

ÚRSULA DOS SANTOS LOPEZ

ASPECTOS RELACIONADOS À VIRULÊNCIA DE CÉLULAS
DE *Streptococcus pyogenes* REFRATÁRIAS E NÃO
REFRATÁRIAS A PENICILINA



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/2019

Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Médica, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação da Professora Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho e coorientação da Dra. Caroline Lopes Martini.

FICHA CATALOGRÁFICA

L864a Lopez, Úrsula dos Santos
Aspectos relacionados à virulência de células de
Streptococcus pyogenes refratárias e não
refratárias a penicilina / Úrsula dos Santos Lopez.
-- Rio de Janeiro, 2019.
75 f.

Orientadora: Bernadete Teixeira Ferreira
Carvalho.

Coorientadora: Caroline Lopes Martini.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto
de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia, 2019.

1. Streptococcus pyogenes. 2. Persisters. 3.
Caenorhabditis elegans. 4. Expressão gênica. 5.
Virulência. I. Teixeira Ferreira Carvalho,
Bernadete, orient. II. Lopes Martini, Caroline,
coorient. III. Título.

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO
 NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO,
 BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E
 IMUNOLOGIA**

ALUNO: **Úrsula dos Santos Lopez**
 DRE: 116058088

BANCA EXAMINADORA: Profa. Tatiana de Castro Abreu Pinto (Presidente)
 Prof. Leonardo Rocchetto Coelho
 MSc. Isis Hazelman Vieira dos Anjos
 MSc. Alice Stotfeldt Viana (Suplente)

Título da Monografia: **“Aspectos relacionados à virulência de células de
Streptococcus pyogenes refratárias e não refratárias a penicilina”**

Local: **Sala de reunião do Departamento de Microbiologia Médica / IMPPG / CCS / UFRJ**
 Data e hora de início: **13 de dezembro de 2019 às 8:30h**

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 10,0 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou co-orientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 13 de dezembro de 2019.

NOTA
10,0

Banca Examinadora:
Tatiana de Castro Abreu Pinto
 Profa. Tatiana de Castro Abreu Pinto

10,0

Prof. Leonardo Rocchetto Coelho
Isis Hazelman Vieira dos Anjos
 MSc. Isis Hazelman Vieira dos Anjos

10,0

Alice S. Viana
 MSc. Alice Stotfeldt Viana

Aluno:

Úrsula dos S. Lopez
 Úrsula dos Santos Lopez

Orientador:

Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho
 Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

Coorientador:

Caroline Lopes Martini
 Dra. Caroline Lopes Martini

Coordenador
 de TCC

Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho
 Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais por simplesmente tudo. À minha mãe Andréa por desde cedo me ensinar o valor da educação, estar sempre presente, acreditar em mim independente da ocasião e me apoiar em todas as decisões que tomei. Ao meu pai Benito por toda batalha e suor derramado diariamente que permitiram diversas realizações. À minha irmã Isadora “Bitchchan” por ser meu principal pilar de apoio emocional familiar e amiga para todas as horas. Por sempre ouvir meus desabafos e pela atenção. Agradeço também aos meus tios, primos e meus avós por todo encorajamento ao longo dos anos. Eu amo vocês.

Aos meus amigos do Cafezinho: Alex “Lelex”, Adriele “Dri Dri” e Michel Leon “Xexéo”. Por todos os momentos singulares que passamos juntos. Pela torcida, pela alegria, pelo choro, pelo deboche. Os anos de graduação não seriam os mesmos sem vocês. Muito obrigada por toda contribuição, amor venenoso e altas aventuras. Vida longa à família Cafezinho. Agradeço à Thaís Tavares por ser minha sis. Por todas as longas conversas e desabafos. Por todos os sonhos e segredos compartilhados. Por todas as palavras sinceras que me deram suporte nos momentos que mais precisava. Coldplay que nos aguarde.

Aos amigos Lucas Magalhães, Ririane e Isabelle pelos momentos de amizade e carinho que foram tão importantes para meu bem-estar diário. À minha amiga Mari “Ogra” por todo o amor passivo e agressivo. Às calourinhas Marcelle, Laenne, Vitória, Raquel, Nathália, Jac, Lígia, Carol Garden e Bia Desconhecida por serem fundamentais para meu processo de autoconhecimento. Obrigada pela confiança depositada em mim. Peguei todas no colo e agora já são todas mocinhas. Muito orgulho.

À minha chefe Isis. Tenho nem palavras para descrever o quanto você foi importante para mim. Agradeço por todo o amor. Pela força. Por sempre recuperar minha confiança. Pelo colo em todos os momentos que eu queria chorar. Por me ensinar tudo. Ninguém jamais entenderá o amor de um bb por sua chefe. Agradeço à Larissa por ser uma das pessoas mais importantes durante esses anos. Por ser meu ponto de equilíbrio. Por me trazer tranquilidade e serenidade. Por sempre estar do meu lado. Obrigada por acreditar em mim e me dar esperanças quando estou perdida. O que significa cativar? Significa criar laços.

À minha orientadora Bernadete Carvalho por ser fundamental para a minha segurança e crescimento. Por ser um grande exemplo de professora e pesquisadora que irei levar comigo durante toda vida. Por todo conhecimento transmitido e dedicação. Sinto uma enorme

admiração por você e orgulho por ser sua aluna. Agradeço por toda confiança, conversa e bronca que foram tão importantes durante esses anos.

À minha coorientadora Frida Carol Martini. Primeiramente por ser uma grande amiga, mesmo tendo surtos de grosseria. Por todo esforço, confiança e ensinamentos. Por todas as ligações inesperadas e conversas inusitadas que sempre me deixam feliz. Por simplesmente ser você mesma e não precisar esconder isso em momento nenhum. “Seu trabalho é de virulência!”. Agradeço ao meu amigo Matheus Cortes, grande Gandalf de Caxias, mais conhecido como O descolado. Por ser um amigo para todas as horas. Por sempre ouvir todos os meus desabafos e me presentear com os mais sábios conselhos. Obrigada por ser meu melhor amigo no laboratório.

A todos os participantes do laboratório de Biologia Molecular de Bactérias. À professora Agnes Marie por toda aprendizagem e apoio. Aos técnicos: Marquito, amigo, ajudante de todas as horas e fechamento do bandeirão; Cicinha, por toda descontração e suporte sempre que precisei e também pelo característico “Diga, Úrsula!” e Raquel Neves, por todas as conversas bem humoradas, conselhos e caronas. Aos melhores pós-graduandos e doutores que conheço: Deborah Nascimento, a francesa que fica resfriada nos Alpes Suíços; Alice Viana, a biomed mais microbiologista de todas; Mariana Fernandes, a companheira de surtos e desesperos; Gabriela Viçosa, filósofa contemporânea; Victor Lima, o senhor “atira para todos os lados, menina!” e as mais inteligentes Cris Beltrame e Aninha Botelho. Aos companheiros de iniciação científica Yan e Laís. Agradeço também ao meu pai Bruno Scramignon, tão carinhoso e atencioso em todas as ocasiões, mesmo sendo ausente. Muito obrigada por tudo. Por todo suporte e por me receberem tão bem.

À Universidade Federal do Rio de Janeiro, ao Instituto de Microbiologia, seu corpo docente e administrativo. Agradeço também aos órgãos de fomento CNPq e FAPERJ pelo apoio financeiro.

“Há mais coisas no céu e terra, Horácio, do que foram sonhadas na sua filosofia.”

William Shakespeare

RESUMO

ÚRSULA DOS SANTOS LOPEZ

ASPECTOS RELACIONADOS À VIRULÊNCIA DE CÉLULAS DE *Streptococcus pyogenes* REFROTÁRIAS E NÃO REFROTÁRIAS A PENICILINA

Orientadora: Profa. Dra. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

Coorientadora: Dra. Caroline Lopes Martini

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.

Streptococcus pyogenes destaca-se por sua capacidade de promover várias infecções humanas que vão desde infecções mais brandas (como faringite) até invasivas e letais (como fascite necrosante), além de sequelas pós estreptocócicas. Apesar de serem universalmente sensíveis à penicilina, a literatura relata casos de persistência, gerando infecções recalcitrantes. Em outros gêneros bacterianos esse fenótipo de persistência é conhecido como células refratárias a antibióticos (*persisters*) que atuam no estabelecimento das infecções recorrentes. Em *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, por exemplo, foi reportado que células persistentes demonstram baixa virulência comparados à forma planctônica. Em estudo anterior de nosso grupo foi relatado que *S. pyogenes* são também capazes de formar células refratárias a antimicrobianos em situação de elevada densidade populacional, porém ainda não há relatos do potencial de virulência destas células *persisters* em relação as sensíveis. Assim, este trabalho teve por objetivo comparar o potencial de virulência de células de *S. pyogenes* refratárias a penicilina (R-PN), induzidas por alta densidade populacional (ADP; $\geq 10^{10}$ UFC/mL), com o encontrado em células não refratárias (NR-PN; obtidas a partir de baixa densidade populacional; BDP; 10^7 UFC/mL). Nesses estudos foram utilizados um modelo de sobrevivência de *Caenorhabditis elegans*, a análise da expressão de genes envolvidos com o estresse oxidativo e outros genes de virulência, e um ensaio de fagocitose frente a monócitos da linhagem THP-1. Os resultados obtidos nos ensaios de sobrevivência demonstraram que os nematoides que estavam em contato com as células R-PN apresentaram um índice de 51,7% de sobrevivência. No entanto, nos animais expostos as células NR-PN esse índice foi de 79,5%. Análises morfológicas por microscopia óptica de contraste de interferência diferencial evidenciaram maior número de alterações em *C. elegans* promovidas por células refratárias, como presença de eclosão interna (R-PN:100%; NR-PN: 26,67%) e alterações morfológicas (R-PN: 43,3%; NR-PN: 6,67%). Transcritos de 9 genes relacionados com a virulência foram medidos através de RT-qPCR usando RNA total obtido de células R-PN e NR-PN de *S. pyogenes*, em experimentos *in vitro* e *in vivo* (após interação com o nematoide *C. elegans*). Esses genes foram: *mga* (regulador positivo de virulência), *inlA* (internalina), *ska* (estreptoquinase), *lmb* (proteína ligadora de laminina), *scpA* (C5a peptidase), *slo* (estreptolisina), *fbp* (proteína ligadora de laminina), *emm* (proteína M), *speA* (superantígeno A) e *speB* (exotoxina B). Os genes relacionados com o estresse oxidativo testados foram: *nox* (NADH oxidase formadora de H₂O), *sodA* (superóxido desmutase) e *perR*

