melanogaster*, *Zebrafish* e *Caenorhabditis elegans* (Mak, Zdybicka-Barabas e Cytryńska, 2010; Gupta, 2017).

Galleria mellonella é uma espécie de inseto da família Pyralidae e suas larvas têm sido utilizadas como modelo para estudo de virulência de diferentes microrganismos, tendo como vantagem a presença de mecanismos de imunidade inata semelhantes aos presentes em mamíferos (Mak, Zdybicka-Barabas e Cytryńska, 2010; Meijer e Spaink, 2011). Outro organismo bastante utilizado é a *Drosophila melanogaster*, que é um inseto da família Drosophilidae e possui diferentes barreiras contra infecções, incluindo a produção de peptídeos antimicrobianos, sendo também um inseto de fácil manutenção (Gupta, 2017). *Zebrafish* é um teleosteo da espécie *Danio rerio* e mede cerca de 3 a 4 cm. Sua introdução na literatura científica se deu pela fácil manutenção, alta taxa de reprodução, genoma com importantes homologies com mamíferos e a possibilidade de se estudar aspectos da imunidade inata, com embriões, e imunidade celular, usando peixes adultos (Meijer e Spaink, 2011). Por fim, o modelo de *Caenorhabditis elegans* tem sido amplamente utilizado para fins de pesquisa, por possuir inúmeras características que o tornam fácil para o estudo em diferentes áreas da biologia, como a biologia do desenvolvimento e a genética.

1.7 *Caenorhabditis elegans*

Nematoides são organismos invertebrados, com forma cilíndrica e alongada, pertencentes ao filo *Nematoda*. Alguns parasitam animais e plantas, porém a grande maioria pode ser caracterizado como vermes de vida livre, vivendo em ambientes marinhos e terrestres (Platt, 1994).

Caenorhabditis elegans é um nematoide da família *Rhabditidae*, que possui simetria bilateral e um corpo não segmentado que pode chegar a 1,5 mm na fase adulta. Foram descritos pela primeira vez em 1900 pelo zoólogo Emile Maupas, tendo sido isolado em solos da Argélia e denominados *Rhabditis elegans* (Maupas, 1900 *apud* Blaxter, 2011). Estudos filogenéticos posteriores renomearam a espécie, que passou a ser chamada de *Caenorhabditis elegans* ou apenas *C. elegans* (Osche, 1952 *apud* Mondal e Manna, 2013). O genoma do verme foi o primeiro entre os organismos multicelulares a ser sequenciado e observaram que este conserva homologia de 60% a 80% com genes de mamíferos (Consortium, 1998). Tal helminto é majoritariamente encontrado na forma hermafrodita (XX), na qual a autofertilização facilita a manutenção de mutações genéticas. A forma larval macho (XO) também é encontrada, porém, representa apenas 0,1% da população (Jorgensen e Mango, 2002).

Este pequeno verme tem vida livre e chega à fase adulta em três dias, quando cultivado a 20°C. Em seu curto ciclo de vida, o verme hermafrodita grávido expele os ovos, que após a eclosão, passam por quatro estágios larvais, denominados de L1, L2, L3 e L4, chegando então à fase adulta (Figura 2). Durante a transição entre a fase L1 e L2, o verme pode seguir para um estágio alternativo, chamado de *dauer*. Este fenótipo pode ser observado em situações adversas para o verme, como a ausência de alimento, e é caracterizado pelo acúmulo de gordura no endossoma citoplasmático. Sua formação é modulada pela sinalização através do receptor de insulina e fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) (Kimura *et al.*, 1997; Ogg *et al.*, 1997; Patterson *et al.*, 1997; Hu, 2007; Cunningham e Ashrafi, 2009).

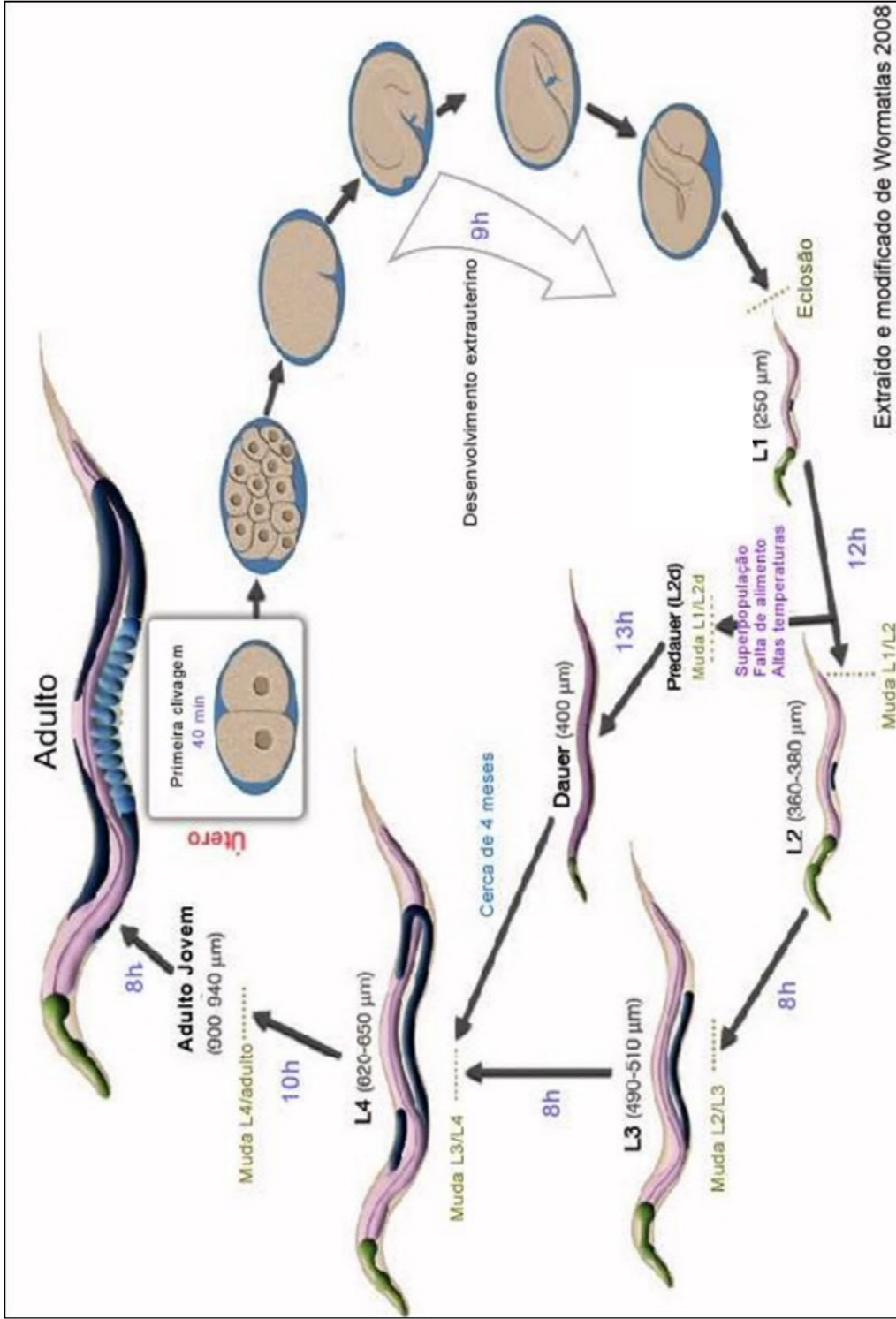


Figura 2 – Ciclo de vida do *Caenorhabditis elegans*. A fertilização é considerada como tempo 0. Os números em azul que acompanham as setas mostram o tempo que os animais passam em determinada fase. A primeira clivagem acontece cerca de 40 minutos após a fertilização. Os ovos são liberados, na fase de gastrula, cerca de 150 minutos após a fertilização. Ao lado do nome de cada fase, encontra-se o comprimento do animal em micrometros (μm). Adaptado de WormAtlas, por Sandra Grossi (2015).

Apesar de apresentar uma estrutura aparentemente simples, o *C. elegans* possui uma alta complexidade a nível celular e fisiológico (Figura 3). O interesse no modelo se deve ao fato de muitos dos processos fisiológicos básicos e também mecanismos de resposta ao estresse, visto em organismos superiores, serem facilmente detectáveis no nematoide (Kaletta e Hengartner, 2006).

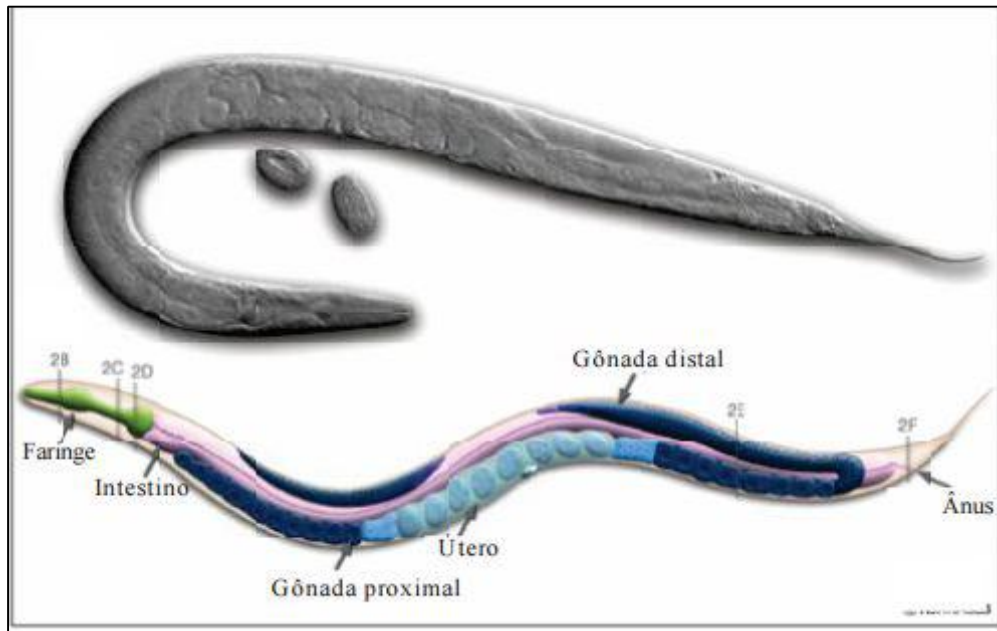


Figura 3 – Anatomia do *C. elegans* hermafrodita adulto. Adaptado de WormAtlas, por Sandra Grossi.

1.7.1 Uso de *Caenorhabditis elegans* como modelo de estudo

Em 1965, Sydney Brenner constatou que o avanço da biologia molecular necessitava da existência de modelos experimentais bem definidos e simples. Com base nessa constatação, Brenner sugeriu o *Caenorhabditis elegans*, um nematoide simples, como modelo para estudos na área da neurologia e da biologia do desenvolvimento. Desde que tal modelo foi introduzido, diferentes pesquisas foram realizadas com esse verme, tornando-o um modelo bem estabelecido, com diferentes metodologias e protocolos que são amplamente disseminados pelas diferentes áreas da pesquisa (Brenner, 1973; Gammon, 2017).

Este nematoide possui inúmeras vantagens para ser utilizado em estudos sobre patogenicidade bacteriana, pois sua biologia é bem entendida na sua complexidade, a manutenção e a manipulação são extremamente fáceis, tem baixo custo e um ciclo de vida

curto, chegando a fase adulta apenas três dias. Outro fator importante é a alta taxa de ovoposição (chegando a 300 ovos em três a cinco dias) obtendo-se assim, um grande número de indivíduos em um curto espaço de tempo (Hashmi *et al.*, 2006). A cepa comumente usada em laboratório é a linhagem N2, que pode ser mantida em placa contendo ágar NG e que utiliza preferencialmente a *Escherichia coli* OP50 como alimento.

C. elegans possui um sistema nervoso geneticamente muito bem definido, servindo como um excelente modelo para o estudo de vias básicas relacionadas a doenças neurológicas humanas complexas, como Parkinson e Alzheimer (Calahorro e Ruiz-Rubio, 2011). Trabalhos conduzidos em 2017 utilizaram *C. elegans* como modelo para estudo de espécies reativas de oxigênio (ROS), que desempenham papéis importantes na sinalização celular humana, cujos mecanismos ainda não estão bem elucidados (Miranda-Vizuet e Veal, 2017). O vasto conhecimento sobre a fisiologia desse verme permitiu o seu uso como modelo *in vivo* para rastreamento e triagem de novos antimicrobianos, em função do conhecimento de sua interação com diferentes patógenos (Ausubel *et al.*, 2006). Além disso, o próprio microrganismo é fonte de moléculas que são produtos de excreção e secreção com potencial antimicrobiano, agindo sobre proteínas responsáveis pela invasão bacteriana, demonstrando assim a sua capacidade de responder a patógenos que podem ser comuns aos humanos (Kong *et al.*, 2016).

Segundo o capítulo de interações com microrganismos patogênicos, escrito por Darby em 2005 para o Wormbook, 28 microrganismos, dentre eles várias bactérias e dois fungos, fazem parte da lista cuja interação com *C. elegans* foi testada. Alegado e colaboradores sumarizaram cerca de 20 patógenos humanos, entre eles estreptococos, que faziam parte dessa lista, e descreveram o que se conhecia sobre os mecanismos pelo quais estes causavam dano ou morte ao *C. elegans* (Darby, 2005).

Os efeitos das bactérias no verme podem ser definidos em duas categorias. Na primeira, o nematoide se infecta ao alimentar-se de determinado microrganismo, que passa a viver dentro do animal ou aderido na sua cutícula (composta de várias camadas de colágeno). Na segunda, os produtos bacterianos secretados, seriam os responsáveis pelo dano ou morte do verme, não havendo a necessidade do contato direto com o microrganismo. O fato é que esses efeitos não são independentes e um mesmo patógeno pode causar dano utilizando as duas vias (Darby, 2005).

O estudo da patogenicidade bacteriana usando o modelo de *C. elegans* tem se consolidado cada vez mais na literatura ao longo dos últimos anos. Em 2005, Begun e colaboradores testaram frente ao *C. elegans* diferentes cepas de *Staphylococcus aureus*, que é um importante patógeno humano (Begun *et al.*, 2005). Testes com diferentes cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, também têm sido realizados (Darby *et al.*, 1999; Mahajan-Miklos *et al.*, 1999; Tan *et al.*, 1999; Gallagher e Manoil, 2001; Kim *et al.*, 2002; Wareham *et al.*, 2005).

Em 2016, Mina e Marques avaliaram o potencial de virulência de células *persisters* de *S. aureus* no seu estado de persistência e após a reversão para seu estado de susceptibilidade. Este trabalho mostrou que houve uma diminuição na virulência das células em estado de persistência, quando comparadas a população total. Já após a reversão, as células foram capazes de iniciar uma infecção em *C. elegans*, porém com menor mortalidade quando comparada a população total (Mina e Marques, 2016). Um estudo conduzido por Thompson e Brown, em 2017, comparou o potencial de virulência de cepas de *S. aureus agr+* e *agr-*, atribuindo um maior potencial de virulência em *C. elegans* às cepas *agr+* (Thompson e Brown, 2017).

Sánchez-Diener e colaboradores avaliaram a interação entre perfis de resistência e predominância clonal de *Pseudomonas aeruginosa* utilizando *C. elegans* como modelo de infecção. Os resultados obtidos facilitaram o entendimento da virulência desse microrganismo em associação com o perfil de resistência e a sua caracterização como clone persistente em determinadas regiões do mundo (Sánchez-Diener *et al.*, 2017).

Estudos envolvendo a interação de mais de um microrganismo com o hospedeiro *C. elegans* também têm sido propostos. Em 2017, Ngba e colaboradores, observaram que a co-infecção de *Staphylococcus aureus* e *Helcococcus kunzii* em *C. elegans* reduzia significativamente a virulência de *S. aureus* sem modificar diretamente a resposta do hospedeiro, sugerindo então, um mecanismo de interação e balanço entre esses dois microrganismos, que podem ser encontrados juntos em feridas de pacientes diabéticos (Ngba *et al.*, 2017).

Dentre as espécies de estreptococos, as primeiras que tiveram sua patogenicidade avaliada em um modelo de *C. elegans* foram *S. pyogenes* e *Streptococcus pneumoniae* (Ewbank *et al.*, 2002). Posteriormente outros estreptococos foram avaliados, incluindo SDSE, *Streptococcus dysgalactiae subsp. dysgalactiae* (SDSD), *Streptococcus agalactiae*,

Streptococcus mitis e *Streptococcus oralis* (Jansen *et al.*, 2002; Bolm *et al.*, 2004). No entanto, nesses modelos apenas duas cepas de SDSE foram testadas, tendo sido sugerido um mecanismo de morte mediado pela liberação de peróxido de hidrogênio (Bolm *et al.*, 2004).

2. JUSTIFICATIVA

Em um estudo realizado anteriormente por nosso grupo observou-se através da técnica de PFGE, que num total de 115 amostras de SDSE de uma coleção isolada no Brasil, 83,5% foram alocadas em apenas dois clones designados como A e B. As demais amostras tiveram sua classificação distribuída em 13 clones esporádicos, designados de C a O (Silva *et al.*, 2015). As amostras foram isoladas de diversos materiais clínicos durante um período de tempo de 30 anos, compreendido entre 1979 e 2008.

O clone A foi o predominante, englobando 66 amostras (57,4%) isoladas de humanos (infecção e colonização). Já no genótipo B foram classificadas 30 amostras (26,1%), sendo 3 encontradas em quadros de infecção em equinos (83-060; 84-025; 84-030) e as demais isoladas de humanos (infecção e colonização). Através da análise do MLST a amostra de origem humana (81-681) e a de equino (84-030) foram alocadas no mesmo *sequence typing* (ST129) e pertenciam ao mesmo complexo clonal (CC31). Isso sugere que amostras deste clone estão bem adaptadas tanto em hospedeiros humanos quanto em equinos.

Tais dados demonstram a persistência de dois clones de SDSE (A e B) no Brasil e foram surpreendentes, visto que uma ampla diversidade genética tem sido atribuída aos *Streptococcus* spp., incluindo amostras de SDSE.

Estes achados nos levam a questionar se amostras classificadas nos clones A e/ou B seriam mais virulentas que as agrupadas nos clones esporádicos. Para responder esse questionamento alguns modelos *in vitro* foram utilizados com o intuito de comparar as amostras de SDSE classificadas nos clones A, B e esporádicos, objetivando entender os mecanismos evolutivos e de virulência desses clones. Nesses estudos foi avaliada a capacidade de adesão e invasão à cultura de células epiteliais brônquicas humanas, onde as amostras do clone A se mostraram superiores às demais tanto na capacidade de aderir como de invadir células epiteliais brônquicas humanas; as amostras do clone B foram superiores às dos clones esporádicos com relação a esses dois parâmetros. Já a pesquisa de genes codificantes para fatores associados à virulência, como o gene para a subunidade de pilus, *lmb*, *scpB* e *ska* observou uma menor detecção desses genes em amostras pertencentes aos clones esporádicos, sendo estes genes mais frequentes entre as amostras pertencentes aos clones A e B.

No entanto, os modelos *in vitro* necessitam ser confirmados por modelos *in vivo*, pois não conseguem reproduzir satisfatoriamente os processos que ocorrem durante o estabelecimento de uma infecção, onde vários fatores presentes tanto no hospedeiro quanto no microrganismo interagem para o estabelecimento ou não de um processo infeccioso. No entanto, apesar da indiscutível melhor compreensão da virulência de uma amostra bacteriana proporcionada por um modelo *in vivo*, sua utilização tem levantado ampla discussão ética na literatura. Desta forma pesquisas para o desenvolvimento de um modelo *in vivo* que possa substituir o uso de animais sencientes (como murinos e outros roedores), mas que seja de fácil manipulação e forneça resultados similares aos de uma infecção em humanos tem sido buscado. O modelo utilizando *Caenorhabditis elegans* surgiu, então, como uma possibilidade de se obter informações a respeito de virulência bacteriana que seriam muito mais difíceis de serem obtidas em modelos utilizando animais tradicionais e mais complexos.

Portanto, a comparação da virulência de representantes dos clones A, B e esporádicos frente a um modelo *in vivo*, de fácil manipulação como o *C. elegans* pode ser muito importante e ajudar a entender a melhor adaptação demonstrada pelos dois clones prevalentes de SDSE.

3. OBJETIVOS

Este trabalho tem como principal objetivo comparar o potencial de virulência entre os clones predominantes (A e B) e os clones esporádicos de *Streptococcus dysgalactiae* subespécie *equisimilis*, circulantes no Brasil, usando o modelo experimental de *Caenorhabditis elegans*, estabelecendo-o como um bom modelo *in vivo* para estudo de virulência em SDSE. Para tal, pretendemos:

- Estabelecer o *C. elegans* como modelo para estudo da patogênese de SDSE.
- Avaliar a taxa de sobrevivência do nematoide *Caenorhabditis elegans* frente a diferentes cepas representantes dos clones A, B e esporádicos de SDSE.
- Avaliar a capacidade do nematoide em distinguir, quimicamente, bactérias mais patogênicas, através de um ensaio de escolha binária.
- Realizar microscopias óticas para observar alterações estruturais nos nematoides expostos às amostras de SDSE dos diferentes clones estudados.
- Avaliar a presença de cepas dos diferentes clones de SDSE no interior do nematoide.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Lista de meios e soluções

Meio NG (*Nematode Growth Medium*): 2,5 g de peptona (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), 3 g de NaCl (Affymetrix, Ohio, EUA), 17 g de ágar (Difco, Sparks MD, EUA), 1 mL de colesterol 5 mg/mL (Sigma, St. Louis, MO, EUA), 1 mL de CaCl₂ 1M (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), 1 mL de MgSO₄ 1M (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), 25 mL do tampão 1M (108,3g de KH₂PO₄, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha; 35,6 g de K₂HPO₄, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), 972 mL de H₂O destilada para 1 L de meio de cultura (Stiernagle, 2006).

Todd-Hewitt Broth (THB): Bacto™ Todd-Hewitt Broth (Becton, Dickinson and Company; Sparks MD, EUA).

Meio Lúria-Bertani (LB): Difco, Sparks MD, EUA

Agar Sangue (AS): Base de ágar sangue (BBL; Becton, Dickinson & Co., Sparks, MD, EUA) acrescida de 5% de sangue desfibrinado de carneiro.

Meio S basal: 5,85 g de NaCl (Affymetrix, Ohio, EUA), 1 g de K₂HPO₄ (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), 6 g de KH₂PO₄ (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), 1 mL de colesterol 5 mg/mL em etanol (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e 1 L de H₂O estéril.

Tampão M9: 3 g de KH₂PO₄ (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), 6 g de Na₂HPO₄ (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), 5 g de NaCl (Affymetrix, Ohio, EUA), 1 mL de MgSO₄ 1M (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) em água destilada estéril q.s.p. 1 litro.

Tampão PRS: preparado com NaCl 0,14M (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha); K₂HPO₄ 5 mM (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha); KH₂PO₄ 1 mM (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha); glicose 0,5 mM (Sigma, St. Louis, MO, EUA); vermelho de fenol 0,46 mM (Sigma, St. Louis, MO, EUA) com pH final de 7,4 .

Tampão fosfato 10 mM pH 7,2: 8,36 g de NaH₂PO₄ (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) e 19,6 g de Na₂HPO₄ (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) acrescido de 150 mM de NaCl (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), 6 µL de peroxidase (15 nM; Sigma, St. Louis, MO, EUA), 50 µl do revelador OPD (12,56 mM; Sigma, St. Louis, MO, EUA).

4.2 Amostras bacterianas de SDSE

Neste estudo, foram utilizadas 11 amostras previamente identificadas como *Streptococcus dysgalactiae* subespécie *equisimilis* (SDSE) pertencentes à coleção do Laboratório de Biologia Molecular de Bactérias, onde se encontram estocadas a -80°C em caldo THB contendo 18% de glicerol. São amostras provenientes do Sudeste do Brasil, que fazem parte de uma coleção isolada de 1979 a 2008, a partir de diferentes materiais clínicos. As amostras foram escolhidas de acordo com os resultados obtidos anteriormente, em ensaios de adesão e invasão, realizados pelo nosso grupo de pesquisa. Foram previamente identificadas através da morfologia colonial, coloração de Gram, hemólise em ágar sangue, avaliação da produção de ácidos a partir de trealose, lactose e sorbitol, da produção de acetoina, hidrólise do hipurato de sódio, pesquisa do fator CAMP e teste de aglutinação com látex (*Streptococcal Grouping Kit*; Biomérieux, Lyon, Marcy-L'Étoile, France; Silva *et al.*, 2015).

Todas as amostras também foram previamente caracterizadas em relação à clonalidade pela técnica de PFGE (Silva *et al.*, 2015). Dentre as selecionadas, três pertencem ao clone A, cinco ao clone B e as outras três a clones esporádicos. Na Tabela 1 apresentamos dados das amostras que foram estudadas.

Tabela 1: Amostras de SDSE utilizadas neste estudo

Amostra	Ano de isolamento	Material Clínico	Perfil Clonal	Hospedeiro
87.99	1999	Swab de orofaringe	A ₁	Humano
88.096	1988	Swab de orofaringe	A ₃	Humano
88.467	1988	Swab de orofaringe	A ₄	Humano
85.101	1985	Swab de orofaringe	B ₁	Humano
85.238	1985	Swab de orofaringe	B ₁	Humano
84.030	1984	Secreção uterina	B ₂	Equino
81.681	1981	Swab de orofaringe	B ₂	Humano
81.724	1981	Swab de orofaringe	B ₂	Humano
36.01	2001	Secreção vaginal	F ₁	Humano
79.194	1979	Swab de orofaringe	H ₁	Humano
81.777	1981	Swab de orofaringe	I	Humano

4.3 *Caenorhabditis elegans*

4.3.1 Cultivo e manutenção de *Caenorhabditis elegans*

Nematoides *Caenorhabditis elegans* Bistol N2 foram mantidos e propagados a temperatura de 20°C sobre um tapete uniforme da cepa de *Escherichia coli* OP50 como fonte alimentar do verme. O tapete foi preparado semeando de maneira confluyente um crescimento bacteriano *overnight* da *E. coli* OP50 em meio LB caldo, em placas contendo o meio de crescimento para nematoides NG. A placa com o tapete de *E. coli* foi incubada por 30 minutos a 37°C (Stiernagle, 2006).

4.3.2 Obtenção de *C. elegans* em estágio de desenvolvimento L4

Para obtenção de larvas no estágio L4 (quarto estágio larval; estágio em que os nematoides estavam desenvolvidos e entrando na fase adulta), foi iniciada uma nova população de nematoides a partir de ovos, que passaram pelo processo de sincronização. Para esta etapa, vermes adultos e ovos, oriundos de uma placa de cultivo em meio NG por 3 dias, foram lavados com 4 mL de tampão M9, transferidos para um tubo cônico de 15 mL e imediatamente adicionados de 1 mL de uma solução contendo hipoclorito (1 mL de hipoclorito de sódio a 6% acrescido de NaOH 5N, Merck, Darmstadt, Alemanha). Este tubo foi agitado em um agitador tipo vórtex em intervalos de 30 segundos, até completar um tempo total de 5 minutos, não se excedendo esse tempo. Em seguida, o tubo foi centrifugado por 30 s a 1300 g. O sobrenadante, contendo a carcaça dos vermes, foi desprezado e o pellet lavado com tampão M9 para a retirada de resíduos da solução contendo hipoclorito. Este processo foi repetido por 3 vezes (Stiernagle, 2006). Os ovos contidos no *pellet* foram inoculados em uma nova placa de meio NG, contendo um tapete de *E.coli* OP50 recém-semeado, conforme descrito no tópico 4.3.1., e mantidos a uma temperatura de 20°C durante 3 dias, período necessário para que o verme atinja o estágio larval L4. Esse estágio foi confirmado visualmente, pela observação das larvas em um microscópio invertido.

4.4 Ensaios de sobrevivência

4.4.1 Teste de sobrevivência

Para o ensaio de sobrevivência uma alíquota de 20 µL do crescimento *overnight* de cada amostra de SDSE em meio THB foram semeados de maneira confluenta em diferentes poços de uma placa de 24 poços, contendo 500 µL (por poço) de Todd-Hewitt Broth adicionado de 2,5% de ágar (Bacto Agar: Difco, Sparks MD, EUA) e 5 µg/mL de ácido nalidíxico (Reagen, RJ, Brasil; para inibir a *E. coli* OP50), com ou sem 5% de sangue desfibrinado de carneiro. Após incubação por 4 horas a 37°C, a placa ficou 30 minutos a temperatura ambiente, antes de receber os vermes, uma vez que os *C. elegans* são sensíveis à temperatura (Sifri *et al.*, 2003, com adaptações).

Para o controle do experimento a cepa de *E. coli* OP50 foi cultivada em Lúria-Bertani ágar e posteriormente inoculada em 5 ml de caldo LB. Uma alíquota de 20 µL do crescimento *overnight* foi semeada nos poços controle, de maneira confluenta.

Cerca de 10 a 25 larvas em estágio L4 foram depositadas em cada poço da placa contendo o tapete das amostras de SDSE ou da amostra controle de *E. coli* OP50. Os poços da placa foram então observados ao microscópio invertido para contar o número de indivíduos presente. Quando o número de larvas era inferior a 10, mais indivíduos foram adicionados ao poço; porém se o número excedeu ao máximo padronizado (25), o poço foi descartado. Após o ajuste, o número inicial total de indivíduos por poço foi anotado no tempo 0 h. A placa foi incubada em uma estufa a 25°C por um período de três dias. O monitoramento da sobrevivência dos nematoides foi realizado a cada 24 horas, quantificando-se a viabilidade dos indivíduos, através da avaliação da motilidade, do batimento do bulbo e da sua estrutura no microscópio invertido ou no estereomicroscópio. Foi desprezada a progênie dos vermes (ovos liberado com posterior eclosão) ao longo do experimento.

Dois poços da placa não receberam nenhum crescimento bacteriano, apenas os vermes, servindo como controle negativo do experimento (Sifri *et al.*, 2003, com adaptações).

Cada amostra foi testada por no mínimo três experimentos independentes e os dados de sobrevivência foram analisados através do método de taxa de sobrevivência de nematoides Kaplan-Meier e sua significância determinada através do *log rank test*, utilizando o software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA) (Sifri *et al.*, 2003).