(proteína reguladora da captura do ferro). Nos ensaios *in vivo*, o gene *perR* evidenciou um aumento de 3,2x na sua expressão, enquanto que *sodA* e *nox* foram reduzidos. Os resultados gerados nos ensaios *in vitro* de expressão de genes relacionados com virulência demonstram que os genes *scpA*, *MGAS10750_Spy1285* e *speA* apresentaram um aumento significativo de expressão. Enquanto que nos ensaios *in vivo* os genes codificantes para *slo*, *ska* e *scpA* apresentaram aumento na expressão em células R-PN (2,7x; 4,7x e 2,2x, respectivamente) corroborando com os achados do experimento de sobrevivência. Além disso, uma superexpressão foi observada para o gene *speB* (374x). Os ensaios preliminares de fagocitose e viabilidade bacteriana demonstraram que as células R-PN são menos fagocitadas mas morrem mais no interior do monócito quando comparada com as células NR-PN. Os resultados sugerem que o perfil de virulência no modelo de *C. elegans* e os níveis transcricionais de genes de virulência destacam o potencial de infecção de células refratárias de *S. pyogenes*.

Palavras-chave: 1. *Streptococcus pyogenes*; 2. *Persisters*; 3. *Caenorhabditis elegans*; 4. Expressão gênica; 5. Virulência; 6. Fagocitose

ABSTRACT

ÚRSULA DOS SANTOS LOPEZ

ASPECTOS RELACIONADOS À VIRULÊNCIA DE CÉLULAS DE *Streptococcus pyogenes* REFRATÁRIAS E NÃO REFRATÁRIAS A PENICILINA

Orientadora: Dra. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

Coorientadora: Dra. Caroline Lopes Martini

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.

Streptococcus pyogenes stands out for its ability to promote various human infections ranging from milder infections (such as pharyngitis) to invasive and lethal (such as necrotizing fasciitis), and post-streptococcal sequelae. Despite being universally sensitive to penicillin, the literature reports cases of persistence, generating recalcitrant infections. In other bacterial genera, this phenotype of persistence is known as antibiotic refractory cells (persisters) that act in the establishment of recurrent infections. In *E. coli*, *S. aureus* and *P. aeruginosa*, for example, it has been reported that persistent cells show low virulence compared to planktonic form. In a previous study of our group it was reported that *S. pyogenes* are also capable of forming antimicrobial-refractory cells in a situation of high population density, but there are still no reports of the potential of virulence of these persister cells in relation to the sensitive ones. Thus, this study aimed to compare the virulence potential of *S. pyogenes* cells refractory to penicillin (R-PN), induced by high population density (ADP; $>10^{10}$ CFU/mL), with that found in non-refractory cells (NR-PN; obtained from low population density; BDP; 10^7 CFU/mL). In these studies, a survival model of *Caenorhabditis elegans*, the analysis of gene expression involved with oxidative stress and other virulence genes, and a phagocytosis assay against THP-1 monocytes were used. The results obtained in the survival assays showed that the nematode that were in contact with the R-PN cells presented an index of 51.7% of survival. However, in animals exposed to the NR-PN cells had a survival rate of 79.5%. Morphological analysis by differential interference contrast optical microscopy showed a higher number of changes in *C. elegans* promoted by refractory cells, such as the presence of internal hatching (R-PN: 100%; NR-PN: 26.67%) and morphological changes (R-PN: 43.3%; NR-PN: 6.67%). Transcripts of 9 genes related to virulence were measured through qRT-PCR using total RNA obtained from R-PN and NR-PN cells of *S. pyogenes*, in *in vitro* and *in vivo* experiments (after interaction with the *C. elegans* nematode). These genes were: *mga* (positive virulence regulator), *inlA* (internalin), *ska* (streptokinase), *lmb* (laminine binding protein), *scpA* (C5a peptidase), *slo* (streptolysin), *fbp* (laminin binding protein), *emm* (protein M), *speA* (superantigen A) and *speB* (exotoxin B). The oxidative stress related genes tested were: *nox* (NADH oxidase forming

H₂O), *sodA* (superoxide desmutase) and *perR* (iron capture regulatory protein). In *in vivo* assays, the *perR* gene showed a 3.2x increase in expression, while *sodA* and *nox* were reduced. Results generated in *in vitro* gene expression assays related to virulence demonstrate that *scpA*, *MGAS10750_Spy1285* and *speA* genes showed a significant increase in expression. While in the *in vivo* assays the genes encoding for *slo*, *ska* and *scpA* showed increased expression in R-PN cells (2.7x, 4.7x and 2.2x, respectively) corroborating the findings of the survival experiment. In addition, an overexpression was observed for the *speB* gene (374x). Preliminary phagocytosis and bacterial viability tests demonstrated that R-PN cells are less phagocytosed but die more inside the monocyte when compared to NR-PN cells. The results suggest that the virulence profile in the *C. elegans* model and the transcriptional levels of virulence genes highlight the potential for infection of *S. pyogenes* refractory cells.

Key-words: 1. *Streptococcus pyogenes*; 2. Persisters; 3. *Caenorhabditis elegans*; 4. Gene expression; 5. Virulence; 6. Phagocytosis

ÍNDICE

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 <i>Streptococcus</i> spp.....	1
1.2 <i>Streptococcus pyogenes</i>	2
1.3 Fatores de virulência	4
1.4 Tratamento e falhas terapêuticas	7
1.5 Células persistentes e tolerância aos antimicrobianos	8
1.6 Modelos animais de estudo para infecções bacterianas	10
1.7 <i>Caenorhabditis elegans</i> como modelo animal	12
2. JUSTIFICATIVA.....	16
3. OBJETIVOS	18
4. MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1 Amostra bacteriana.....	19
4.2 Antimicrobianos.....	20
4.3 Preparo de células de <i>S. pyogenes</i> refratárias à penicilina.....	20
4.3.1 Preparação de células de <i>S. pyogenes</i> em fase log nas concentrações de 10 ⁷ UFC/mL e 10 ¹⁰ UFC/mL.....	20
4.3.2 Obtenção de células de <i>S. pyogenes</i> refratárias à penicilina e não refratárias.....	21
4.4 <i>Caenorhabditis elegans</i>	21
4.4.1 Cultivo e manutenção de <i>Caenorhabditis elegans</i>	21
4.4.2 Obtenção de <i>C. elegans</i> em estágio larval L4.....	22
4.5 Microscopia de fluorescência.....	22
4.6 Teste de sobrevivência.....	23
4.7 Microscopia ótica de Contraste Interferencial-Diferencial (CID).....	24
4.8 Quantificação de células R-PN e NR-PN dentro de <i>C. elegans</i>	24
4.9 Estudo da expressão de gênica.....	25
4.9.1 Preparo de células de <i>S. pyogenes</i> crescidas <i>in vitro</i> para extração de RNA.....	25
4.9.2 Preparo de células de <i>S. pyogenes</i> , após interação com <i>C. elegans</i> , para extração de RNA.....	26
4.9.3 Extração de RNA.....	26

4.9.4	Desenho de <i>primers</i> que serão utilizados durante a técnica de Real Time-qPCR (<i>Quantitative reverse transcription PCR</i>).....	27
4.9.5	RT-qPCR.....	28
4.10	Experimentos de fagocitose.....	28
4.10.1	Preparação da cultura de monócitos THP-1.....	28
4.10.2	Ensaio de fagocitose.....	29
5.	RESULTADOS.....	31
5.1	Microscopia de fluorescência.....	31
5.2	Teste de sobrevivência.....	31
5.3	Microscopia ótica de Contraste Interferencial-Diferencial (CID).....	33
5.4	Quantificação de células R-PN e NR-PN dentro de <i>C. elegans</i>	36
5.5	Comparação de expressão gênica <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	37
5.6	Fagocitose.....	42
6.	DISCUSSÃO.....	46
7.	CONCLUSÕES.....	54
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Streptococcus spp.*

As bactérias pertencentes ao gênero *Streptococcus* foram observadas e registradas pela primeira vez no final do século XVII pelo cientista holandês Anton van Leeuwenhoek. A partir do material recolhido da sua própria cavidade oral, o holandês desenhou as imagens que observou ao utilizar um microscópio por ele construído. Porém, esse gênero só ganhou notoriedade médica duzentos anos depois com os estudos de Louis Pasteur a respeito da febre puerperal, a qual ocasionava um elevado índice de mortalidade nas maternidades. Pasteur identificou *Streptococcus* provenientes da coleta de material das mulheres enfermas. Assim, essas bactérias foram um dos primeiros microrganismos associados com doenças contagiosas e esse fato foi impulsionador para que Pasteur adotasse práticas de higiene e assepsia em ambientes hospitalares (Nobbs, Lamont e Jenkinson, 2009).