4.5 Microscopia ótica de Contraste de Interferência Diferencial (CID) do *C. elegans* mantido na presença de SDSE

Os vermes oriundos do experimento de sobrevivência tiveram suas imagens capturadas em um microscópio ótico de Contraste de Interferência Diferencial. Para tal, ao fim do experimento de sobrevivência (3º dia), cada um dos poços foi lavado com cerca de 1 mL de tampão M9 com auxílio de uma pipeta Pasteur descartável. O lavado de cada poço foi acondicionado em tubos tipo eppendorf de 1,5 mL, devidamente identificados e os helmintos foram fixados em formaldeído 4 %, glutaraldeído 2,5 % em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2. Em seguida, gotas do lavado foram transferidas para lâminas de vidro e cobertas com uma lamínula, para observação ao microscópio Olympus BX51 equipado com o sistema de CID. A aquisição das imagens foi realizada com a câmera Olympus DP12. Foram observados os seguintes parâmetros nos vermes em questão: alterações morfológicas; eclosão de ovos no interior do verme; presença de bolhas apoptóticas no interior do verme; SDSE presente dentro do nematoide.

4.6 Quantificação de SDSE dentro do intestino dos *C. elegans*

Para este propósito foi realizado um ensaio de sobrevivência do verme em meio sólido, conforme descrito no item 4.4, porém utilizando-se apenas 5 vermes em cada poço. A cada dia de leitura, um poço foi lavado com 1,5 mL de meio S suplementado com penicilina 100 UI/mL (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e gentamicina 100 µg/mL (Sigma, St. Louis, MO, EUA), sendo estes utilizados para eliminar as bactérias aderidas à cutícula do verme. Este volume foi incubado em um tubo tipo eppendorf de 1,5 mL por 2 horas a 37°C. Após esse período o tubo foi centrifugado e o sobrenadante retirado foi utilizado para quantificar o número de UFCs viáveis após o tratamento com o antibiótico. O pellet foi suspenso em 20 µL de tampão M9 adicionado de Triton 100x 1% (Sigma, St. Louis, MO, EUA). Os vermes presentes no tubo foram então macerados utilizando-se um bastão de vidro estéril, com superfície lisa. Imediatamente após esse procedimento, o volume final do macerado foi ajustado para 50 µL com tampão M9 adicionado de Triton 100x 1%. Volumes de 10 µL foram semeados diretamente em forma de spot, em uma placa de ágar sangue e outros 10 µL foram diluídos em salina por decimal seriada até 10⁻⁶. Essas diluições foram semeadas em placas de

ágar sangue adicionadas de 5 µg/mL de ácido nalidíxico, para a determinação do número de UFCs/nematoide (Garsin *et al.*, 2001, com adaptações).

Como controle, foi quantificado o número de UFCs/nematoide da cepa de *E. coli*. A mesma metodologia foi utilizada, substituindo apenas os antibióticos anteriormente usados para o ácido nalidíxico 5 µg/mL.

4.7 Teste da escolha binária

O *C. elegans* se alimenta da *E. coli* OP50, mas é suscetível à infecção por bactérias patogênicas em seu ambiente natural. O experimento de escolha binária visa avaliar a capacidade dos *C. elegans* em distinguir bactérias patogênicas, de acordo com sua preferência olfativa após a exposição inicial do nematoide a estes microrganismos. O *C. elegans* é capaz de evitar o odor da bactéria que ele considera mais patogênica e aumentar sua atração por odores de bactérias menos patogênicas (Zhang, Lu e Bargmann, 2005).

Para tal ensaio, 180 µL de uma cepa de SDSE, crescida *overnight* em caldo THB a 37°C, foram semeados de forma confluenta na metade da superfície de uma placa com meio THB adicionado de 2,5% de ágar. Em seguida, 180 µL de outra cepa de SDSE ou 80 µL da bactéria controle *E. coli* OP50, foram inoculados, confluentemente, na outra metade da placa (Figura 4). Cerca de 50 a 200 vermes devidamente sincronizados, em estágio L1, foram depositados no centro da placa. Estes foram submetidos a um treinamento durante um período de incubação de 4 h a 25°C. Após esse período, a placa de treinamento foi lavada, por decantação, com 5 mL de tampão M9 e as larvas recolhidas foram acondicionadas em um tubo cônico. O processo de decantação foi repetido por 3 vezes e o volume final do lavado foi ajustado para cerca de 30 µL. Com o auxílio de um microscópio o número de larvas contidas em um volume de 5 µL, previamente depositado em uma lâmina de vidro, foram contadas.

Uma nova placa, chamada de placa teste, foi preparada contendo as mesmas cepas bacterianas utilizadas no treinamento, semeadas em forma de spot com 25 µL da cultura (dois spots em direções opostas e equidistante ao centro da placa). Os inóculos foram previamente incubados *overnight* a 37°C em caldo THB. Após aplicação das amostras a placa ficou incubada por 4 h a 37°C. Em seguida um volume necessário (calculado após a estimativa do número de vermes em 5 µL) contendo cerca de 30 a 60 vermes foi retirado do tubo cônico onde as larvas estavam acondicionadas e semeado em spot no centro da placa teste, de forma equidistante aos spots bacterianos, conforme esquematizado na Figura 4. A placa foi incubada

a 25°C por um período de 4 horas. Ao término do experimento os vermes presentes em cada spot foram imobilizados pela adição de 1µL de azida sódica 10mM. Em seguida realizamos a leitura do total de vermes na placa e do total de vermes imobilizados em cada spot bacteriano (Zhang, Lu e Bargmann, 2005, com adaptações).

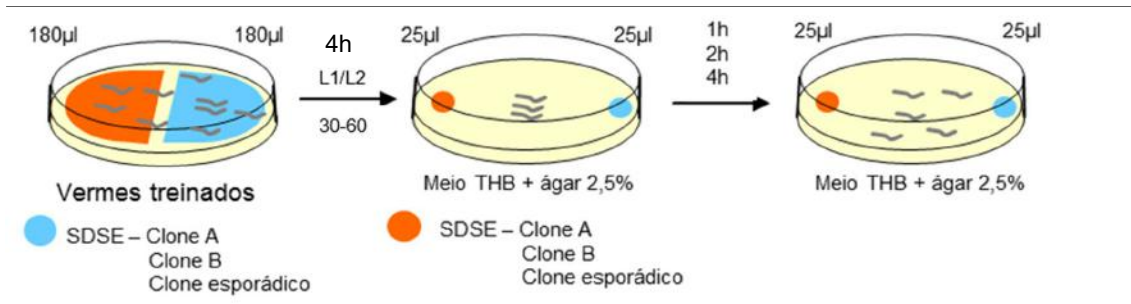


Figura 4 - Esquema do ensaio de escolha binária com vermes treinados, expostos a duas diferentes cepas de SDSE. Adaptado de Meisel e Kim (2014) por Victor Lima.

Como controle do experimento, vermes em estágio L1, provenientes de uma placa com meio NG coberta com um tapete de *E.coli* OP50, sem contato prévio com amostras de SDSE, foram devidamente lavados como descrito acima, e em seguida desafiados em uma placa teste, sob as mesmas condições citadas anteriormente (Figura 5).

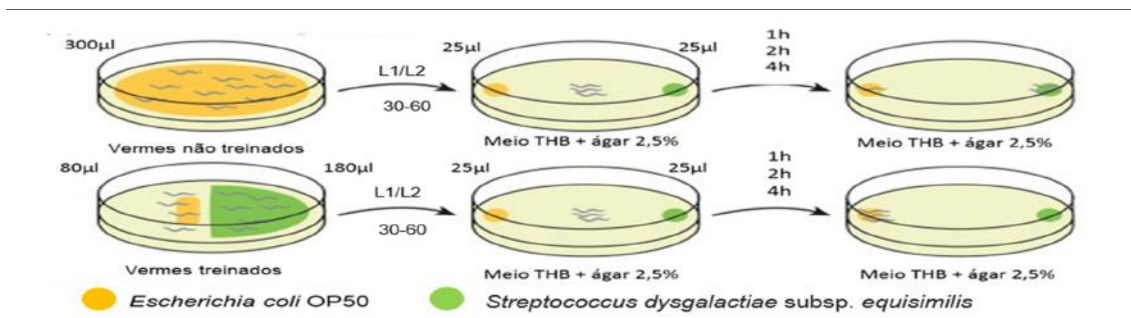


Figura 5 - Esquema de ensaio de escolha binária com vermes não treinados e vermes treinados, expostos a cepa controle de *E.coli* OP50 e a uma cepa de SDSE. Adaptado de Meisel e Kim (2014) por Victor Lima.

Os resultados obtidos no ensaio foram analisados pelo método de índice de escolha, que calcula o total de vermes no tapete de uma cepa (X), subtraído do total de vermes encontrados no tapete da outra cepa (Y) dividido pelo total de vermes contidos na placa teste. Um índice de escolha de -1 indica total preferência pela amostra X, um índice de 1 indica total preferência pela amostra Y e um índice de 0 indica uma distribuição igual entre as duas amostras. A média, desvio padrão (SD) e o erro padrão da média (SEM) dos índices de escolha de cada experimento foram calculados através do QuickCalcs, pelo site <http://graphpad.com/quickcalcs/CImean1/>

5. RESULTADOS

5.1 Teste de sobrevivência em meio sólido

5.1.1 Teste de sobrevivência em meio sólido suplemento ou não com sangue.

Inicialmente, a sobrevivência do *C. elegans* foi testada frente a três cepas bacterianas (Grupo3; Tabela 2) sobre meio de cultivo THB suplementado com 2,5% de ágar e 5 µg/mL de ácido nalidíxico, adicionado ou não de 5% de sangue desfibrinado de carneiro.

Tabela 2. Distribuição das amostras de SDSE em grupos distintos para o teste de sobrevivência de *C. elegans*.

	Clone A	Clone B	Clones esporádicos
Grupo 1	88-096	85-238	36/01(F)
Grupo 2	87/99	85-101	81-777(I)
Grupo 3	88-467	81-724	79-194(H)
Grupo 4		84-030 (Ba) 81-681 (Bh)	

Ba, SDSE do clone B; origem animal

Bh, SDSE do clone B; origem humana

Observamos que a presença de sangue no ágar pode alterar a mortalidade dos *C. elegans* frente ao SDSE, em especial para a amostra do clone esporádico ($p < 0,001$), onde uma menor mortalidade frente às bactérias mantidas em ágar acrescido de sangue foi observada (Figura 6). Frente a amostra 88-467 (clone A) observamos uma redução mais branda na mortalidade do nematoide em meio com sangue ($p = 0,0577$; Figura 6). Na amostra 81-724 (clone B) essa alteração na capacidade do *C. elegans* sobreviver em meio adicionado ou não de sangue não foi significativa. Assim, optamos por realizar os experimentos de sobrevivência do *C. elegans* na presença das demais amostras bacterianas em ágar THB sem acréscimo de sangue desfibrinado de carneiro.

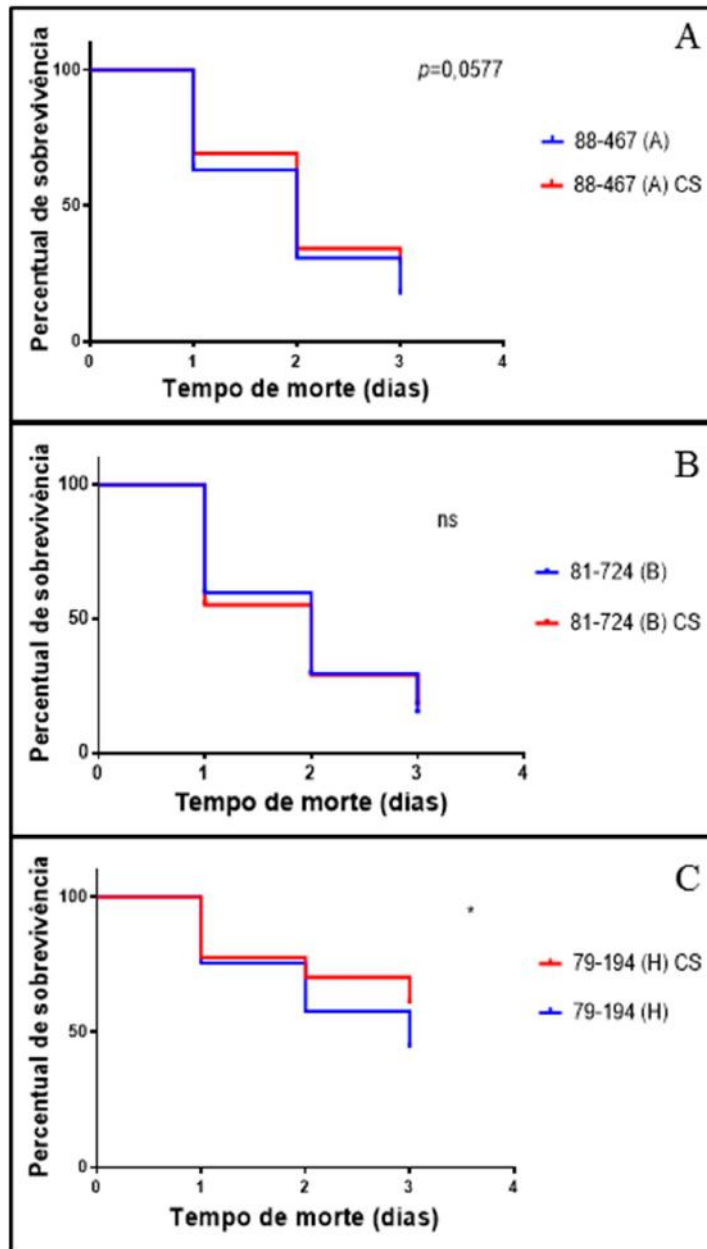


Figura 6. Curva de sobrevivência de *C. elegans* em meio com ou sem sangue. (A) Amostra 88-467, do clone A, em meio sem sangue e com sangue (CS); (B) Amostra 81-724, do clone B, em meio sem sangue e com sangue (CS); (C) Amostra 79-194, do clone H, em meio sem sangue e com sangue (CS). NS, não significante; *, $p < 0,01$.

Todas as amostras testadas foram capazes de promover a morte de *C. elegans*. A percentagem de indivíduos mortos foi sendo ampliada durante os 3 dias de contato, de modo que ao final do terceiro dia a grande maioria dos indivíduos estava morto. Para comparar a taxa de sobrevivência de *C. elegans* frente a amostras de SDSE pertencentes a diferentes

clones, as amostras foram divididas em grupos de três amostras, sendo uma representante do clone A, um do clone B e outra de um clone esporádico.

Ao fim do terceiro dia do experimento, no primeiro grupo de amostras testadas, não foi encontrada diferença estatística entre a taxa de sobrevivência dos nematoides expostos a amostras de SDSE dos clones prevalentes (A e B), embora nenhum indivíduo tenha sobrevivido frente à amostra representante do clone B (85-238; Figura 7; Tabela 3). No entanto diferença estatística significativa (**, $p < 0,01$) foi observada quando comparamos o percentual de sobrevivência dos nematoides expostos aos clones A (5% para 88-096) e F (8,64% para 36/01). Diferença ainda mais significativa (***, $p < 0,0001$) foi encontrada ao compararmos as amostras representantes dos clones B (0%) e F.