Streptococcus é uma palavra de origem grega, em que *strepto* significa torcido e *coccus*, esférico. Esse gênero engloba espécies gram-positivas que apresentam morfologia arredondada em forma de cocos, agrupando-se em duplas ou em cadeias. São anaeróbios facultativos, porém certas espécies desenvolvem-se somente com grandes concentrações de dióxido de carbono no ambiente (Facklam, 2002; Nobbs, Lamont e Jenkinson, 2009). Os isolados de estreptococos são catalase e oxidase negativos, não apresentam mobilidade, além disso são fastidiosos, e portanto necessitam do enriquecimento com sangue ou soro em seu meio de cultura (Griffith, 1934; Facklam, 2002)

Dentro desse gênero foram classificadas 129 espécies e 23 subespécies (Euzéby, 2019), as quais necessitam de diferentes estratégias para serem diferenciadas com exatidão. Inicialmente, a classificação se dava somente através da observação do padrão hemolítico em placas de ágar contendo sangue (Shottmuller, 1903 *apud* Ruediger, 1906). Assim, foram chamados de beta-hemolíticos, aqueles que geravam uma hemólise total; alfa-hemolíticos, os que geravam hemólise parcial (esverdeada), e gama-hemolíticos, os que não geravam hemólise (Yoshino *et al.*, 2010). Porém, a observação da hemólise sozinha não fornece resultados expressivos. Por isso, um método de identificação adicional foi proposto por Rebecca Lancefield no início da década de 30, o qual se baseava na análise química do carboidrato C. Este trata-se de um polissacarídeo grupo-específico localizado na parede celular de muitas

amostras de estreptococos. A classificação baseada neste sistema diferencia os estreptococos em grupos sorológicos de A-H e K-V (Lancefield, 1933).

Apesar da metodologia desenvolvida por Lancefield agrupar muitas espécies de *Streptococcus*, para algumas outras, essa classificação não era possível. Diante deste desafio, Sherman apresentou uma junção de técnicas capaz de englobar todas as bactérias do gênero *Streptococcus* conhecidas na época. O autor dividiu as espécies em quatro grupos: Piogênicos, Viridans, Láticos e Enterococos. Os grupos foram separados a partir de diferenças em relação ao metabolismo bioquímico, hemólise gerada, temperatura de crescimento e grupagem de Lancefield (Sherman, 1937).

Em adição, algumas espécies desse gênero também podem ser classificadas por meio da tipagem do gene *emm*. Para tal, é realizada a análise do sequenciamento dos últimos 180 nucleotídeos do gene *emm*, codificador da proteína M, uma vez que sua fração N-terminal consiste em uma sequência de aminoácidos altamente variáveis. O sequenciamento obtido é enviado ao *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) para que uma comparação seja realizada a partir do banco de dados disponível (CDC *Streptococcus* Laboratory, acessado em 01/05/2019 <https://www.cdc.gov/streplab/groupa-strep/emm-background.html>). Essa proteína é formada por duas cadeias polipeptídicas que se encontram complexadas em uma configuração de alfa-hélice, está ancorada à membrana e se estende atravessando pela parede até a superfície celular.

1.2 *Streptococcus pyogenes*

Streptococcus pyogenes destaca-se dentre as espécies de *Streptococcus* pelo seu potencial em causar infecções humanas e em animais. Essa espécie apresenta o carboidrato C composto de N-acetilglicosamina ligada a um esqueleto central de polímeros de ramnose, sendo classificada como grupo A de Lancefield (Cunningham, 2000). Estreptococos do grupo A (EGA) são caracterizados pela formação de beta-hemólise em placas de agar sangue; suscetibilidade frente à 0,04U de bacitracina, produção de pirolidonilarilamidase (PYR), resultados negativos no teste do fator CAMP, no teste de Voges-Proskauer, no teste da hidrólise de hipurato de sódio, dentre outros (Facklam, 2002).

Os primeiros relatos de *S. pyogenes* como agente causal de infecção ocorreram no final do século XIX quando Rosenbach nomeou a bactéria depois de ter feito seu isolamento de lesões supurativas (Rosenbach, 1884 *apud* Evans, 1936). Somente na década de 1930, o nome *Streptococcus pyogenes* foi designado para os estreptococos beta-hemolíticos, sendo incluídos nessa espécie cepas isoladas de erisipela e de escarlatina, que antes eram associadas a patógenos nomeados como *Streptococcus erysipelatis* e *Micrococcus scarlatinae*, respectivamente (Klein, 1887 *apud* Evans 1936; Arloing, 1892 *apud* Evans 1936).

Bactérias da espécie *Streptococcus pyogenes* receberam este nome devido ao fato de provocarem uma série de manifestações que ocasionam a formação de pus, porém elas são responsáveis por infecções que vão além das supurativas (Roberts *et al.*, 2012). As infecções podem expressar-se tanto de forma mais moderada (faringite e impetigo) quanto de maneira mais invasiva (celulite, escarlatina, bacteremia, pneumonia, síndrome do choque tóxico estreptocócico, fascíte necrotizante e endocardite). Além dessas, ainda há a possibilidade do surgimento de sequelas pós-estreptocócicas imunomediadas, que incluem febre reumática aguda, glomerulonefrite pós-infecciosa e desordens neuropsiquiátricas pediátricas (PANDAS) (Carapetis *et al.*, 2005; Walker *et al.*, 2014).

Os estudos epidemiológicos envolvendo as infecções provocadas por *S. pyogenes* apresentam uma limitação proveniente da escassez de informações devido à pouca adesão de projetos de vigilância, principalmente em países em desenvolvimento (Carapetis *et al.*, 2005). O foco das notificações é voltado para as doenças invasivas provocadas pela bactéria (Steer *et al.*, 2012), e a partir da década de 1980, foi observado um aumento no relato de infecções invasivas por *S. pyogenes* nos Estados Unidos e em alguns países da Europa, no Japão e na Austrália (Grady *et al.*, 2007; Luca-Harari *et al.*, 2009; Watanabe *et al.*, 2016). Dados de 2005 estimavam que cerca de meio milhão de pessoas morrem anualmente devido às doenças invasivas e sequelas pós-estreptocócicas por *S. pyogenes* (Carapetis *et al.*, 2005). Relatos de 2017 apontam que cerca de 300.000 mortes ocorrem devido à doença reumática cardíaca, sendo uma maior prevalência encontrada na Oceania, Sul da Ásia e África Subsaariana central (Watkins *et al.*, 2017). Em 2019, foi publicado um estudo feito a partir de coletas provenientes de crianças na Croácia, que revelou uma maior taxa de colonização na orofaringe por *S. pyogenes* (40%) em comparação com outras espécies como *Streptococcus pneumoniae* (27%) e *Haemophilus influenzae* (17%) (Kostic *et al.*, 2019).

1.3 Fatores de virulência

Uma vez que *S. pyogenes* é um patógeno altamente adaptado ao hospedeiro, é vital que possua inúmeros fatores de virulência e determinantes genéticos que possibilitam sua sobrevivência. Essa bactéria apresenta um repertório de moléculas expostas na superfície celular e secretadas para o meio extracelular que são importantes durante os processos de adesão e colonização, patogênese e disseminação (Cunningham, 2000; Barnett *et al.*, 2015).

A aderência inicial da célula bacteriana demanda uma variedade de ligantes estreptocócicos localizados na superfície que se ligam à receptores específicos presentes na célula hospedeira. As células bacterianas não conseguem se fixar inicialmente às células epiteliais dérmicas ou da faringe sem mecanismos capazes de promover sua forte ligação e estabilidade, levando em consideração barreiras do hospedeiro, como a saliva, mucosa e esfoliação das camadas do epitélio (Cunningham, 2000).

A proteína M é um dos principais fatores de virulência de *S. pyogenes* e pode atuar tanto na adesão quanto na evasão. A fração C-terminal da proteína é conservada entre as cepas, já a fração N-terminal, que é exposta na superfície, apresenta uma região hipervariável (Fischetti, 1989; Walker *et al.*, 2014). Em 1972, um estudo demonstrou que os estreptococos que apresentavam proteína M tinham uma maior capacidade de aderência à células epiteliais em comparação aos mutantes que não apresentavam a proteína (Ellen e Gibbons, 1972). Em 1994, Okada e colaboradores demonstraram que está proteína é responsável pela adesão da bactéria a queratinócitos (Okada *et al.*, 1994). A proteína M também viabiliza proteção contra a fagocitose. As espécies que possuem essa proteína são mais resistentes à opsonização, pois essa proteína se liga à moléculas componentes e reguladoras do sistema complemento, como o fator H, fator H-like e a proteína de ligação C4b (Metzgar e Zampolli, 2011). Além disso, a proteína M é capaz de se ligar ao fibrinogênio das células humanas e isso impede a ligação de C3b à bactéria. Logo, a ação do sistema complemento é bloqueada, resultando na redução da fagocitose por leucócitos polimorfonucleares (Horstmann *et al.*, 1992; Carlsson, Sandin e Lindahl, 2005).

Existem outras moléculas incluídas no processo de adesão, tais como: o ácido lipoteicóico (LTA), o qual, além de ter uma importante função como adesina também contribui para a hidrofobicidade da parede celular de bactérias gram-positivas (Courtney *et al.*, 2009); as proteínas *M-like*, que são similares à proteína M, porém diferem-se nos tipos de repetições que constituem a molécula (Bessen, 1994); a proteína ligadora de fibronectina, a gliceraldeído-3-

fosfato desidrogenase, a proteína F e a proteína ligadora de laminina (Nobbs, Lamont e Jenkinson, 2009; Laabei e Ermert, 2018). Apesar do pili ser um fator de virulência característico de muitos patógenos Gram-negativos, *S. pyogenes* possui pilus compostos por membros de uma família de proteínas de ligação à matriz extracelular (Mora *et al.*, 2005). O pili de *S. pyogenes* promove a aderência aos tecidos das amígdalas e aos queratinócitos de células humanas, além disso, colaboram na formação de biofilme e na evasão do sistema imune (Nakata *et al.*, 2019).