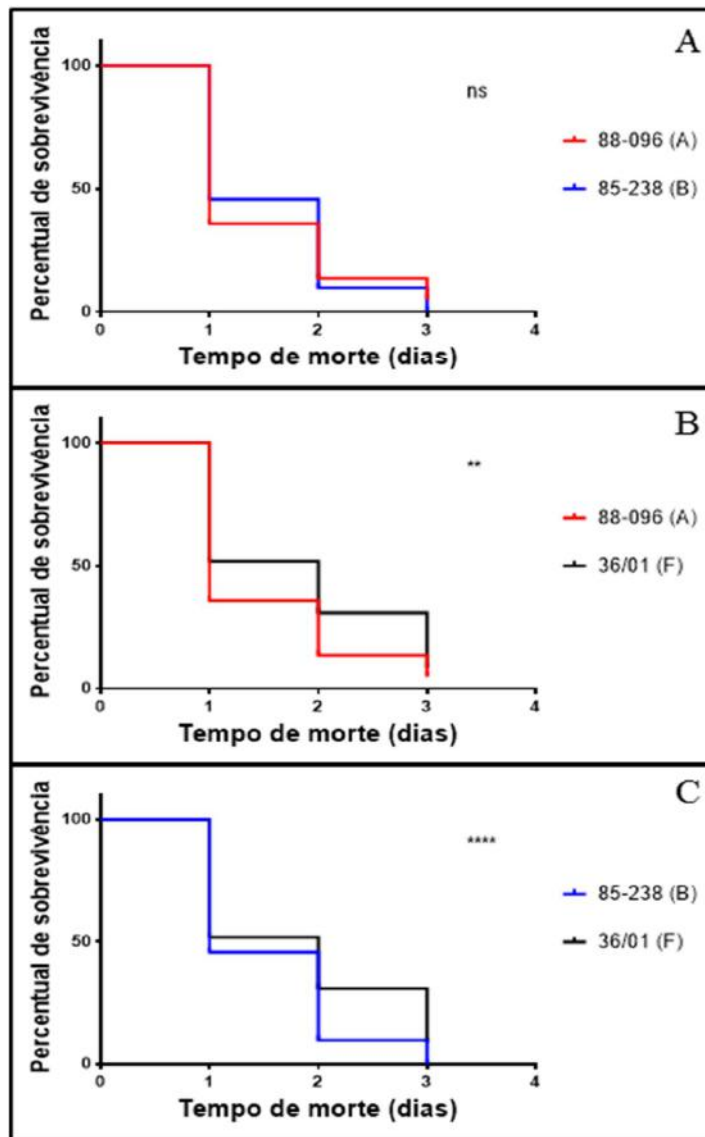


Figura 7. Curva de sobrevivência de *C. elegans* frente ao primeiro grupo de amostras de SDSE. (A), amostra 88-096 (clone A) e 85-238 (clone B); (B), amostra 88-096 (clone A) e 36/01 (clone F); (C), amostra 85-238 (clone B) e 36/01 (clone F). NS, não significante; **, $p < 0,01$; ****, $p < 0,0001$.

Ao fim do terceiro dia do experimento, no segundo grupo de amostras testadas, todas as comparações apresentaram uma diferença significativa. No entanto, a amostra representante do clone B (85-101; 5,36%) foi classificada como mais virulenta ao nematoide quando comparada com a representante do clone A (87/99; 9,54%; **, $p < 0,01$) e com a do clone esporádico I (81-777; 17,21%; ****, $p < 0,0001$). Já a amostra representante do clone A promoveu a segunda menor taxa de sobrevivência de *C. elegans*, apresentando uma diferença

significativa (***, $p < 0,001$) quando foi comparada ao clone esporádico I (81-777), que promoveu a maior taxa de sobrevivência do verme ao fim do experimento (Figura 8; Tabela 3).

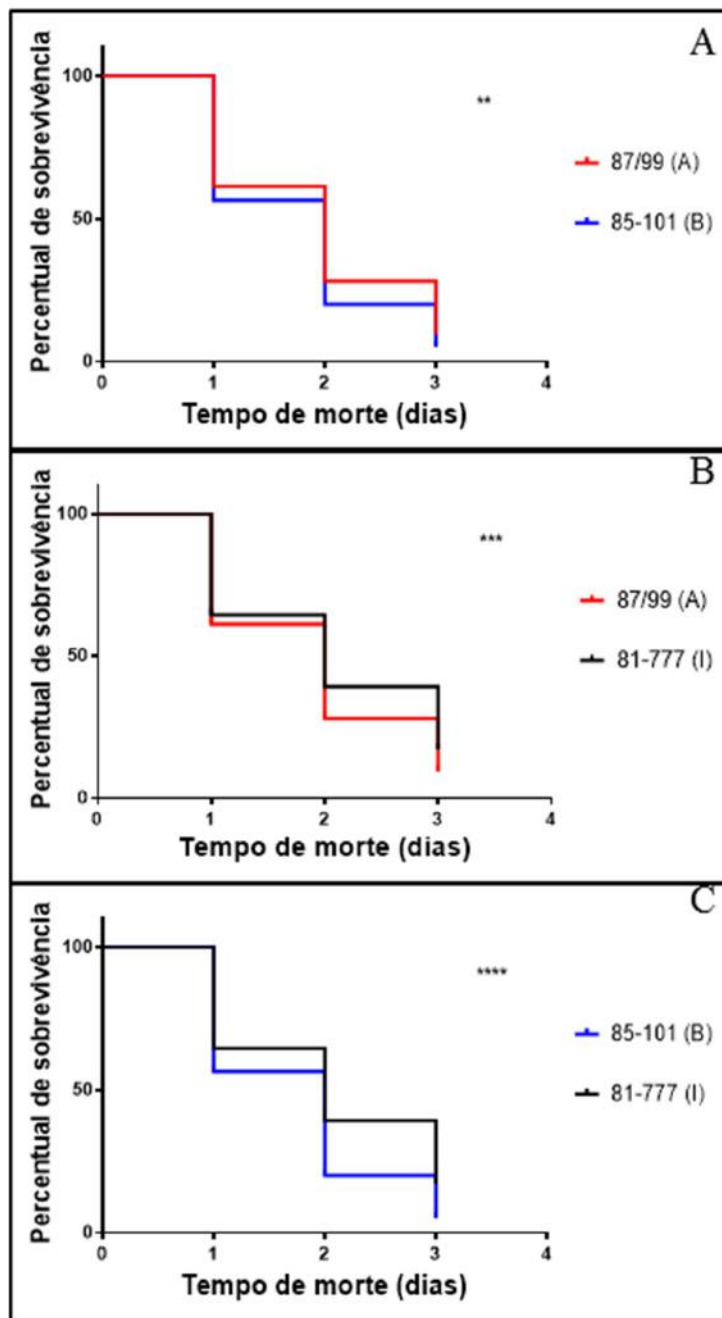


Figura 8. Curva de sobrevivência de *C. elegans* frente ao segundo grupo de amostras de SDSE. (A), amostra 87/99 (clone A) e 85-101 (clone B); (B), amostra 87/99 (clone A) e 81-777 (clone I); (C), amostra 85-101 (clone B) e 81-777 (clone I). **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$.

Na análise do terceiro grupo de amostras, novamente o teste estatístico demonstrou não haver diferença entre a virulência dos representantes dos dois clones predominantes entre si, embora a amostra do clone B tenha mostrado ser mais virulenta ao nematoide, com uma percentagem de sobrevivência de 14,77% (Figura 9, Tabela 3). Uma grande diferença significativa (****, $p < 0,0001$) foi observada quando a amostra do clone A (17,29%; 88-467) ou a do clone B (14,77%; 81-724) foram comparadas com a amostra pertencente ao clone H (79-194) (79-194). A amostra do clone esporádico demonstrou ser menos virulenta para o *C. elegans* ao apresentar uma maior taxa de sobrevivência de 44,14% ao final do experimento.

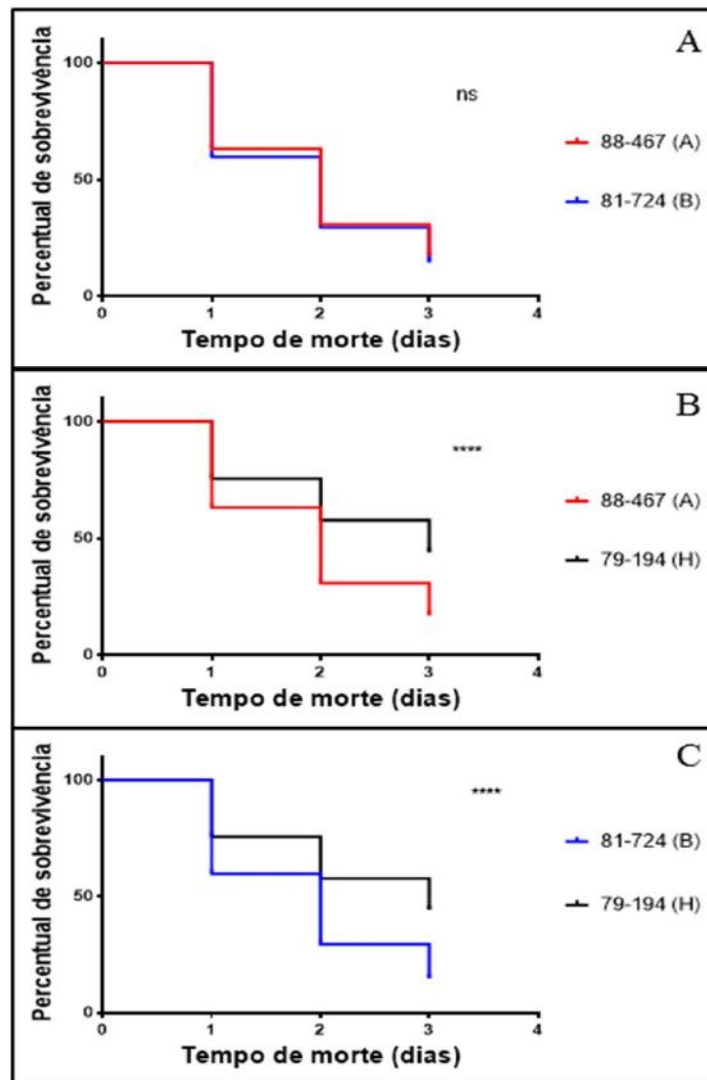


Figura 9. Curva de sobrevivência de *C. elegans* frente ao terceiro grupo de amostras de SDSE. (A), amostra 88-467 (clone A) e 81-724 (clone B); (B), amostra 88-467 (clone A) e 79-194 (clone H); (C), amostra 81-724 (clone B) e 79-194 (clone H). ns, não significante; **** $p < 0,0001$.

Todos os resultados obtidos para as 3 amostras representantes do mesmo clone (A ou B) ou as pertencentes a clones esporádicos foram agrupados de acordo com a classificação clonal da amostra, obtida pela técnica de PFGE (Silva *et al.*, 2015). Isto foi realizado com o intuito de avaliar estatisticamente o potencial de virulência dos clones predominantes em comparação com os clones menos frequentes (agrupados como clones esporádicos; Figura 10).

Demonstramos uma grande diferença estatística (****, $p < 0,0001$) que possibilitou diferenciar os clones de acordo com o seu potencial de virulência frente ao nematoide *C. elegans*. Os resultados obtidos demonstram um maior potencial de virulência das amostras do clone B (4,44%), seguido pelas do clone A (10,11%). Sem dúvida os *C. elegans* apresentaram um maior percentual de sobrevivência, ao terceiro dia do experimento, quando confrontados com representantes dos clones esporádicos (21,48%; Figura 10).

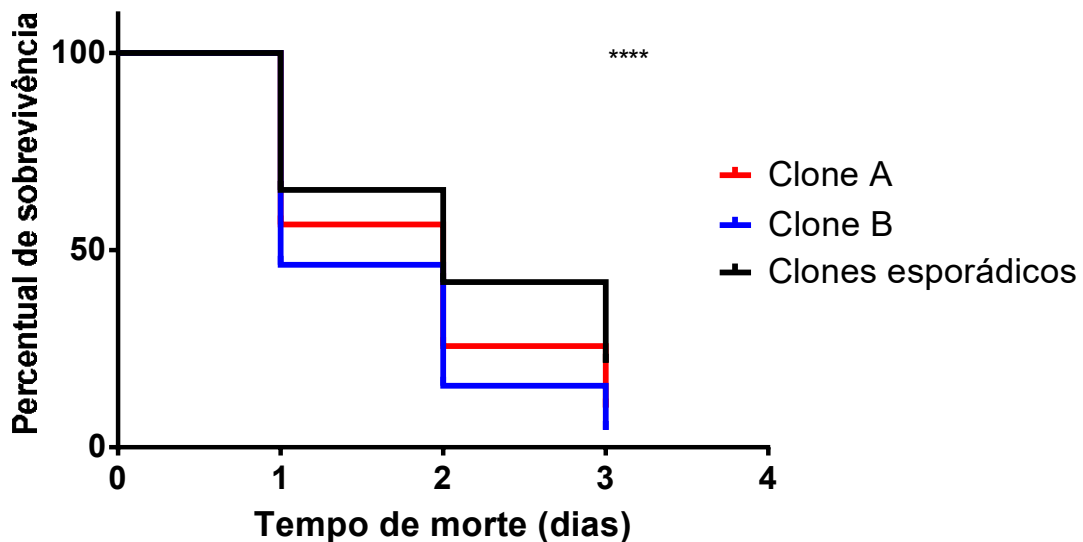


Figura 10. Comparação da taxa de sobrevivência do *C. elegans* frente a amostras de SDSE dos clones mais prevalentes (A e B) com representantes dos clones esporádicos. ****, $p < 0,0001$.

Tabela 3. Ensaios de *killing* de *C. elegans* na presença de amostras de SDSE.

Amostra (clone ^a)	% diária de sobrevivência de <i>C. elegans</i>		
	1 dia	2 dias	3 dias
87/99 (A)	61,33±4,6 ^b	28,16±4,2	9,54±2,8
88-096 (A)	35,71±7,8	13,57±5,6	5,00±3,6
88-467 (A)	63,16±8,1	30,83±7,7	17,29±6,3
88-467 (A), ágar com sangue	69,23±7,6	34,27±7,7	28,67±7,3
84-030 ^A (B)	3,74±3,6	0,93±2,2	0,00±0
81-681 ^H (B)	26,25±6,4	3,75±4,3	0,00±0
85-101 (B)	56,41±4,6	20,04±3,7	5,36±2,1
85-238 (B)	45,74±6,1	9,71±3,6	0,00±0
81-724 (B)	59,73±7,8	29,53±7,2	14,77±5,6
81-724 (B), ágar com sangue	55,26±7,0	28,95±6,4	17,89±5,4
81-777 (I)	64,55±4,7	39,24±4,8	17,21±3,7
36/01 (F)	51,85±10,7	30,86±9,9	8,64±6,0
79-194 (H)	75,56±7,2	57,73±8,6	44,14±8,7
79-194 (H), ágar com sangue	77,58±6,3	70,30±6,9	60,61±7,4
Clone A	56,50±3,6	25,72±3,2	10,11±2,2
Clone B	46,34±3,0	15,61±2,2	4,44±1,2
Clones esporádicos	65,30±3,7	41,95±3,9	21,48±3,2

^a, Clone bacteriano determinado pela técnica de PFGE em estudo anterior (Silva *et al.*, 2015)

^b, Média ± desvio padrão

^{A, H}, Amostra animal (A) e humana (H) do mesmo clone (B) e pertencentes ao ST129 (MLST).

5.1.2 Comparação do potencial de virulência frente ao *C. elegans* de amostras pertencentes do mesmo clone (B) e mesmo ST (129), porém de origens diferentes.

Foi realizado um teste de sobrevivência utilizando duas amostras que apresentavam o mesmo perfil de PFGE (clone B), o mesmo tipo ST (129) de acordo com o MLST, porém foram isoladas de hospedeiros diferentes (humano e equino).