Essa bactéria apresenta uma cápsula constituída de ácido hialurônico que também consiste em um importante fator de virulência (Dale *et al.*, 1996). Em 2000, foi publicado um estudo que demonstrou que a cápsula promove a aderência ao receptor CD44 presente em células epiteliais da orofaringe (Cywes, Stamenkovic e Wessels, 2000). Esse fator de virulência também é capaz de promover resistência à fagocitose e interferir na ação do sistema complemento (Dale *et al.*, 1996). Além disso, a cápsula de ácido hialurônico é importante para a formação do biofilme, pois é necessária para a manutenção da estrutura tridimensional (Cho e Caparon, 2005).

A espécie *S. pyogenes* é um patógeno bem adaptado ao ser humano, diante disso apresenta uma série de fatores de virulência que desorganizam o sistema imune do hospedeiro. Esses fatores podem ser secretados ou fixados à superfície celular da bactéria e possibilitam maior resistência frente à fagocitose, à ação do sistema complemento, à opsonização e à ação de neutrófilos (Walker *et al.*, 2014). A estreptoquinase é uma proteína secretada por estreptococos dos grupos A, C e G, cuja atividade é converter enzimaticamente plasminogênio em plasmina. No sítio de infecção, a plasmina é capaz de ativar metaloproteinases da matriz, além de degradar a matriz extracelular e barreiras teciduais do hospedeiro, facilitando a propagação da bactéria para outros locais do corpo (Cook *et al.*, 2012). A cisteína-protease, assim como a estreptoquinase, também é uma enzima com atividade proteolítica capaz de degradar imunoglobulinas e componentes do sistema complemento (Nelson, Garbe e Collin, 2011). A C5a peptidase é uma enzima proteolítica ancorada à parede celular, que cliva o componente C5a do sistema complemento no seu local de ligação, e desta forma inibe o recrutamento de células fagocíticas para o local da infecção (Yinduo *et al.*, 1996).

Dentre os fatores de virulência de *S. pyogenes*, destaca-se o grupo dos superantígenos (SAgs). Em divergência com os antígenos tradicionais, os superantígenos realizam ligações cruzadas, não específicas entre o domínio variável N-terminal da cadeia β do receptor de células T e a molécula do MHC de classe II, sem o processamento prévio feito pela célula apresentadora de antígeno (Reglinski e Sriskandan, 2014). Assim, haverá a liberação de quantidades

abundantes de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-beta (IL-1 β), IL-2, IL-6 e interferon γ , que podem estar diretamente relacionadas com a síndrome do choque tóxico estreptocócico e a fascite necrotizante (Norrby-Teglund *et al.*, 2000). Em *S. pyogenes* vários superantígenos foram identificados, tais quais: as exotoxinas pirogênicas estreptocócicas (SpeA, SpeC e SpeG até SpeM), o superantígeno estreptocócico (SSA) e a exotoxina mitogênica estreptocócica Z (SmeZ) (Proft e Fraser, 2003).

Uma das características mais marcantes de *S. pyogenes* é a formação de uma zona hemolítica quando semeados em meio suplementado com sangue e isso se deve à ação de hemolisinas que a bactéria secreta. A estreptolisina O (SLO) é uma citolisina dependente de colesterol, imunogênica, sensível à presença de oxigênio, secretada durante as fases exponencial e estacionária de crescimento bacteriano. Essa exotoxina afeta a estabilidade da membrana plasmática de diversas células eucarióticas, como eritrócitos, leucócitos, macrófagos e células epiteliais (Hynes, 2004). Em 2009, Cortés e Wessels (Cortés e Wessels, 2009) publicaram um estudo que associa a produção de SLO com a inibição da maturação de células dendríticas. Além disso, a SLO juntamente com a presença da toxina NADase, têm a capacidade de impedir a acidificação do fagolisossomo em macrófagos, permitindo assim, a sobrevivência da bactéria dentro dessas células (Bastiat-Sempe *et al.*, 2014). A estreptolisina S (SLS) é uma toxina não-imunogênica, estável à frente de oxigênio. A atividade da SLS depende da temperatura e é responsável pela β -hemólise de *S. pyogenes* em torno da colônia em placas de ágar sangue. Assim como a SLO, a SLS tem atividade citolítica frente a eritrócitos, leucócitos, plaquetas e algumas organelas, como por exemplo, mitocôndrias e lisossomas (Barnett *et al.*, 2015).

Outro fator de virulência da espécie é a capacidade de formação de biofilme. O biofilme é caracterizado como uma complexa comunidade de células bacterianas. A formação de biofilme é um processo dinâmico, desencadeado por pressões ambientais que levam a mudanças na expressão gênica (Kostakioti, Hadjifrangiskou e Hultgren, 2013). Isso resulta em uma reorganização do arranjo espacial e temporal das células bacterianas, levando a uma transição do fenótipo planctônico para um biofilme (Vyas *et al.*, 2019). A formação e o desenvolvimento de biofilmes são simplificados em quatro estágios: fixação bacteriana reversível; ligação bacteriana irreversível; maturação do biofilme e dispersão do biofilme (Kostakioti, Hadjifrangiskou e Hultgren, 2013). Além de superfícies orgânicas, os biofilmes podem ser formados em superfícies abióticas como cateteres e implantes (Ellen, Lépine e Nghiem, 1997; Cho e Caparon, 2005). O biofilme formado exerce uma função de proteção, possibilitando a

sobrevivência e proliferação de bactérias em ambientes hostis. Inclusive, é atribuído ao biofilme uma das causas possíveis para resistência aos antimicrobianos, uma vez que dentro dessa comunidade as bactérias podem ser cerca de mil vezes mais resistentes em comparação às células planctônicas (Hoyle e Costerton, 1991; Ogawa *et al.*, 2011). Em *S. pyogenes*, diferentes fatores de virulência parecem estar envolvidos nos estágios do desenvolvimento do fenótipo de biofilme. Entre estes a proteína M, a cápsula de ácido hialurônico e a SpeB (Vyas *et al.*, 2019).

1.4 Tratamento e falhas terapêuticas

Mesmo com a atual temática da resistência aos antimicrobianos, *S. pyogenes* permanece suscetível à maioria dos antibióticos, incluindo a penicilina. Apesar desse β -lactâmico ser a primeira opção de escolha para o tratamento das infecções provocadas por *S. pyogenes*, a suscetibilidade à penicilina não se alterou ao longo dos anos (Laabei e Ermert, 2018). Em relação ao tratamento, utiliza-se penicilina V administrada por via oral, penicilina G por injeção intramuscular ou por via parenteral, e amoxicilina ou antimicrobianos da classe das cefalosporinas, tais como cefalexina, cefotaxima e ceftriaxona (Bonofiglio *et al.*, 2018). Com a finalidade de tratar pacientes com individualidades restritas, utiliza-se a classe dos macrolídeos como primeira opção ou lincosamidas. Para pacientes enfermos devido as manifestações mais graves como fascíte necrotizante e síndrome do choque tóxico estreptocócico, recomenda-se a administração de clindamicina (Bonofiglio *et al.*, 2018).

A resistência à classe dos β -lactâmicos, entretanto, já foi relatada em outros cocos gram-positivos como *Streptococcus pneumoniae* e *Staphylococcus* (Walker *et al.*, 2014). Essa resistência é viabilizada devido às mutações que geram mudanças na conformação de proteínas de ligação à penicilina (PBP) (Chambers, 1999). A PBP é uma enzima que catalisa a reação de transpeptidação que forma o peptidoglicano, componente vital da parede celular bacteriana. Portanto, mutações nas PBPs impedem a ação de β -lactâmicos, já que o alvo da droga é modificado (Chambers, 1999).

Apesar dos *S. pyogenes* apresentarem universal suscetibilidade à penicilina *in vitro*, existe o relato de um crescente número de falhas no tratamento utilizando esse β -lactâmico. De 1950 até 2000, a taxa de falha terapêutica aumentou de aproximadamente 7% até 40% (Casey e Pichichero, 2007). Em virtude desses dados alarmantes, foram especulados diversos motivos para explicar essas falhas, como: a capacidade de invasão do *S. pyogenes* à células epiteliais nas quais não ocorre a penetração da penicilina; interação entre *S. pyogenes* e outras bactérias

presentes no ambiente, as quais secretam β -lactamases e impedem a ação da droga no *S. pyogenes*; dose, duração da terapia ou escolha do antimicrobiano inadequado; resistência ou tolerância; e a formação de biofilme, já que após tratamentos com altas concentrações de antibióticos, *S. pyogenes* conseguem sobreviver quando em biofilme (Brook, 2007; Ogawa *et al.*, 2011).

1.5 Células persistentes e tolerância aos antimicrobianos

Quando há a utilização de algum antibiótico, por mais que uma bactéria seja suscetível, as populações bacterianas podem abrigar um pequeno número de células tolerantes à atividade letal do antibiótico. Essa fração corresponde as chamadas bactérias persistentes, as quais são geneticamente idênticas em relação ao restante da amostra, entretanto diferem em seu fenótipo de tolerância (Wilmaerts *et al.*, 2019). Logo, *persisters* são descritos como células dormentes, que na presença de antimicrobianos não crescem, nem morrem. A recalcitrância junto com a capacidade de reiniciar o crescimento bacteriano após a terapia, podem resultar no fracasso do tratamento com antibióticos (Harms, Maisonneuve e Gerdes, 2016).

O primeiro relato desse fenótipo de persistência ocorreu na década de 1940, quando o médico Joseph Bigger (Bigger, 1944) trabalhava testando o uso de penicilina em bactérias do gênero *Staphylococcus*. O pesquisador notou que haviam colônias sobreviventes e as nomeou como *persisters* para diferenciá-las de mutantes resistentes. Alguns anos depois, Bigger repetiu o experimento utilizando *Escherichia coli* e chegou ao mesmo resultado que o anterior. Porém, a resistência à penicilina foi atribuída à capacidade de produção de β -lactamases pelos patógenos. Com o passar dos anos, o estudo acerca da descoberta de novas drogas tornou-se de vital importância. Assim, o caso de tolerância das células persistentes foi prontamente esquecido (Lewis, 2010).

Células persistentes já foram relatadas em espécies como *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella enterica* e *Candida albicans*. Além disso, há diversas evidências que mostram a relação entre o fenótipo de persistência e a falha terapêutica para esses patógenos (Dhar e McKinney, 2010; LaFleur, Qi e Lewis, 2010; Mulcahy *et al.*, 2010; Conlon, 2014; Goneau *et al.*, 2014; Drescher *et al.*, 2019). Diferentemente dos fenômenos de resistência, a persistência frente a antibióticos é um fenótipo reversível e não herdado (Lewis, 2010). Após a realização de um tratamento com antimicrobianos, *persisters* retomam o crescimento e originam novas populações tão sensíveis

aos antibióticos quanto a população ancestral (Stepanyan *et al.*, 2015). Um elemento chave desse fenótipo é sua relação com a taxa de replicação. *Persisters* apresentam uma taxa de crescimento mais lenta ou não apresentam replicação, em alguns casos. Portanto, são caracterizados por apresentarem uma menor taxa metabólica, tornando-os menos sensíveis à ação de antimicrobianos (Grant e Hung, 2013). No entanto, essas células são capazes de resgatar seu crescimento quando a condição que gerou o estresse é retirada (Wilmaerts *et al.*, 2019). Ademais, *persisters* são mais isolados frequentemente entre a metade da fase logarítmica até a fase estacionária do crescimento celular bacteriano (Keren *et al.*, 2004).

A literatura aponta que a frequência de aparecimento de *persisters* em populações bacterianas planctônicas é de apenas uma em um milhão, entretanto em culturas estacionárias e biofilmes, a frequência aumenta substancialmente, para até um em cem células (Page e Peti, 2016). A formação de células *persisters* é impulsionada por mecanismos aleatórios e responsivos, possibilitando que a bactéria seja capaz de responder rapidamente quando as condições são adversas e prejudiciais, tais como: estresse oxidativo, escassez de nutrientes, hipóxia, além da adição de concentrações subinibitórias de antibióticos (Goneau *et al.*, 2014; Harms, Maisonneuve e Gerdes, 2016).

Diversos fatores biológicos são citados como responsáveis pela indução ao fenótipo de persistência. Entretanto, não há na literatura um mecanismo específico de formação de *persisters* (Zalis *et al.*, 2019). Um mecanismo bastante associado à geração de *persisters* é o sistema Toxina/Antitoxina (TA) descrito em *E. coli*, que é composto por uma toxina, a qual inibe um processo celular vital, e uma antitoxina instável que neutraliza a atividade da toxina durante as condições normais de crescimento. Entretanto, em condições adversas a antitoxina é degradada e a toxina exerce seus efeitos, que resultam na parada do crescimento e na dormência celular (Page e Peti, 2016). Os genes do sistema TA são abundantes em plasmídeos e cromossomos, além disso podem ser mais ativos por respostas de estresse através da via de guanosina tetrafosfato (ppGpp) (Gotfredsen e Gerdes, 1998; Page e Peti, 2016).

Além disso, outros mecanismos que proporcionam estresse oxidativo estão relacionados com a formação de *persisters*, tal qual a resposta SOS (Wilmaerts *et al.*, 2019). Estudos com *E. coli* demonstraram que a resposta SOS é responsável por induzir uma série de genes relacionados com o sistema TA (Singletary *et al.*, 2009). Em 2010, Dörr, Luvic e Lewis mostraram que os componentes da resposta SOS induzem a formação de *persisters* de *E. coli* após exposição a um antimicrobiano da classe das fluoroquinolonas, que agem em enzimas essenciais para a replicação do DNA bacteriano. Os autores fizeram um experimento com

amostras nocautes para TisB. Essa toxina é um peptídeo de membrana induzido pela resposta SOS, pode estar envolvido na formação de células persistentes ao diminuir a força próton-motriz e os níveis de ATP. Os resultados sugerem que essa toxina induzida por dano no DNA associada a resposta SOS fornece um modelo de formação de *persisters* (Dörr, Vulić e Lewis, 2010).

O mecanismo de bombas de efluxo também pode ser um dos responsáveis pela formação de *persisters* (Grant e Hung, 2013). A expressão de bombas de efluxo proporciona uma diminuição na concentração intracelular de antimicrobianos e embora seja um mecanismo de resistência bem conhecido, o papel das bombas de efluxo na formação do fenótipo de persistência ainda não é bem estabelecido (Wilmaerts *et al.*, 2019).

Embora seja reconhecido que *persisters* desempenham um papel importante nas infecções crônicas e recorrentes (Fauvart, de Groote e Michiels, 2011) pouco se sabe sobre a virulência de células persistentes e sua capacidade de infectar e matar um hospedeiro. Em 2016, Mina e Marques realizaram um estudo de virulência em *persisters* de *S. aureus*, empregando modelos de infecção *in vivo* que utilizavam a planta *Arabidopsis thaliana* e o nematoide *Caenorhabditis elegans* e demonstram um menor potencial de virulência desse fenótipo (Mina e Marques, 2016).

1.6 Modelos animais de estudo para infecções bacterianas

No final do século XIX, Robert Koch foi um dos primeiros pesquisadores a estabelecer um modelo animal em estudos a respeito da patogênese bacteriana para simular uma doença humana. Após a publicação de seus postulados, tornou-se evidente a importância do estudo de infecções bacterianas em animais, visto que os modelos de estudo *in vitro* não são capazes de esclarecer todos os mecanismos envolvidos na relação entre patógeno e hospedeiro (Falkow, 2004; Kaufmann e Schaible, 2005). Estudos *in vivo* envolvendo *S. pyogenes* apresentam uma dificuldade pelo fato da bactéria ser um patógeno quase exclusivamente de humanos e bem adaptado a esse hospedeiro. Entretanto, outras espécies estritamente relacionadas com *S. pyogenes*, como *Streptococcus canis* e *Streptococcus dysgalactiae* não se encontram especificamente adaptados somente ao hospedeiro humano. Estudos na literatura sugerem assim, que durante sua evolução, *S. pyogenes* adaptou-se ao hospedeiro humano (Lefébure *et al.*, 2012; Kasper *et al.*, 2014).

Apesar disso, vários modelos animais foram estabelecidos visando mimetizar as infecções provocadas por *S. pyogenes* em humanos, de modo a obtermos mais entendimento dos mecanismos envolvidos na patogenia desta espécie. O modelo murino é o mais empregado em pesquisas, principalmente pelo fato destes animais possuírem um genoma semelhante ao genoma humano e serem pequenos, possibilitando assim estudos em grande escala (Vandamme, 2014). Para simular infecções orofaríngeas, os modelos murinos são empregados. Tais modelos possibilitam a análise da resposta do sistema imune associado à proteção ou suscetibilidade do hospedeiro (Soderholm *et al.*, 2017). No entanto, entre as desvantagens desse sistema temos o fato dos camundongos dificilmente desenvolverem faringite e mesmo utilizando altas concentrações de inóculo, um número pequeno de animais são de fato colonizados. Além disso, esse animal possui um pequeno volume sanguíneo, por isso a quantidade de testes imunológicos que podem ser realizados se torna limitada (Sumbly, Tart e Musser, 2008).

Outro modelo animal muito utilizado na pesquisa é o que utiliza primatas não-humanos. Esse modelo facilitou o desenvolvimento em diversas áreas, tais como ciências comportamentais, genética, neurociência, distúrbios imunomediados e doenças infecciosas (Sestak, 2018). Diversos estudos envolvendo primatas não-humanos foram desenvolvidos para elucidar infecções provocadas por *S. pyogenes*. No início da década de 1920, Blake e Cecil foram pioneiros ao estudar pneumonia em macacos (Francis e Terrell, 1934). Watson, Rothbard e Swift observaram que o desafio intranasal de *Macaca mulatta* com *S. pyogenes* desencadeou imunidade específica (Watson, Rothbard e Swift, 1946).

Ademais, há modelos que utilizam *zebrafish* (*Danio rerio*), visto que o animal possui um sistema imunológico bem desenvolvido, tamanho pequeno, tempo rápido de geração e genoma com genes ortólogos aos genes humanos (Neely, Pfeifer e Caparon, 2002). Por fim, há os modelos que utilizam invertebrados devido a facilidades tais como, o baixo custo e simplicidade em relação a execução. Estudos com bicho-da-seda (*Bombyx mori*) são utilizados pois os animais são grandes o suficiente para serem usados em experimentos de injeção e para que órgãos como o intestino sejam isolados (Hamamoto *et al.*, 2004). O modelo que usa a larva de *Galleria mellonella* tornou-se difundido em pesquisas de virulência envolvendo microrganismos e para a avaliação de compostos com ação antimicrobiana devido à semelhança da resposta imune do inseto em relação à de mamíferos (Rossoni *et al.*, 2019). Do mesmo modo há o modelo que utiliza *Caenorhabditis elegans*, um organismo de fácil manuseio, barato e geneticamente acessível para o estudo da patogênese de vários patógenos humanos (Bolm *et al.*, 2004).

1.7 *Caenorhabditis elegans* como modelo animal

C. elegans é um nematoide de vida livre, que pode chegar até 1 milímetro de comprimento e foi descrito pela primeira vez por Emile Maupas, em 1900 (Maupas, 1900 *apud* Blaxter, 2011). Desde então, isolados selvagens foram coletados na Europa, América do Norte, Austrália, Ásia e África, muitas vezes em frutas podres, onde eles provavelmente consomem substratos ricos em nutrientes e bactérias (Erkut e Kurzchalia, 2015; Dimov e Maduro, 2019). O nematoide sobrevive em uma cultura bacteriana simples em placa de Petri, tem um curto ciclo de vida e é de fácil visualização em microscópio óptico. É um animal multicelular sofisticado que possui órgãos e tecidos, tais como, músculos, sistema nervoso, pele, sistema digestivo e sistema reprodutor (Kaletta e Hengartner, 2006; Blaxter, 2011) (Figura 1).