Embora ambas as amostras tenham promovido a morte de todos os nematoides ao longo dos 3 dias de exposição, já no primeiro dia a amostra isolada de animal apresentou uma capacidade de virulência muito superior (****, $p < 0,0001$), com taxas de sobrevivência de 3,74% contra 26,25% da amostra isolada de humano. No final do segundo dia, a amostra isolada de animal praticamente já havia promovido a morte de todos os nematoides (0,93%; Figura 11; Tabela 2), comprovando seu maior potencial de virulência.

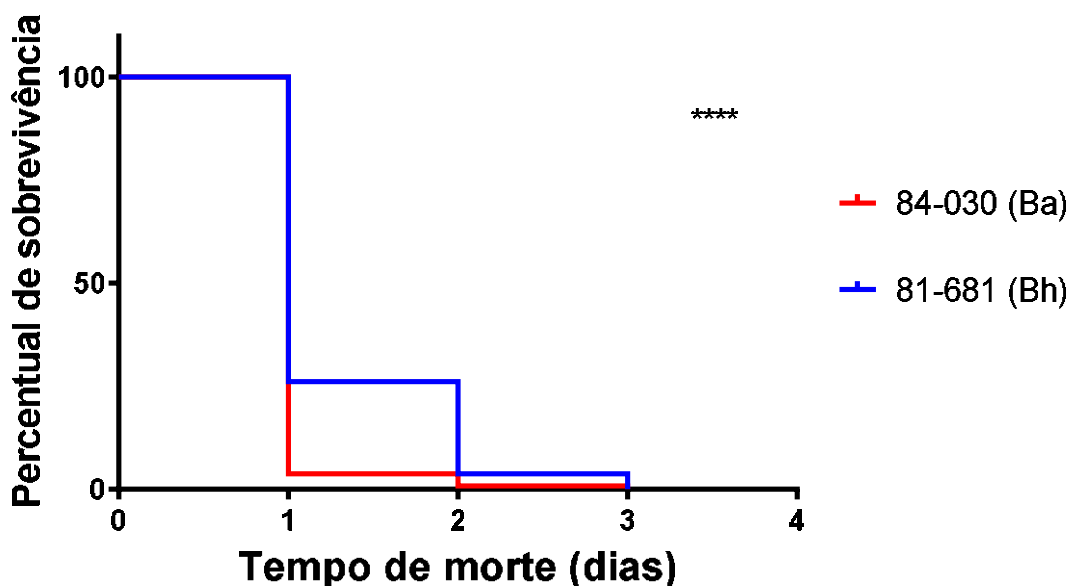


Figura 11. Sobrevivência de *C. elegans* frente a amostras de SDSE do clone B e ST 129 obtidas de hospedeiro humano e equino. 84-030 (clone B – equino) e 81-681 (clone B – humano). ****, $p < 0,0001$.

5.2 Microscopia ótica com Contraste de Interferência Diferencial (CID)

A fim de registrarmos a morfologia dos nematoides que foram expostos as diferentes cepas de SDSE, depositamos ao final do experimento de sobrevivência, alguns indivíduos sobre uma lâmina de microscopia e a processamos para visualização em microscópio com contraste de interferência diferencial. Os *C. elegans* que apenas tiveram contato com a *E. coli* OP50 também tiveram sua morfologia analisada e serviram como controle.

5.2.1 Controle

Os nematoides que foram expostos à cepa controle, apresentaram uma morfologia íntegra, com estruturas características bem preservadas como o bulbo (b), a vulva (v), o intestino percorrendo todo o segmento e a presença de ovos no interior do nematoide (Figura 12A). Os nematoides também apresentaram uma alta taxa de ovoposição (Figura 12B).



Figura 12. Microscopia ótica de *C. elegans* crescidos na presença da cepa controle *E. coli* OP50. Setas brancas apontam para o bulbo (B); ovo (o) e vulva (v).

5.2.2 Clone A

Os indivíduos expostos às amostras representantes do clone A tiveram suas características morfológicas alteradas (Figura13). Alguns nematoides expostos a amostra 88-467 tiveram uma perda do padrão morfológico, com um intenso acúmulo bacteriano ao longo do corpo (*; Figura13A). Outra característica observada foi grande alteração na cutícula do nematoide, principalmente na região posterior (setas brancas; Figura13B e C). Vermes ligados

um ao outro por uma mesma cutícula também foram observados, após a interação com a amostra 87/99 (Figura 13D).



Figura 13. Microscopia ótica de *C. elegans* expostos a amostras de SDSE pertencentes ao clone A. Setas apontam para alterações morfológicas ao longo do nematoide.

5.2.3 Clone B

Uma grande alteração na estrutura interna dos nematoides expostos a amostra 81-724 além da presença de manchas escuras que sugerem um acúmulo bacteriano ao longo do corpo do nematoide (setas brancas; Figura 14A, C e D). Além disso, foi observado o fenômeno de endotoquia matricida, onde a progênie não consegue ser liberada, eclodindo dentro do verme adulto levando-o a morte (seta branca; Figura 14B).

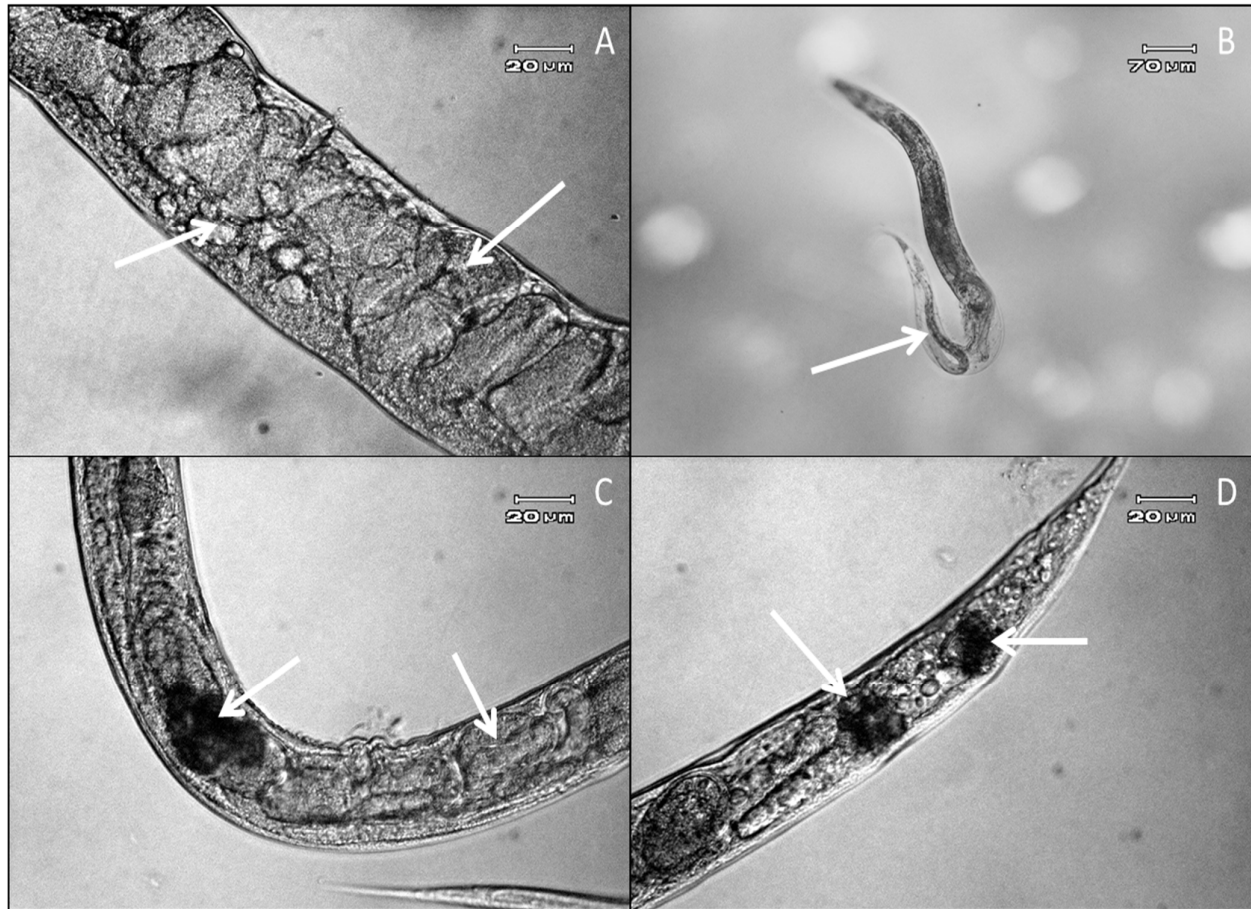


Figura 14. Microscopia ótica de *C. elegans* expostos a amostras de SDSE pertencentes ao clone B.

5.2.4 Clones esporádicos

Em alguns nematoides expostos à amostra 36/01 foi observada a presença de estruturas esféricas (possivelmente bolhas apoptóticas) ao longo do corpo do verme (setas brancas; Figura 15Aa). Em sua maioria, os nematoides expostos a amostras de clones esporádicos apresentaram uma cutícula preservada, e alguns nematoides ainda tinham ovos em seu interior (setas brancas; Figura 15B, C e D).



Figura 15. Microscopia ótica de *C. elegans* expostos a amostras pertencentes a clones esporádicos.

O estudo morfológico demonstrou que alterações morfológicas (da estrutura interna e da cutícula) estavam majoritariamente associadas aos clones mais virulentos ao *C. elegans* (A e B), conforme mostrado na Tabela 4. Já o aparecimento de estruturas esféricas internas parece estar mais associado à cepa pertencente ao clone esporádico H, que possui um potencial de virulência menor ao nematoide. A presença de SDSE ao longo do intestino do nematoide foi observado em todos os indivíduos avaliados, independente da cepa de SDSE a qual este foi exposto.

Tabela 4. Número de indivíduos positivos para os parâmetros morfológicos avaliados na microscopia ótica, após exposição as diferentes amostras de SDSE.

Amostras	Alterações morfológicas	Eclosão Interna	Estruturas esféricas internas	Presença de SDSE	Total de vermes
Controle	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	33 ^a
88-467 (A)^b	25 ^c (75,7%) ^d	2 (6,1%)	0 (0%)	33 (100%)	33
81-724 (B)	33 (91,6%)	5 (13,9%)	2 (5,6%)	36 (100%)	36
79-194 (H)	2 (0,6%)	5 (16,6%)	8 (26,6%)	30 (100%)	30

^a, número total de indivíduos avaliados

^b, clone determinado pela técnica de PFGE

^c, número de indivíduos positivos para a característica

^d, porcentagem de indivíduos positivos

5.3 Ensaio de escolha binária

5.3.1 Ensaio com escolha dos *C. elegans* entre amostras de SDSE e a amostra de *E. coli* OP50.

Neste experimento os nematoides foram confrontados com uma cepa de SDSE e a cepa controle de *E. coli* OP50 em uma mesma placa de meio de cultivo. Ao serem incubados puderam optar por se deslocarem até a amostra controle ou cada uma das diferentes amostras de SDSE testadas. O experimento foi realizado antes e após os indivíduos entrarem em contato com as amostras de SDSE, sendo a seguir comparados para avaliar também se houve diferença na escolha dos indivíduos após o treinamento.

Nenhum grupo de nematoides apresentou índice de escolha favorável ao SDSE (-1), tendo em todas as situações preferido em maior quantidade a amostra de *E. coli* OP50 (Figura 16). Mesmo os nematoides não apresentados às cepas de SDSE preferiram a amostra de *E. coli* OP50 que já era usada para a sua alimentação.

Uma diferença estatística foi encontrada no índice de escolha dos nematoides treinados e não treinados que foram expostos a cepa de SDSE 88.096, pertencente ao clone A e a cepa controle. Embora não tenha sido encontrada uma diferença estatisticamente significativa entre as demais cepas, foi observado que o índice de escolha pela cepa controle foi aumentado no grupo de vermes que foram previamente expostos (treinados) a uma das amostras de SDSE (Figura 16).

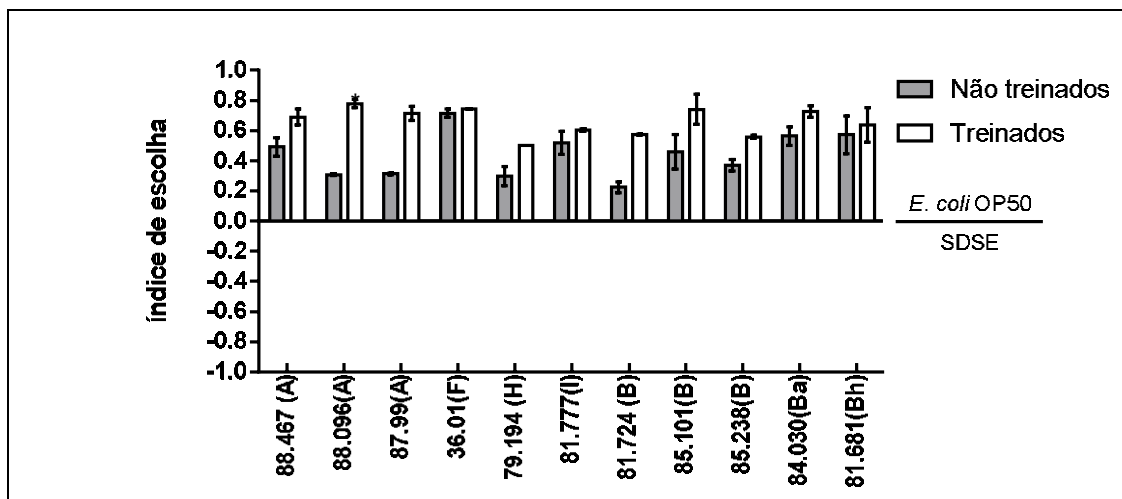


Figura 16. Ensaio de escolha binária de *C. elegans* entre amostras de *Streptococcus dysgalactiae* subespécie *equisimilis* e *Escherichia coli* OP50.

5.3.2 Ensaio com escolha dos *C. elegans* entre amostras de SDSE de diferentes clones

No experimento de escolha binária, um grupo de vermes foi exposto concomitantemente a dois diferentes clones de SDSE a fim de se avaliar a preferência olfativa dos nematoides. O experimento foi realizado com *C. elegans* não treinados e repetido após o treinamento dos animais.

Mesmo não tendo diferença significativa entre os grupos treinados e não treinados no teste com os dois clones predominantes, a maior parte dos nematoides não treinados preferiram a amostra do clone B. No entanto, após treinamento, com exceção de uma dupla, *C. elegans* treinados preferiram o clone A (Figura 17).

No entanto, quando se compara a exposição dos indivíduos a amostras de SDSE do clone A com amostras de clones esporádicos, o maior índice de escolha ficou para os clones esporádicos, tanto para grupo não treinado como também para os treinados (Figura 18). Ao confrontarmos o *C. elegans* como amostras do clone B e amostras representantes dos clones esporádicos observamos que a maioria das amostras treinadas teve preferência pelos clones esporádicos (Figura 19).

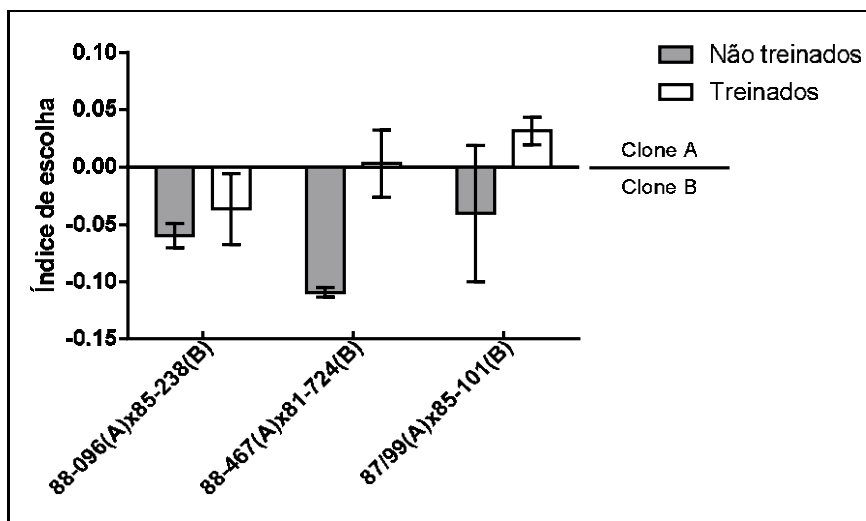


Figura 17. Ensaio de escolha binária entre representantes do clone A e B.

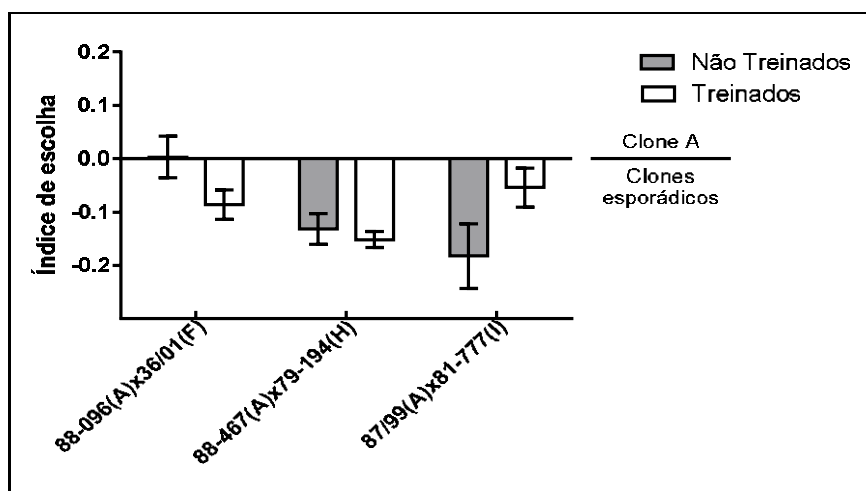


Figura 18. Ensaio de escolha binária entre representantes do clone A e clones esporádicos

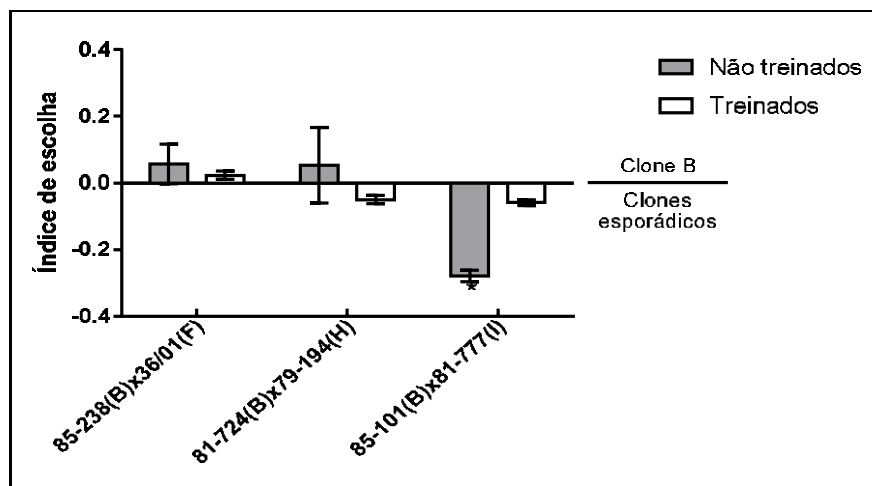


Figura 19. Ensaio de escolha binária entre representantes do clone B e clones esporádicos.

Nossos resultados foram capazes de apresentar uma preferência dos *C. elegans* treinados pelas amostras pertencentes a clones esporádicos, quando confrontados com estas e amostras dos clones A ou B (Figuras 18 e 19).

5.4 Quantificação de SDSE no intestino do *C. elegans*

No ensaio de quantificação bacteriana do interior dos corpos dos nematoides foi observado um maior número de UFC por nematoide nos vermes que se alimentaram da amostra controle *E. coli* OP50, ao longo de todos os 3 dias do experimento (Figura 20). A partir do segundo dia de interação os *C. elegans* que interagiram com a amostra representante de um clone esporádico apresentaram um maior número interno de UFC quando comparados com indivíduos que se alimentaram com SDSE representantes dos clones A ou B. No geral, os nematoides com menor número de UFCs no intestino se alimentaram com as amostras de SDSE dos clones A e B, indicando a tentativa de fuga dos indivíduos dos clones mais virulentos.

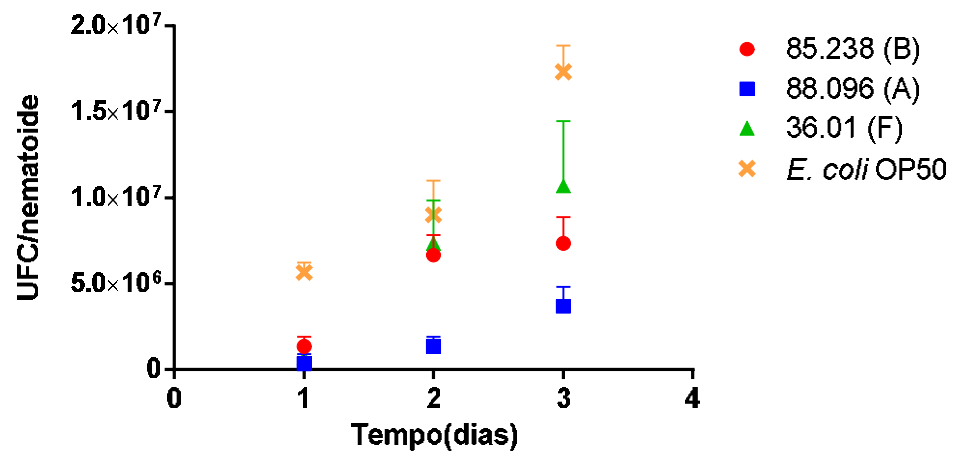


Figura 20. Ensaio de quantificação de bactérias viáveis presente no intestino do nematoide.

6. DISCUSSÃO

Neste trabalho buscamos comparar a virulência dos clones de SDSE prevalentes na região sudeste do Brasil entre os anos de 1979 e 2008 (clones A e B) com amostras pertencentes a clones encontrados esporadicamente, em uma coleção de amostras previamente estudada, frente a modelos *in vivo* utilizando *Caenorhabditis elegans*.

C. elegans tem sido um modelo bastante utilizado no estudo de virulência por sua facilidade de manipulação, alto compartilhamento de genes de mamíferos, baixo custo e não necessidade de submissão dos estudos ao comitê de ética (Darby, 2005). Em nosso trabalho, amostras pertencentes aos grupos clonais A, B e clones esporádicos foram utilizadas para avaliar a capacidade das amostras de SDSE à levarem indivíduos de *C. elegans* à morte. Em *S. pyogenes*, a morte de *C. elegans* é mediada pela produção de peróxido de hidrogênio pela bactéria, e essa capacidade de *killing* possui relação direta com a quantidade de peróxido que a cepa é capaz de produzir (Jansen *et al.*, 2002; Bolm *et al.*, 2004). O sangue desfibrinado de carneiro, utilizado para enriquecer meios sólidos para cultivo e permitir a diferenciação de estreptococos β -hemolíticos, mantém em sua composição a enzima catalase, que leva à quebra do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. Uma vez que *S. pyogenes* e SDSE são espécies relacionadas é possível que utilizem o mesmo mecanismo para levar os *C. elegans* à morte. Bolm e colaboradores em 2004 verificaram que na presença da enzima catalase (uma peroxidase) amostras de SDSE mataram menos de 1% dos indivíduos com relação ao crescimento em meio líquido sem a enzima. A presença do sangue no meio, por apresentar entre seus componentes uma peroxidase, pode ter levado a uma redução na virulência das amostras de SDSE avaliadas (Bolm *et al.*, 2004). Observamos o mesmo nas amostras de SDSE testadas neste estudo ao compararmos a virulência frente ao *C. elegans* de amostras crescidas em meio sólido com e sem adição de sangue. Uma maior sobrevivência dos nematoides foi observada nos poços que continham sangue. Assim, nossos resultados corroboram o que já foi descrito anteriormente na literatura e por esse motivo todos os outros ensaios foram conduzidos sem a adição de sangue. Nossos resultados também contribuem para a elucidação do mecanismo pelo qual os SDSE matam os *C. elegans*.

Oliver e colaboradores em 2017 avaliaram a interação entre clones predominantes de *Pseudomonas aeruginosa*, o perfil de genes associados com a virulência e a sua capacidade de matar o *C. elegans*. Neste estudo eles observaram que as cepas com maior arsenal de virulência e mais persistentes apresentavam uma maior capacidade de *killing* do nematoide

(Oliver *et al.*, 2017). Já Conly e colaboradores fizeram uma análise correlativa das características epidemiológicas e moleculares de clones de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina com o potencial de virulência em *C. elegans*. Eles observaram que todas as características moleculares avaliadas, como o perfil de PFGE, tipagem *SCCmec*, tipagem por MLST e presença de leucocidina de Pantón-Valentine estavam significativamente associados a atividade nematócida, e com isso concluíram que o *background* genômico dessas cepas pode estar mais relacionado ao potencial de virulência do que a presença de uma única toxina (Conly *et al.*, 2013).

Os nossos resultados demonstraram que individualmente todas as amostras pertencentes aos clones A e B quando comparadas aos clones esporádicos promoveram um menor percentual de sobrevivência do nematoide, logo, devem apresentar maior potencial de virulência. Esses achados podem ajudar a explicar a persistência dos clones A e B durante 29 anos e 16 anos, respectivamente, na coleção de amostras que estudamos anteriormente (Silva *et al.*, 2015). Já a comparação entre os clones prevalentes evidenciou que o clone B parece ser um pouco mais virulento para os nematoides, seguido do clone A. Esses resultados estão em acordo com uma maior detecção de genes associados com fatores de virulência nas amostras dos clones A e B, quando comparados com clones esporádicos demonstrada em trabalho anterior (Silva, 2016). Nesse estudo, foram estudadas 62 amostras de SDSE, sendo 21 do clone A, 23 do clone B e 18 pertencentes a clones esporádicos. Os resultados mostraram que o gene que codifica a estreptodornase (*spdI*) e a maioria dos que codificam superantígenos (*speC*, *speK*, *speL* e *speM*) não foram encontrados em nenhuma das amostras avaliadas. Já os genes *brpA*, *emm*, *fbp*, *gapA*, *hyl*, *inlA*, *sagA* e *slo* foram encontrados em todas as amostras. Os demais genes pesquisados não foram encontrados em todas as amostras; são eles: o gene para a subunidade de pilus (49/62; presente em 79% das amostras testadas), *lmb* (60/62; 96,8%), *scpB* (56/62; 90,3%), *ska* (60/62; 96,8%) e o gene do superantígeno *spegg* que foi encontrado em 50 das 62 amostras (80,6%). Em todas as amostras pertencentes aos clones A e B foram detectados os genes *lmb*, *scpB*, e *ska*, enquanto o gene para subunidade de pilus foi detectado em 15/21 (71,4%) das amostras do clone A e 21/23 (91,3%) das amostras do clone B. O gene *spegg* foi detectado em 18/21 (85,7%) das amostras pertencentes ao clone A e em todas as amostras do clone B.

Portanto, quando foi comparada a detecção dos diferentes genes, agrupando as amostras de um mesmo clone, pode-se observar maior ausência de genes de virulência nas amostras pertencentes a clones esporádicos (Silva, 2016; Figura 21).

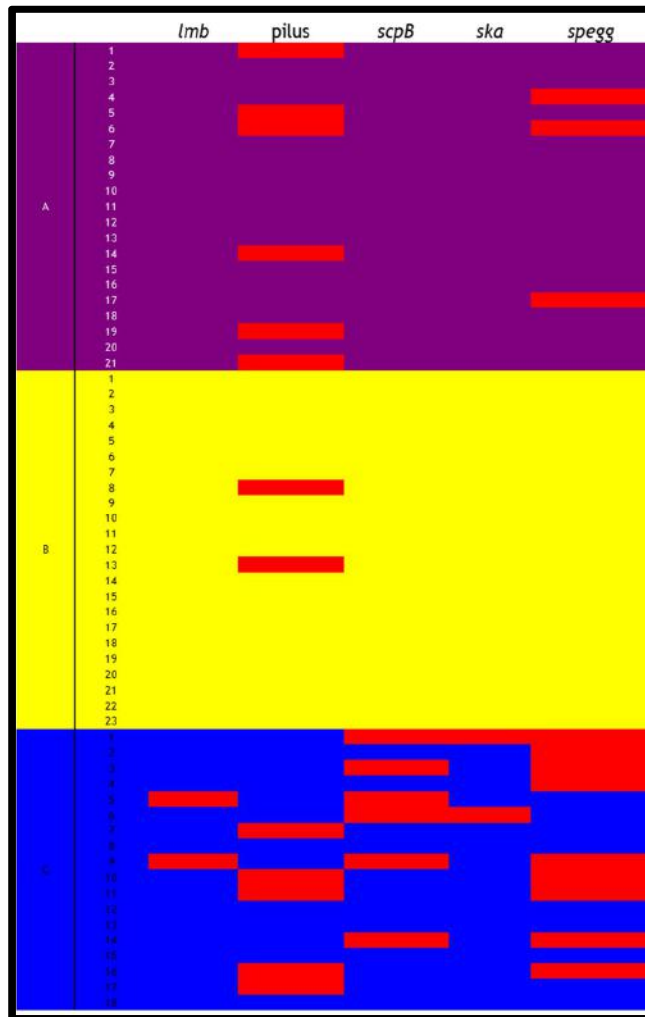


Figura 21: *Heatmap* com presença e ausência dos genes pesquisados em amostras de SDSE pertencentes ao clone A (A), clone B (B) e clones esporádicos (C). Foram desconsiderados nessa imagem os genes detectados em todas as 62 amostras e os que não foram detectados em nenhuma. Os retângulos em vermelho representam resultados negativos; cada bloco de cor representa o número total de amostras positivas de cada grupo clonal (Figura retirada de Silva, 2016).

Nossos resultados correlacionam pela primeira vez, uma associação epidemiológica-molecular de cepas de SDSE com um modelo *in vivo* de fácil manuseio, o qual nos permitiu observar uma associação entre os clones persistentes (A e B) e uma maior virulência frente aos *C. elegans*.