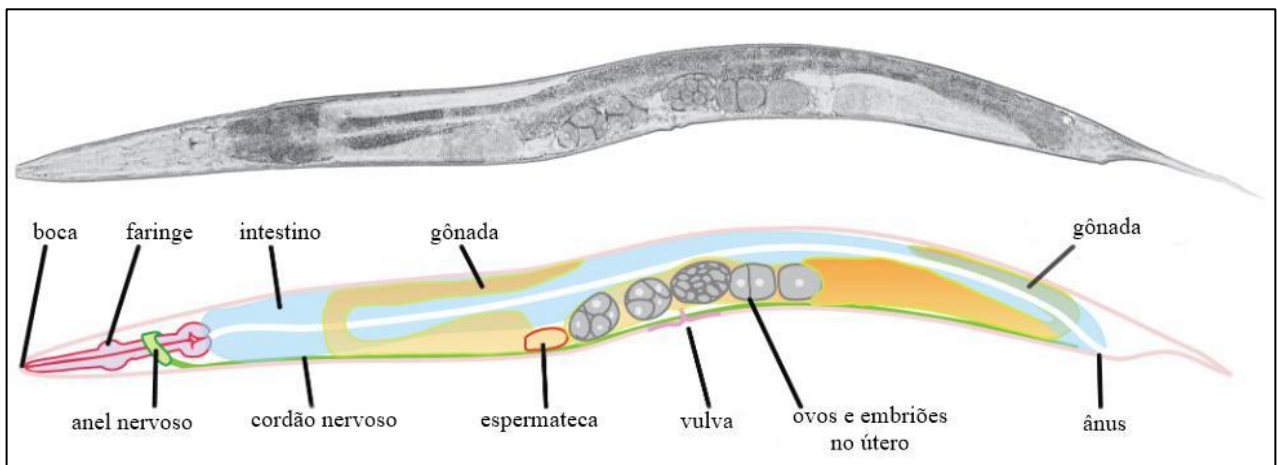


Figura 1 - Anatomia de *C. elegans* hermafrodita adulto. Acima, um animal adulto (comprimento, 1 mm) observado sob microscopia óptica. Abaixo, um desenho em que os principais sistemas e órgãos são indicados. Adaptado de Blaxter (2011) por Úrsula Lopez.

O animal desenvolve-se em um curto período embrionário, seguido por quatro estágios larvais (L1-L4) até chegar à fase adulta (Figura 2). Cada estágio larval é separado por uma muda, em que uma nova cutícula é sintetizada abaixo da mais velha. A duração do desenvolvimento de *C. elegans* depende da temperatura do ambiente ao qual está inserido. Para a linhagem N2, comumente utilizada em laboratório, o ciclo de vida é completado em 3 dias a 25°C. Entretanto, se expostos à ausência de alimento e a altas temperaturas durante a fase inicial das larvas, os animais desviarão para um outro estágio alternativo conhecido como estágio

Dauer. Nessa fase, eles são resistentes a estresses ambientais e podem viver por meses sem alimento (Riddle, Swanson e Albert, 1981; Barrière e Félix, 2005; Fielenbach e Antebi, 2008).

O nematoide pode ser hermafrodita com um genótipo 5AA + XX. Estes produzem espermatozoides durante o desenvolvimento larval e oócitos durante a idade adulta, sendo assim capazes de autofecundação (Hodgkin e Brenner, 1977). Porém, também há a ocorrência rara de machos de genótipo 5AA + XO que representam aproximadamente 0,15% da população (Hodgkin e Brenner, 1977; Goodwin e Ellis, 2002). Em condições de laboratório, o animal se alimenta de *E. coli*. Cada adulto hermafrodita põe cerca de 300 ovos, podem ser centrifugados, criopreservados a uma temperatura de -80°C, permitindo assim que as cepas sejam mantidas em laboratório para estudos futuros, e experimentos utilizando *C. elegans* estão livres de preocupações éticas (Blaxter, 2011; Son *et al.*, 2019).

Sydney Brenner foi um dos primeiros pesquisadores a utilizar esta espécie, pois carecia de um modelo adequado para estudos genéticos de neurobiologia em eucariotos, onde pudesse determinar a estrutura completa do sistema nervoso (Brenner, 1974). No final da década de 1990, este nematoide tornou-se o primeiro organismo multicelular a ter seu genoma sequenciado e foi observado que há homologia de 60% a 80% entre seu genoma e o de mamíferos (*C. elegans* Sequencing Consortium., 1998). Desde então, a comunidade mundial de pesquisadores de *C. elegans* cresceu. O animal se tornou um modelo inestimável para a pesquisa biomédica, já que contém muitos componentes-chave relacionados ao metabolismo, rede de estresse oxidativo e vias de sinalização de insulina, tornando-se um sistema útil para melhorar a compreensão de doenças complexas, como diabetes (Zhu *et al.*, 2016). A descoberta do RNA interferente ocorreu em estudos que envolveram *C. elegans* (Fire *et al.*, 1998), o qual também é utilizado em pesquisas sobre o envelhecimento (Son *et al.*, 2019). Este nematoide também é um importante modelo em estudos sobre virulência bacteriana (Mahajan-Miklos, Rahme e Ausubel, 2000).

Existem diversos mecanismos responsáveis por ocasionar a morte do nematoide. Alguns patógenos como *Pseudomonas aeruginosa* e *Serratia marcescens* estabelecem infecções e manifestações como problemas locomotores, distensão intestinal e lise celular (Tan e Ausubel, 2000; Kurz *et al.*, 2003). *Yersinia pestis* e *Yersinia pseudotuberculosis*, produzem biofilmes que se ligam à cutícula de *C. elegans* levando-o a morte (Joshua *et al.*, 2003). *Bacillus*

thuringiensis expressa uma toxina formadora de poros que causa dano intestinal (Marroquin *et al.*, 2000).

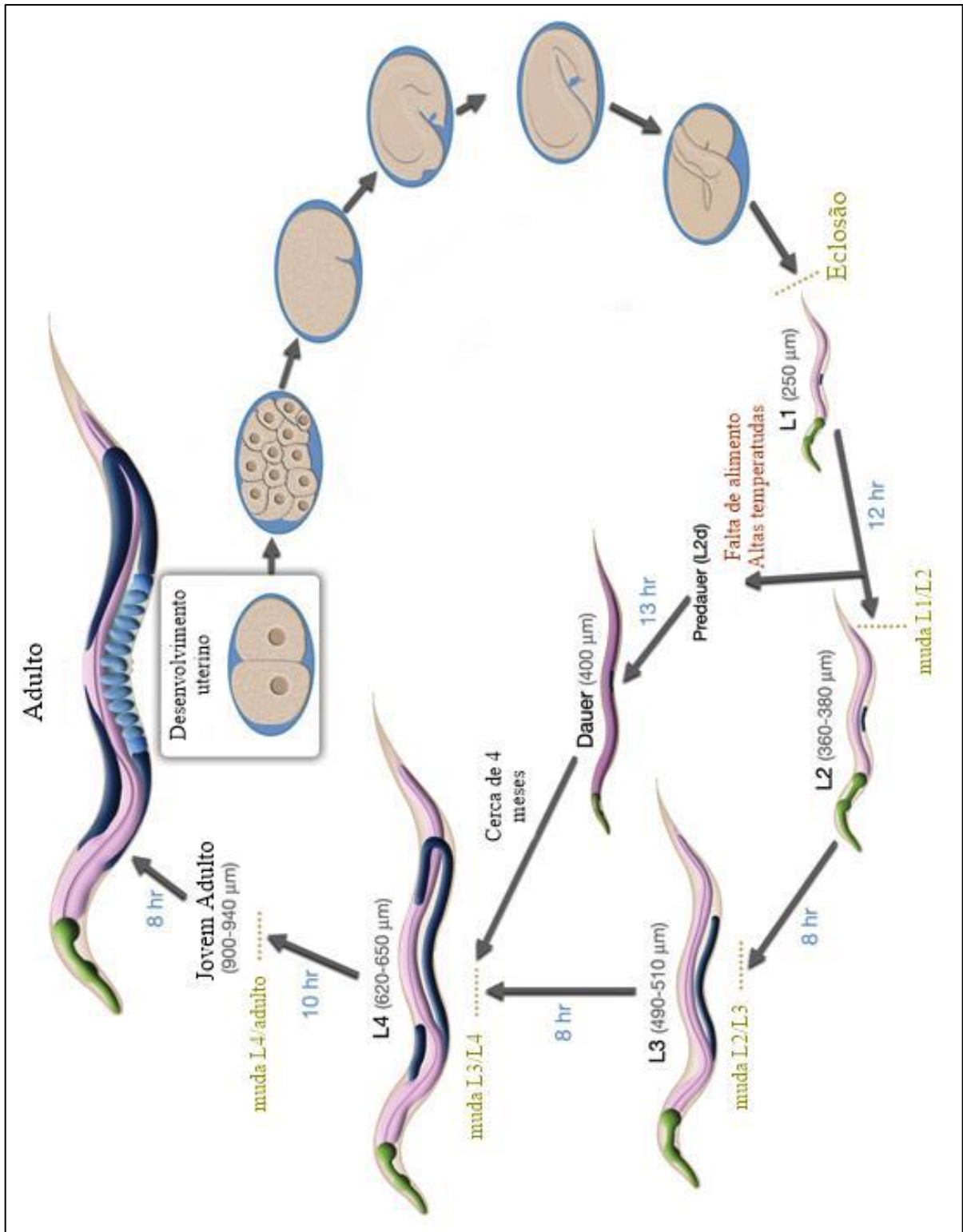


Figura 2 - Ciclo de vida de *Caenorhabditis elegans*. Adaptado de WormAtlas, por Úrsula Lopez

Em relação ao gênero *Streptococcus*, *S. pneumoniae* foi uma das primeiras espécies que teve seu potencial de virulência avaliado num modelo de *C. elegans*. O estudo demonstrou que a bactéria é capaz de levar o nematoide à morte (Garsin *et al.*, 2001). Em 2002, Jansen e colaboradores associaram a morte de *C. elegans* por *S. pyogenes* e *S. pneumoniae* à presença de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) sintetizado pelas bactérias (Jansen *et al.*, 2002). Alguns anos depois, Bolm e colaboradores avaliaram em um modelo de *C. elegans* estreptococos dos grupos B (EGB), C (EGC), G (EGG) e os pertencentes ao grupo Viridans, como *Streptococcus mitis* e *Streptococcus oralis*. No seu estudo, demonstraram que tais espécies ocasionam a morte de *C. elegans* proporcionalmente ao nível de H₂O₂ produzido (Bolm *et al.*, 2004).