As alterações morfológicas observadas (alteração na morfologia interna, alteração na cutícula, presença de eclosão interna, presença de bolhas apoptóticas internas e presença de SDSE internamente) confirmam a capacidade que as cepas de SDSE têm de afetar o nematoide. Essas alterações morfológicas estavam na maioria das vezes associadas a

indivíduos expostos a amostras de SDSE pertencentes aos clones A e B. Um fenótipo de alterações morfológicas internas, como a perda da forma dos órgãos e alterações na cutícula foram mais associadas aos clones predominantes A e B. Também foi observada uma intensa alteração na parte posterior da cutícula dos nematoides colocados frente a cepa 85-238 (clone A). O aparecimento do fenômeno de endotoquia matricida, que é um fenômeno em que os ovos não são postos e eclodem dentro do verme, com as larvas se alimentando dos órgãos da mãe, levando à morte do verme, foi mais observado frente a vermes expostos às amostras do clone B do que as do clone A. No entanto o fenômeno apareceu com maior frequência nos indivíduos que interagiram com amostras dos clones esporádicos, demonstrando que estes, apesar de não alterarem nem a morfologia interna nem a cutícula do vermes, também são capazes, em menor grau de causarem danos ao nematoide. Como várias larvas costumam não eclodir, elas crescem até romperem a cutícula da mãe. Outro fenômeno predominantemente visto em indivíduos crescidos na presença de cepa pertencentes ao clone esporádico F (36/01; 50% dos indivíduos) foi o aparecimento de estruturas esféricas internas ao longo do corpo do verme, sugestivas de bolhas apoptóticas. Todos os fenômenos observados são característicos de exposição do *C. elegans* a situações de estresse, e no caso do SDSE podem estar relacionados a uma maior ou menor produção de peróxido de hidrogênio (Bolinho *et al.*, 2004). De toda forma, o estresse pode levar ao mecanismo de morte celular programada do *C. elegans*. Hengartner e Liu, em 1999, demonstraram homologia entre os genes envolvidos na cadeia de morte celular programada do *C. elegans* e de mamíferos (Hengartner e Liu, 1999).

A grande diferença estatística encontrada na capacidade de *killing* das amostras de clone B isolada de um processo de colonização em humano (81-681) quando comparada com a de secreção uterina em equino (84-030), ambas pertencentes ao ST129 quando analisadas pela técnica de MLST, já no primeiro dia de interação, pôde revelar uma maior virulência da amostra de origem animal. Embora a detecção de genes de virulência não tenha demonstrado diferenças entre as amostras, nosso grupo de pesquisa observou que a amostra de origem animal produzia mais biofilme. Este resultado somado ao fato observado neste estudo, sugere que esta seja mais virulenta que a isolada de humanos.

C. elegans expostos a agentes patogênicos no ambiente podem morrer ou sobreviver, e o resultado dessa interação depende da susceptibilidade do nematoide aos fatores de virulência dos patógenos, que estão em constante evolução para melhor adaptabilidade. Osanai e colaboradores publicaram um trabalho em 2002 relatando o comportamento de aversão de *C. elegans* frente a cepas de *Staphylococcus aureus*. O trabalho mostrou também

que os nematoides evitaram o sobrenadante da cultura bacteriana, sugerindo que moléculas secretadas estivessem envolvidas nessa aversão. A utilização de cepas mutantes permitiu ao grupo demonstrar que a toxina 1 da síndrome do choque tóxico (TSST-1) e a enterotoxina C (SEC) estafilocócica, superantígenos produzidas por *S. aureus*, eram responsáveis pela aversão dos vermes (Osani *et al.*, 2002).

Em 2005 Zhang e colaboradores demonstraram que o nematoide modifica suas preferências olfativas após a exposição à bactérias patogênicas, evitando odores do patógeno e aumentando sua atração por odores de bactérias não patogênicas familiares ao indivíduo, através de quimiossensores capazes de estimular a aversão as bactérias patogênicas (Zhang *et al.*, 2005). Em 2006, Beale e colaboradores demonstraram que o verme é atraído pela molécula de lactona de homoserina aciladas (AHSLs) - que está associada ao *quorum sensing* - produzida por *Pseudomonas aeruginosa*. Esta atração o torna capaz de fazer uma associação negativa dessa molécula com o microrganismo que a produz (Beale *et al.*, 2006). Um estudo conduzido por Tran e colaboradores em 2017, demonstrou que o nematoide é capaz de evitar diferentes cepas de *Streptomyces* produtoras de toxinas. Estes estudos demonstram a alta capacidade desses nematoides em aprender a distinguir bactérias patogênicas das não patogênicas (Tran *et al.*, 2017).

Em nosso trabalho, inicialmente avaliamos a capacidade dos vermes em escolher entre a cepa controle de *E. coli* OP50 e uma das cepas de SDSE. O grupo de animais que não havia tido contato prévio com a cepa de SDSE apresentou índices de escolha favoráveis à cepa controle. A preferência pela cepa controle foi aumentada no grupo de vermes treinados, indicando que o contato prévio com o SDSE aumentou a aversão do nematoide em relação a estes. Já na segunda etapa do experimento, nós avaliamos o ajuste fino do nematoide em optar pela bactéria menos patogênica, quando as únicas opções eram cepas de SDSE. De maneira geral, estes resultados demonstraram que os nematoides preferiam as cepas dos clones esporádicos, em comparação as dos clones predominantes (A e B). Quando os nematoides foram desafiados frente a uma cepa do clone A e outra do clone B observamos que na maioria das comparações, os indivíduos que foram treinados optaram pela cepa representante do clone A. Estes resultados estão de acordo com os ensaios de sobrevivência onde os *C. elegans* sobreviveram menos frente as amostras do clone B. Também são concordantes com os estudos de alterações morfológicas onde observamos maior número de microrganismos com morfologia interna e cutícula alterada, presença de eclosão interna e bolhas apoptóticas nos *C. elegans* expostos a representantes do clone B do que do clone A. Assim, estes resultados

condizem com o que foi observado no ensaio de sobrevivência, onde observamos um maior potencial de virulência atribuído aos clones predominantes.

No ensaio de quantificação de bactérias presentes no intestino do nematoide pudemos constatar que os indivíduos expostos à amostra representante do clone esporádico F (36/01) apresentaram um número de UFC mais próximo ao dos indivíduos expostos a *E. coli*, que é o alimento natural do verme. Um menor número de UFC foi visto quando o verme se alimentava de SDSE representantes do clone A, seguido do B. Estes resultados podem ser explicados por uma aversão às cepas dos clones predominantes, talvez decorrente da liberação de maior quantidade de peróxido de hidrogênio. Bhatla e Horvitz, no ano de 2015, associou a presença de peróxido de hidrogênio em concentrações determinadas com a inibição da alimentação dos vermes, sugerindo que tal mecanismo envolva os receptores gustativos GUR-3 e LITE-1 (Bhatla e Horvitz, 2015). Outro estudo observou que a exposição de *C. elegans* a 6mM ou 10mM de H₂O₂, por trinta minutos, causa uma diminuição dos movimentos, da progênie, do bombeamento faríngeo, além de declínio na taxa de crescimento e produção de ATP (Grades, 2011). Outra via de explicação para o resultado obtido, seria uma menor quantidade de UFC decorrente da morte precoce dos indivíduos - fato observado no ensaio de sobrevivência – e portanto, a não permanência dos microrganismos mais virulentos dentro do *C. elegans*, ao final do terceiro dia do experimento.

Compreender a interação desses microrganismos patogênicos é um passo importante para o desenvolvimento de estratégias clínicas. Para tal, é necessária a utilização de um organismo hospedeiro que tenha a sua biologia claramente compreendida, como é o caso do *C. elegans*. Em nosso estudo o nematoide demonstrou ser um excelente modelo para realizar uma análise comparativa do potencial de virulência dos diferentes clones de *Streptococcus dysgalactiae* subespécie *equisimilis* abordados neste estudo. Até a presente data um único trabalho, realizado por Bolm e colaboradores em 2004, avaliou o potencial de virulência de apenas duas cepas de SDSE frente ao *C. elegans* (Bolm *et al.*, 2004). Nosso estudo foi mais além, e avaliou o potencial de virulência de um total de 11 amostras, clonalmente caracterizadas, utilizando diferentes estratégias e associando os resultados a características genóticas e epidemiológicas desses microrganismos.

Sem dúvida, o *background* genético dos clones predominantes (A e B) confere um maior potencial de virulência, portanto, isso poderia justificar sua maior persistência entre as amostras oriundas do sudeste do Brasil, isoladas durante um período de 30 anos.

7. CONCLUSÃO

A partir dos resultados apresentados nesta monografia, concluímos que:

O uso de *Caenorhabditis elegans* como modelo para comparação de virulência frente a amostras de SDSE é eficaz e traz resultados robustos, satisfatórios e condizentes com o que foi observado para outros microrganismos em outros estudos.

O teste de sobrevivência apontou um maior potencial de virulência aos clones A e B que são os mais persistentes no Brasil.

O ensaio de escolha binária atestou a capacidade do nematoide de distinguir e optar por cepas menos virulentas. Sua escolha pelas cepas de *E. coli* ou as amostras de SDSE de clones esporádicos novamente apontam para uma maior patogenicidade das amostras de SDSE pertencentes aos clones A e B.

Em conjunto as alterações morfológicas observadas foram condizentes com a capacidade das cepas de causar danos aos vermes.

A quantificação de SDSE no interior do verme mostrou que as amostras mais virulentas são encontradas em menor quantidade, quando comparadas ao controle e a amostra do clone esporádico, corroborando com o fenótipo de aversão do nematoide frente as cepas mais virulentas e o resultado observado no ensaio de sobrevivência. Este resultado, ainda se associa com a hipótese do peróxido de hidrogênio liberado no meio extracelular, ser um dos mecanismos de morte.

Amostras apresentando o mesmo padrão de PFGE (clone B) e mesmo tipo ST 129, oriundas de diferentes hospedeiros, mostraram variação no perfil de virulência frente ao modelo de *C. elegans*, demonstrando maior virulência na amostra isolada de equino.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdelsalam, M., Chen, S.C. e Yoshida, T. (2010). Dissemination of streptococcal pyrogenic exotoxin G (*spgG*) with an IS-like element in fish isolates of *Streptococcus dysgalactiae*. FEMS Microbiol Lett. 309, 105-113.
- Acke, E., Midwinter, A.C., Lawrence, K., Gordon, S.J., Moore, S., Rasiah, I., Steward, K., French, N. e Waller, A. (2015). Prevalence of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* and *S. equi* subsp. *zooepidemicus* in a sample of healthy dogs, cats and horses. N Z Vet J. 63, 265-271.
- Anand, T.D., Rajesh, R., Rajendhran, J. e Gunasekaran, P. (2012). Superantigen profiles of emm and emm-like typeable and nontypeable pharyngeal streptococcal isolates of South India. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 11, 3.
- Bastaki, J.M. (2015). Necrotizing tonsillitis caused by group C beta-hemolytic streptococci. Ear Nose Throat J. 94, 1-3.
- Beale, E., Li, G., Tan, M.W. e Rumbaugh. K.P. (2006). *Caenorhabditis elegans* senses bacterial autoinducers. Appl Environ Microbiol. 72, 5135-5137
- Begun, J., Sifri, C.D., Goldman, S., Calderwood, S.B. e Ausubel, F.M. (2015). *Staphylococcus aureus* virulence factors identified by using a high-throughput *Caenorhabditis elegans*-killing model. Infect Immun. 73, 872-877.
- Behara, B., Mathur, P., Bhardwaj, N., Jain, N., Misra, M.C., Kapil, A., e Singh, S. (2014). Antibiotic susceptibilities, streptococcal pyrogenic exotoxin gene profiles among clinical isolates of group C or G *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* & of group G *S. anginosus* group at a tertiary care centre. Indian J. Med. Res. 139, 438-445.
- Bert, F., Picard, B., Branger, C. e Lambert-Zechovsky, N. (1997). Pulsed-field gel electrophoresis is more discriminating than multilocus enzyme electrophoresis and random amplified polymorphic DNA analysis for typing pyrogenic streptococci. Curr Microbiol. 34, 226-229.
- Bhatla, N. e Horvitz, H.R. (2015) Light and hydrogen peroxide inhibit *C. elegans* Feeding through gustatory receptor orthologs and pharyngeal neurons. Neuron. 85,804-818.
- Blaxter, M. (2011). Nematodes: The worm and its relatives. PLoS Biol. 9, e1001050.
- Bolm, M., Jansen, W.T.M., Schnabem, R. e Chhatwal, G.S. (2004). Hydrogen peroxide-mediated killing of *Cenorhabditis elegans*: a common feature of different streptococcal species. Infect. Immun. 72, 1192-1194.
- Brandt, C.M. e Spellerberg, B. (2009). Human infections due to *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis*. Clin Infect Dis. 49, 766-772.
- Brenner, S. (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. Genetics. 77, 71-94.
- Bruun, T., Kittang, B.R., de Hoog, B.J., Aardal, S., Flaatten, H.K., Langeland, N., Mylvaganam, H., Vindenes, H.A. e Skrede S. (2013). Necrotizing soft tissue infections caused by *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* of groups C and G in western Norway. Clin. Microbiol. Infect. 19, 545-550.
- C. elegans* Sequencing Consortium (1988). Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. Science 282, 2012-2018.
- Calahorra, F. e Ruiz-Rubio, M. (2011). *Caenorhabditis elegans* as an experimental tool for the study of complex neurological diseases: Parkinson's disease, Alzheimer's disease and autism spectrum disorder. Invert. Neurosci. 11, 73-83.
- CDC *Streptococcus* Laboratory. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/streplab/protocolemmtype.html>>

- Cole, J.N., Barnett, T.C., Nizet, V. e Walker, M.J. (2011). Molecular insight into invasive group A streptococcal disease. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 724-736.
- Corrêa, A.B.A. (2002). Caracterização molecular de cepas de *Streptococcus agalactiae* pertencentes aos tipos sorológicos Ia e Ia/c. Monografia (graduação em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia) – Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- Creti, R., Imperi, M., Baldassarri, L., Pataracchia, M., Alfarone, G. e Orefici, G. (2007). Lateral transfer of alpha-like protein gene cassettes among streptococci: identification of a new family member in *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*. *Lett. Appl. Microbiol.* 44, 224-227.
- Cunningham, K.A. e Ashrafi, K. (2009) Fat rationing in dauer times. *Cell Metab.* 9, 113-114.
- Cusumano, Z.T., Watson, M.E. e Caparon, M.G. (2014). *Streptococcus pyogenes* arginine and citrulline catabolism promotes infection and modulates innate immunity. *Infection and Immunity* 82, 233–242.
- Darby, C. (2005). Interactions with microbial pathogens. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, *WormBook*. 6, 1-15.
- Efstratiou, A. (1997). Pyogenic streptococci of Lancefield groups C and G as pathogens in man, *Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser.* 26, 72S-79S.
- Ewbank, J.J. (2001). Tackling both sides of the host–pathogen equation with *Caenorhabditis elegans*. *Microbes and Infection* 4, 247–256.
- Facklam, R. (2002). What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 613-630.
- Fornera, S. e Walde, P. (2010). Spectrophotometric quantification of horseradish peroxidase with o-phenylenediamine. *Anal. Biochem.* 407, 293-295.
- Fung, J.C., Wichier, K. e McCarty, M. (1982). Immunochemical analysis of streptococcal group A, B, and C carbohydrates, with emphasis on group A. *Infect Immun.* 37, 209-215.
- Gallagher, L.A. e Manoil, C. (2001). *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 kills *Caenorhabditis elegans* by cyanide poisoning. *J Bacteriol.* 183, 6207-6214.
- Gammon, D.B., Ishidate, T., Li, L., Gu, W., Silverman, N. e Mello, C. (2017). The Antiviral RNA Interference Response Provides Resistance to Lethal Arbovirus Infection and Vertical Transmission in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol.* 27,795-806
- Garsin, A.D., Sifri, C.D., Mylonakis, E., Qin, X., Singh, V.K., Murray, B.E., Calderwood, S.B. e Ausubel, F.M. (2001). A simple model host for identifying Gram-positive virulence factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 98, 10892–10897.
- Gaunt, P.N. e Seal, D.V. (1987) Group G streptococcal infections. *J. Infect.* 15, 5-20.
- Gupta, A. e Singh, V. (2017). GPCR Signaling in *C. elegans* and Its Implications in Immune Response. *Adv Immunol.* 136, 203-226.
- Handford, C. e Kalogrianitis, S. (2015). A rare case of spontaneous acute bacterial arthritis of the glenohumeral joint attributed to *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*. *Int. J. Shoulder Surg.* 9, 100–101.
- Harrington, D.J., Greated, J.S., Chanter, N., e Sutcliffe, I.C. (2000). Identification of lipoprotein homologues of pneumococcal PsaA in the equine pathogens *Streptococcus equi* and *Streptococcus zooepidemicus*. *Infect. Immun.* 68, 6048-6051.