Em 2016, Mina e Marques realizaram um estudo utilizando o modelo de *C. elegans* com a finalidade de avaliar o potencial de virulência de *persisters* de *S. aureus* em relação ao de células suscetíveis. Como resultado, observaram que células *persisters* são menos virulentas (Mina e Marques, 2016). Em 2017, Stietz e colaboradores empregaram o nematoide para validar a flavoproteína transportadora de elétrons (ETF) como um alvo para o tratamento antibacteriano de *Burkholderia cenocepacia*. Para tal, realizaram experimentos com o fenótipo de persistência da bactéria (Stietz *et al.*, 2017). Defraigne e colaboradores empregando um modelo de *C. elegans* verificaram que o composto 1-[(2,4 dichlorophenethyl) amino]-3-phenoxypropan-2-ol (SPI0009) possui atividade contra células *persisters* de *Enterobacter aerogenes*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa*, *Enterococcus faecium*, *Burkholderia cenocepacia* e *E. coli*. (Defraigne *et al.*, 2017). Em 2018, Kim e colaboradores realizaram experimentos que promoviam a interação de *C. elegans* com *S. aureus* resistente à metilina (MRSA) para identificar retinóides sintéticos que matam *persisters* de MRSA por romper bicamadas lipídicas (Kim *et al.*, 2018).

2. JUSTIFICATIVA

O sistema imune do hospedeiro elimina com sucesso grande parte dos patógenos bacterianos invasores. Assim muitas infecções são resolvidas. Entretanto, algumas vezes as bactérias conseguem escapar das defesas do hospedeiro e promovem então um processo infeccioso. Nesses casos, o uso de antimicrobianos se faz necessário, porém algumas vezes o tratamento não resulta em resposta clínica, levando ao uso de outros antimicrobianos na tentativa de resolução clínica.

A bactéria *S. pyogenes* é um patógeno responsável por uma série de infecções invasivas e sequelas imunomediadas, que acometem um grande número de pessoas, tanto no Brasil como em outros países. Apesar de apresentar reconhecida suscetibilidade à penicilina, a ocorrência de falhas terapêuticas no tratamento destas infecções tem sido descrita e até o momento nenhum estudo observou o fenômeno de resistência microbiológica nesta espécie. Em trabalhos anteriores do nosso grupo, foi observado em 211 amostras de *S. pyogenes* que todas apresentavam a capacidade de se tornar refratárias a penicilina e a outros antimicrobianos, indicados na terapêutica clínica e com mecanismos de ação diversos, quando o inóculo estava em alta densidade populacional (concentração celular). É interessante citar que o uso de um inibidor de bombas de efluxo, o carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona (CCCP) foi capaz de restaurar a suscetibilidade de *S. pyogenes* a clindamicina e ao cloranfenicol, implicando o mecanismo de efluxo nessa refratariedade aos antimicrobianos (Coronado, 2012). Estes fatos demonstraram que *S. pyogenes* apresentam a capacidade de formar células refratárias (*persisters*), mas o mecanismo de formação de células persistentes ainda estava sem explicação. Na tentativa de confirmarmos essas suspeitas foi realizada a análise do sequenciamento do genoma completo das células refratárias a penicilina e a comparação com o de células sensíveis, no intuito de verificar se alguma mutação estaria envolvida com o surgimento deste fenótipo. Porém, nenhum *single nucleotide polymorphism* (SNP) foi encontrado (Martini, 2019). Nesse trabalho também foi observado um aumento da expressão de bombas de efluxo e de um sistema toxina-antitoxina (homologo ao *hicA/hicB* em *E. coli*). Os resultados apontaram para uma possível regulação epigenética na geração do fenômeno de refratariedade a penicilina em *S. pyogenes* envolvendo a efetiva participação de bombas de efluxo e diminuição nos genes envolvidos no metabolismo e crescimento celular (Martini, 2019).

Mais seriam essas células persistentes na presença de altas doses de penicilina também mais virulentas? Em estudos realizados com *E. coli* e *S. aureus* foi observada uma queda no

potencial de virulência de células persistentes e uma menor capacidade de gerar morte em modelos *in vivo*, quando comparadas com células planctônicas (Mina e Marques, 2016). Em função dos fatos relatados acima buscamos compreender o potencial de virulência de células de *S. pyogenes* refratárias à penicilina em relação às células sensíveis. Esse entendimento nos parece de grande importância na clínica médica. Esse estudo é fundamental para entendermos o potencial de patogenicidade do *S. pyogenes* e sua implicação na terapêutica clínica de infecções não responsivas aos antimicrobianos, no intuito de buscarmos tratamentos mais responsivos e eficazes.

3. OBJETIVOS

O principal objetivo deste trabalho foi comparar o potencial de virulência entre células de *S. pyogenes* refratárias a penicilina (R-PN), obtidas a partir de uma condição de elevada densidade populacional, com células sensíveis (NR-PN). Além disso, estabelecer o modelo experimental de *Caenorhabditis elegans* como um bom modelo *in vivo* para estudo de virulência em *S. pyogenes*. Para tal fim pretendemos:

- Estabelecer o modelo de *C. elegans* para estudos da virulência em células de *S. pyogenes* refratárias a penicilina.
- Realizar microscopia de fluorescência para observar a interação bacteriana com o nematoide.
- Comparar a taxa de sobrevivência do nematoide *C. elegans* frente às células refratárias a penicilina e células sensíveis.
- Realizar microscopias ópticas para observar alterações estruturais nos nematoides expostos às células refratárias e as células sensíveis de *S. pyogenes*.
- Quantificar a taxa de internalização de *S. pyogenes* no intestino do nematoide em ambas as condições.
- Estudar a expressão de genes codificantes de fatores de virulência em células de *S. pyogenes* refratárias a penicilina através de RT-qPCR e comparar com a observada em células sensíveis.
- Estudar a expressão de genes codificantes de fatores de virulência em *S. pyogenes* sensíveis e refratários a penicilina *in vivo*, após a interação no modelo de *C. elegans*, e comparar com o observado *in vitro*.
- Avaliar a interação das células de *S. pyogenes* refratárias a penicilina e não refratárias com células do sistema imune por meio de ensaios de fagocitose empregando monócitos THP-1.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostra bacteriana

Nesse estudo, os experimentos foram realizados utilizando-se a amostra de *S. pyogenes* 37-97 (tipo *emm62*; ST62), obtida de secreção de orofaringe e pertencente à coleção de culturas do Laboratório de Biologia Molecular de Bactérias do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes/UFRJ. A amostra se encontra estocada no *freezer* a -80°C em meio crioprotetor composto de caldo Todd Hewitt (THB; Becton, Dickison and Company, Maryland, EUA) suplementado com 0,5% de extrato de levedura (THY; Becton, Dickison and Company, Maryland, EUA) e 18% de glicerol (Merck, Darmstadt, Alemanha).

A amostra foi isolada no Rio de Janeiro e vem sendo estudada em projetos anteriores do laboratório que tentam elucidar o mecanismo de refratariedade à penicilina em *S. pyogenes*. A escolha desta amostra foi baseada na origem clínica (orofaringe) que representa a maioria das infecções geradas por *S. pyogenes*. Estudos anteriores determinaram a concentração mínima inibitória (CMI) de diversos antimicrobianos para esta amostra (Coronado, 2012). Estes resultados são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Concentração mínima inibitória de diversos antimicrobianos para a amostra de *S. pyogenes* 37-97.

Antimicrobianos	CMI ($\mu\text{g}/\text{mL}$) ¹
Penicilina	0,01
Cefaclor	0,5
Cefalexina	0,5
Eritromicina	0,12
Azitromicina	0,12
Clindamicina	0,01
Cloranfenicol	1
Tetraciclina	0,12

¹ CMI, Concentração mínima inibitória. Determinada por teste de diluição em meio de agar Muller-Hinton adicionado de 5% de sangue desfibrinado de carneiro, conforme recomendado pelo CLSI (2010).

4.2 Antimicrobianos

Foram utilizados neste estudo os antimicrobianos: penicilina G sódica (Sigma-Aldrich; St. Louis, EUA), ácido nalidíxico (Sigma-Aldrich; St. Louis, EUA) e gentamicina (Sigma-Aldrich; St. Louis, EUA). Todas as soluções foram preparadas conforme as recomendações do CLSI (2015).

4.3 Preparo de células de *S. pyogenes* refratárias à penicilina

As células refratárias foram obtidas em meio sólido contendo penicilina, em concentração correspondente a 800x CMI, a partir da semeadura de um inóculo bacteriano em alta densidade populacional. O inóculo em elevada densidade populacional (10^{10} UFC/mL) utilizado apresentava células em fase log do crescimento e foi obtido como descrito a seguir.