- Hashikawa, S., Inuma, Y., Furushita, M., Ohkura, T., Nada, T., Torii, K., Hasegawa, T. e Ohta, M. (2004). Characterization of group C and G streptococcal strains that cause streptococcal toxic shock syndrome. *J Clin Microbiol.* 42, 186–192.
- Hashmi, S., Zhang, J., Oksov, Y., Ji, Q. e Lustigman, S. (2006) The *Caenorhabditis elegans* CPI-2a cystatin-like inhibitor has an essential regulatory role during oogenesis and fertilization. *J. Biol. Chem.* 281, 28415-28429.
- Hu, P.J. (2007). Dauer. *WormBook.* 8, 1-19.
- Jansen, W.T.M., Bolm, M., Balling, R., Chhatwal, G.S. e Schnabel, R. (2002). Hydrogen peroxide-mediated killing of *Caenorhabditis elegans* by *Streptococcus pyogenes*. *Infect. Immun.* 70, 5202–5207.
- Jorgensen, E.M. e Mango, S.E. (2002). The art and design of genetic screens: *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Rev. Genet.* 3, 356-369.
- Jourani, M., Duprez, T., Roelants, V., Rodriguez-Villalobos, H. e Hantson, P. (2017). Acute Bacterial Meningitis and Systemic Abscesses due to *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* Infection. *Case Rep Infect Dis.* 2017,864-859.
- Kaletta, T. e Hengartner, M.O. (2006). Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 387-398.
- Kimura, K.D., Tissenbaum, H.A., Liu, Y. e Ruvkun, G. (1997). *daf-2*, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 277, 942-946.
- Köhler, W. (2007). The present state of species within the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Int. J. Med. Microbiol.* 297, 133-150.
- Kong, C., Eng, S., Lim, M.P. e Nathan, S. (2016). Beyond traditional antimicrobials: A *Caenorhabditis elegans* model for discovery of novel anti-infectives. *Front Microbiol.* 7, 1956.
- Lancefield, R. D. (1933). Serological differentiation of human and other groups of haemolytic streptococci. *J. Exp. Med.* 57, 571-595.
- Liu, Q.A. e Hengartner, M.O. (1999). The molecular mechanism of programmed cell death in *C. elegans*. *Ann N Y Acad Sci.* 887,92-104.
- Lorenzen, S. (1994). The phylogenetic systematics of free-living nematodes. London: The Ray Society.
- LPNS (2017). List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. Disponível em: <http://www.bacterio.net/>. Acesso em 25/10/2017.
- Mahajan-Miklos, S., Tan, M.W., Rahme, L.G. e Ausubel, F.M. (1999). Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa*-*Caenorhabditis elegans* pathogenesis model. *Cell.* 96, 47-56
- Mak, P., Zdybicka-Barabas, A. e Cytryńska, M. (2010). A different repertoire of *Galleria mellonella* antimicrobial peptides in larvae challenged with bacteria and fungi. *Dev. Comp. Immunol.* 34, 1129-1136.
- Markley, A.L., Jensen, E.R. e Lee, S.W. (2012). An *Escherichia coli* based bioengineering strategy to study streptolysin S biosynthesis. *Anal. Biochem.* 420, 191-193.
- Mason, K.L., Rogers, L.M., Soares, E.M., Bani-Hashemi, T., Downward, J.E., Agnew, D., Peters-Golden, M., Weinberg, J.B., Crofford, L.J. e Aronoff, D.M. (2013). Intrauterine group A streptococcal infections are exacerbated by prostaglandin E₂. *J. Immunol.* 191, 2457–2465.

- McMillan, D.J., Bessen, D.E., Pinho, M., Ford, C., Hall, G.S., Melo-Cristino, J. e Ramirez, M. (2010). Population genetics of *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis* reveals widely dispersed clones and extensive recombination. PLoS One. 5, e11741.
- McNeilly, C.L. e McMillan, D.J. (2014). Horizontal gene transfer and recombination in *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*. Front. Microbiol. 5, 676.
- Meijer, A.H. e Spaik, H.P. (2011). Host-pathogen interactions made transparent with the zebrafish model. Curr. Drug Targets. 12, 1000-1017.
- Metzgar, D. e Zampolli, A. (2011). The M protein of group A *Streptococcus* is a key virulence factor and a clinically relevant strain identification marker. Virulence 2, 402-412.
- Miranda-Vizuet A. e Veal, E.A. (2016). *Caenorhabditis elegans* as a model for understanding ROS function in physiology and disease. Redox Biol. 11,708-714.
- Mobin Shah, M.D., Robert, M., Centor, M.D., e May Jennings, M.D. (2007). Severe Acute Pharyngitis Caused by Group C Streptococcus. J Gen Intern Med. 22, 272-274.
- Mondal, S. e Manna, B. (2013). A new species of *Caenorhabditis* (Osche, 1952) Dougherty, 1953 (nematoda: *Rhabditida*) found associated with *Ratufa indica* erxleben, 1777 captivated at Alipore zoological garden, Kolkata, India. NBU J. Anim. Sc. 7, 35-42.
- Murray, P.R. (2014). Microbiologia Médica. Rosenthal, K.S. e Pfaller, M.A., eds. 6. ed. (Rio de Janeiro, Elsevier).
- Naik, T.B., Nadagir, S.D. e Biradar, A. (2016). Prevalence of beta-hemolytic streptococci groups A, C, and G in patients with acute pharyngitis. J. Lab. Physicians 8, 45-49.
- Nei, M. e Glazko, G.V. (2002). Estimation of divergence times for a few mammalian and several primate species. Am. Gen. Assoc. 93, 157-164.
- Ngba Essebe, C., Visvikis, O., Fines-Guyon, M., Vergne, A., Cattoir, V., Lecoustumier, A., Lemichez, E., Sotto, A., Lavigne, J.P. e Dunyach-Remy, C. (2017). Decrease of *Staphylococcus aureus* Virulence by *Helcococcus kunzii* in a *Caenorhabditis elegans* Model. Front Cell Infect Microbiol. 16,7-77
- Nobbs, A.H., Lamont, R.J. e Jenkinson, H.F. (2009). *Streptococcus* adherence and colonization. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 73, 407-450.
- Ogg, S., Paradis, S., Gottlieb, S., Patterson, G.I., Lee, L., Tissenbaum, H.A. e Ruvkun, G. (1997). The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*. Nature 389, 994-999.
- Osanai , Hu, D.L. e Nakane. (2012). *Caenorhabditis elegans* evita toxinas estafilocócicas superantigênicas via via dependente de 5-hidroxitriptamina. Pode J Microbiol. 11, 1268-77.
- Pathak, V., Hurtado Rendon I.S. e Smina, M. (2012). Necrotizing pneumonia caused by group C streptococci in a young adult. Respir. Care 57, 454-456.
- Pinho, M.D., Melo-Cristino, J. e Ramirez, M. (2006). Clonal relationships between invasive and noninvasive Lancefield group C and G streptococci and *emm*-specific differences in invasiveness. J. Clin. Microbiol. 44, 841-846.
- Platt, H. M. e Lorenzen, S. (1994). The phylogenetic systematics of free-living nematodes. London: The Ray Society.
- Reid, S.D., Montgomery, A.G., Voyich, J.M., DeLeo, F.R., Lei, B., Ireland, R.M., Green, N.M., Liu, M., Lukomski, S., e Musser, J.M. (2003). Characterization of an extracellular virulence factor made by group A

Streptococcus with homology to the *Listeria monocytogenes* internalin family of proteins. *Infect. Immun.* 71, 7043-7052.

Sánchez-Diener, I., Zamorano, L., López-Causapé, C., Cabot, G., Mulet, X., Peña, C., Del Campo, R., Cantón, R. e Doménech-Sánchez. (2017). Interplay among Resistance Profiles, High-Risk Clones, and Virulence in the *Caenorhabditis elegans* *Pseudomonas aeruginosa* Infection Model. *Antimicrob Agents Chemother.* 22,61.

Schleifer, K. H. e Kilpper-Bälz, R. (1984) Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the Genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 34, 31-34.

Schleifer, K.H. (1986). Gram-positive cocci. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharp, M.E., e Holt, J.G., eds. 1. ed., volume 2, (Baltimore: The Williams e Wilkins Co.), pp. 999-1002.

Shah, M., Centor, R.M. e Jennings, M. (2007). Severe acute pharyngitis caused by group C *Streptococcus*. *J. Gen. Intern. Med.* 22, 271-274.

Sherman, J.M. (1937). The Streptococci. *Bacteriol Rev.* 1, 3-97.

Shimomura, Y., Okumura, L., Murayama, S.Y., Yagi, J., Ubukata, K., Kirikae, T. e Miyoshi-Akiyama, T. (2011). Complete genome sequencing and analysis of a Lancefield group G *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* strain causing streptococcal toxic shock syndrome (STSS). *BMC Genomics.* 12, 17.

Silva, L. G. (2012). Determinação das espécies e susceptibilidade aos antimicrobianos em amostras de estreptococos do grupo C, de humanos e equinos, e análise da diversidade clonal de *Streptococcus dysgalactiae* subespécie *equisimilis*. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Microbiologia) – Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Silva, L.G., Genteluci, G.L., De Mattos, M.C., Glatthardt, T., Figueiredo, A.M.S. e Ferreira-Carvalho, B.T. (2015). Group C *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* in south-east Brazil: genetic diversity, resistance profile and the first report of human and equine isolates belonging to the same multilocus sequence typing lineage. *J Med Microbiol.* 64, 551–558.

Spencer, G. (2002). Background on mouse as a model organism. Disponível em: <<http://www.genome.gov/10005834>>. Acesso em 19/12/2015.

Stiernagle. (2006). Maintenance of *C. elegans*. *WormBook.* 11,1-11.

Sun, H., Xu, Y., Sitkiewicz, I., Ma, Y., Wang, X., Yestrepky, B.D., Huang, Y., Lapadatescu, M.C., Larsen, M.J., Larsen, S.D., Musser, J. M. e Ginsburg, D. (2012). Inhibitor of streptokinase gene expression improves survival after group A *Streptococcus* infection in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109, 3469–3474.

Sunaoshi, K., Murayama, S.Y., Adachi, K., Yagoshi, M., Katsuo, O., Chiba, N., Morozumi, M. e Ubukata, K. (2010). Molecular *emm* genotyping and antibiotic susceptibility of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* isolated from invasive and non-invasive infections. *J. Med. Microbiol.* 59, 82-88.

Takahashi, T., Ubukata, K.E, Watanabe, H. (2011). Invasive infection caused by *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*: characteristics of strains and clinical features. *J. Infect. Chemother.* 17, 1-10.

Tarone, G., Hirsch, E., Brancaccio, M., De Acetis, M., Barberis, L., Balzac, F., Retta, S.F., Botta, C., Altruda, F., Silengo, L. e Retta, F. (2000). Integrin function and regulation in development. *Int. J. Dev. Biol.* 44, 725-731.

Thompson, T.A. e Brown, P.D. (2017). Association between the *agr* locus and the presence of virulence genes and pathogenesis in *Staphylococcus aureus* using a *Caenorhabditis elegans* model. *Int J Infect Dis.* 54,72-76.

Tissenbaum, H.A. (2015). Using *C. elegans* for aging research. *Invertebr. Reprod. Dev.* 59, 59–63.

- Tran, A., Tang, A., O'Loughlin, C.T., Balistreri, A., Chang, E., Coto Villa, D., Li, J., Varshney, A., Jimenez, V., Pyle, J., Tsujimoto, B., Wellbrook, C., Vargas, C., Duong, A., Ali, N., Matthews, S.Y., Levinson, S., Woldemariam, S., Khuri, S., Bremer, M., Eggers, D.K., L'Etoile, N., Miller Conrad, L.C. e VanHoven, M.K. (2017). *C. elegans* avoids toxin-producing *Streptomyces* using a seven transmembrane domain chemosensory receptor. *Elife*. e23770.
- Traverso, F., Blanco, A., Villalón, P., Beratz, N., Sáez Nieto, J.A. e Lopardo, H. (2016). National Collaborative Group for the Study of Streptococci and Related Bacteria. Molecular characterization of invasive *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*. Multicenter study: Argentina 2011-2012. *Rev. Argent. Microbiol.* 48. 279-289.
- Turner, J.C., Hayden, F.G., Lobo, M.C., Ramirez, C.E. e Murren, D. (1997). Epidemiologic evidence for Lancefield group C beta-hemolytic streptococci as a cause of exudative pharyngitis in college students. *J. Clin. Microbiol.* 35, 1-4.
- Vandamme, T.F. (2014). Use of rodents as models of human diseases. *J. Pharm. Bioallied. Sci.* 6, 2-9.
- Vieira, V.V., Teixeira, L.M., Zahner, V., Momen, H., Fackalm, R.R., Steigerwalt, A.G., Brenner, D.J. e Castro, A.C.D. (1998). Genetic relationships among different phenotypes of *Streptococcus dysgalactiae* strains. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48, 1231-1243.
- Waller, A. S., Paillot R. e Timoney J. F. (2011). *Streptococcus equi*: a pathogen restricted to one host. *J Med Microbiol.* 60, 1231-1240.
- Wareham, D.W., Papakonstantinou, A. e Curtis, M.A. (2005). The *Pseudomonas aeruginosa* PA14 type III secretion system is expressed but not essential to virulence in the *Caenorhabditis elegans*-*P. aeruginosa* pathogenicity model. *FEMS Microbiol Lett.* 242, 209-216.
- Watanabe, N., Bandoh, S., Ishii, T., Negayama, K., Kadowaki, N. e Yokota K. (2017). Infective endocarditis and infected aneurysm caused by *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*: a case report. *Clin. Case Rep.* 5, 187-192.
- Watanabe, S., Takemoto, N., Ogura, K. e Miyoshi-Akiyama, T. (2016). Severe invasive streptococcal infections by *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*. *Microbiol. Immun.* 60, 1-9.
- Wu, K., Zhang, K., McClure, J., Zhang, J., Schrenzel, J., Francois, P., Harbarth, S. e Conly J. (2013). A correlative analysis of epidemiologic and molecular characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones from diverse geographic locations with virulence measured by a *Caenorhabditis elegans* host model. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1,33-42.
- Yin, J., Yu, S., Liu, X., Gao, W., Zhou, L., Ji, L., Shen, X. e Yang, Y. (2012). Molecular characterization of group G *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* recovered from patients and healthy people in China. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 72, 41-46.
- Zeppa, J.J., Wakabayashi, A.T., Kasper, K.J., Xu, S.X., Haeryfar, S.M. e McCormick, J.K. (2016). Nasopharyngeal infection of mice with *Streptococcus pyogenes* and in vivo detection of superantigen activity. *Methods Mol. Biol.* 1396, 95-107.