4.3.1 Preparação de células de *S. pyogenes* em fase log nas concentrações de 10^7 UFC/mL e 10^{10} UFC/mL

A amostra 37-97 de *S. pyogenes* foi ativada a partir do estoque. Uma alíquota de 50 μ L do estoque foi retirada e transferida para tubos contendo 3 mL de caldo THB suplementado com 0,5% de extrato de levedura (THY). Após incubação em banho-maria por 18 horas a 37°C, o crescimento bacteriano foi semeado em placas de Petri contendo ágar sangue (Blood Agar Base, Oxoid, Waltham, EUA; adicionado de 5% de sangue desfibrinado de carneiro; BAS) e as placas incubadas à 37°C por 18 horas.

Com a finalidade de adquirir o crescimento celular de $0,5-2 \times 10^{10}$ UFC/mL (alta densidade populacional – ADP), um pequeno número de colônias bacterianas foi inoculado em um tubo de ensaio contendo 1 mL de caldo THY e incubadas a 37°C por 6h. Em seguida, o crescimento (1 mL) foi transferido para 9 mL de caldo THY e incubado a 37°C por 18 horas. Por fim, todo o conteúdo do tubo (10 mL) foi vertido em uma garrafa contendo 90 mL do mesmo meio e está incubada a 37°C em banho-maria por 6 horas. Após o período de incubação, o crescimento bacteriano foi transferido para tubos tipo Falcon (Crallplast, Cotia, SP) e estes, centrifugados por 15 minutos a 2000 g. Posteriormente, o sedimento foi ressuspensado em 1 mL de THY e corresponderá a suspensão bacteriana em ADP (10^{10} UFC/mL). Para obter o crescimento celular de 10^7 UFC/mL (baixa densidade populacional – BDP) a suspensão bacteriana em ADP foi diluída (10^{-3}) em solução salina 0,85% (p/v, NaCl; Merck; Darmstadt, Alemanha).

Por fim, com a finalidade de confirmar que as concentrações celulares de interesse (10^{10} UFC/mL ou 10^7 UFC/mL) foram obtidas, realizamos diluições seriadas em solução salina a 0,85% (p/v) a partir dessas suspensões, as quais foram posteriormente semeadas em BAS e incubadas a 37°C por 18 horas. Em seguida foi determinado o número de UFC/mL correspondente a cada inóculo.

4.3.2 Obtenção de células de *S. pyogenes* refratárias à penicilina e não refratárias

Para gerar as células de *S. pyogenes* R-PN, uma alíquota de 100µL do inóculo em ADP (10^{10} UFC/mL) foi semeado confluentemente na superfície de uma membrana de celofane previamente depositada na superfície de uma placa de BAS contendo penicilina (concentração de 8 µg/mL; 800xCMI). Além disso, alíquotas de 100 µL do inóculo em BDP (10^7 UFC/mL) foram semeadas confluentemente sobre membrana de celofane aplicada sobre meio BAS, sem penicilina, para a obtenção das células NR-PN. Com o propósito de averiguar a não formação de células refratárias a partir do inoculo em BDP, 100 µL deste foi também semeado em BAS com penicilina (8 µg/mL). Posteriormente, as placas foram incubadas a 37°C por 24 h. Após a incubação, foi feita uma análise visual quanto ao crescimento bacteriano e as células R-PN e as NR-PN foram removidas do celofane e lavadas com 1 mL de salina, diluídas e semeadas em BAS para a realização da contagem do número de UFC/mL. O inóculo padronizado foi utilizado nos diferentes experimentos.

4.4 *Caenorhabditis elegans*

4.4.1 Cultivo e manutenção de *Caenorhabditis elegans*

Os nematoides *Caenorhabditis elegans* Bistol N2 foram mantidos e propagados a temperatura de 20°C em ágar NG (*Nematode Growth Medium*). O meio NG foi preparado com 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 1 M (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), 1 mL de MgSO₄ 1 M (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), 25 mL do tampão fosfato 1M [59,7g de KH₂PO₄ (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) e 10,7g de K₂HPO₄ (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha)] diluídos em 500 mL de água destilada estéril], 972 mL de H₂O destilada para preparação de 1 litro de meio de cultura (Stiernagle, 2006). É necessário que sobre o ágar NG em placa seja semeado um

crescimento confluyente de *E. coli* OP50, proveniente de incubação *overnight* em caldo Luria-Bertani (LB; Difco, Sparks MD, EUA), para a alimentação do animal. A referida placa foi incubada por 30 minutos a 37°C e após esse período estará adequada para receber os nematoides (Stiernagle, 2006).

4.4.2 Obtenção de *C. elegans* em estágio larval L4

Para esta etapa, uma nova população de nematoides foi iniciada a partir de ovos, os quais passarão pelo processo de sincronização. Visando isso, os animais crescidos em uma placa de NG durante 5 dias e os seus ovos foram ressuspensos com 4 mL de tampão M9 [3 g de KH_2PO_4 (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), 6 g de Na_2HPO_4 (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), 5 g de NaCl (Affymetrix, Ohio, EUA), 1 ml de MgSO_4 1M (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) e adicionar água destilada estéril até completar 1 litro] e o volume transferido para um tubo tipo Falcon de 15 mL. Imediatamente após a transferência, foi adicionada solução de lise [1 mL de hipoclorito de sódio a 6% acrescido de 0,5 mL de NaOH 5N (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha)] que foi responsável por matar os animais e dissolver suas carcaças, porém com preservação dos ovos. O tubo foi agitado em vórtex em intervalos de 30 segundos sem que ultrapasse 5 minutos. Após essa etapa, o tubo foi centrifugado por 30 segundos a 1300 g, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspenso em 1,5 mL de tampão M9. Esse processo de lavagem foi repetido durante 3 vezes para que sejam retirados os resíduos de hipoclorito. Os ovos presentes no *pellet* foram inoculados em uma nova placa de NG contendo o crescimento de *E. coli*, semeado conforme descrito no item 4.4.1. A placa foi mantida em uma estufa a temperatura de 20°C durante 3 dias, para que os animais se desenvolvam até atingirem o estágio larval L4 (Stiernagle, 2006).

4.5 Microscopia de fluorescência

Para a realização da microscopia de fluorescência, uma placa de NG com os nematoides previamente sincronizados como descrito no item 4.4.2 foi lavada com 5 mL de meio S basal [5,85 g de NaCl (Affymetrix, Ohio, EUA), 1 g de K_2HPO_4 (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), 6 g de KH_2PO_4 (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), 1 ml de colesterol 5 mg/ml em etanol (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e completar até 1 litro com H_2O estéril], o conteúdo transferido para um tubo tipo Falcon e adicionado de 10 μL de ácido nalidíxico (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Após decantar os nematoides maiores, correspondentes aos em fase larvar mais tardia (L4), e descartar o sobrenadante, os animais foram transferidos para novas placas contendo meio THY adicionado de 2,5 % de ágar e ficaram incubados por 1 hora a 20°C sem alimento. Alíquotas de 1 mL de células R-PN ou NR-PN, preparadas conforme descrito no item 4.3.2, foram transferidas para microtubos. Em seguida, foram adicionados 15 µL de corante para ácido nucleico verde fluorescente (SYTO 9; Thermo Fisher Scientific Inc, Wilmington, DE, EUA) para marcar as bactérias e os tubos foram cobertos com papel alumínio para evitar que o conteúdo entre em contato com a luz. Os tubos foram incubados por 30 minutos a 37°C. Após o período de incubação, 50 µL de cada conteúdo bacteriano marcado foi semeado em placas de Petri contendo THY suplementado com 2,5 % de ágar nas quais se encontram os animais sem alimento, e as placas incubadas durante 4 horas a 20°C. Posteriormente, para evitar durante a análise da microscopia um excesso de bactérias que o animal não ingeriu, as placas foram lavadas com 5 mL de meio S basal, e o volume centrifugado por 3 minutos a 2.000 g. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensão em 3 mL de meio S basal. Finalmente uma gota foi retirada com o auxílio da pipeta Pasteur e aplicada em lâminas de microscopia, sendo a seguir lamínulas depositadas por cima das amostras. Para obtenção das imagens, as lâminas foram observadas no microscópio Axio Imager D2 (Zeiss; Oberkochen, Alemanha) e as imagens foram geradas pela câmera AxioCam HRm (Zeiss; Oberkochen, Alemanha) acoplada ao aparelho.

4.6 Teste de sobrevivência

Para este experimento, uma alíquota de 20 µL do crescimento celular na condição de R-PN e NR-PN foram semeados, confluentemente, em placas de 24 poços (Thermo Fisher Scientific Inc, Wilmington, DE, EUA), sendo que as células R-PN foram semeadas em 9 poços, assim como as células NR-PN e os demais poços foram utilizados como controle. Em cada poço foi previamente depositado 0,5 mL de THY acrescentado de 2,5 % de ágar e ácido nalidíxico (5 µg/mL) visando inibir o crescimento de *E. coli* que eventualmente possa ter sido transportada após as lavagens do nematoide. Nos poços em que foram semeados os crescimentos das células R-PN, além de ácido nalidíxico, o meio também foi adicionado de penicilina (8 µg/mL) para manutenção apenas das células refratárias. Após a incubação por 4 horas a 37°C, a placa foi deixada 30 min em temperatura ambiente para não gerar estresse térmico nos nematoides. Em seguida, por volta de 20 a 40 larvas em estágio L4 de *C. elegans*

foram adicionadas em cada poço. Por fim, o número inicial (T0) de animais foi contado em microscópio invertido ID 02 (Zeiss; Oberkochen, Alemanha), as placas incubadas a 20°C e a contagem do número de animais vivos realizada a cada 24 horas (Sifri *et al.*, 2003, com adaptações).

Foram realizadas 3 réplicas biológicas do experimento e os resultados 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).

Como controle do experimento a cepa de *E. coli* OP50 cultivada em Lúria-Bertani ágar foi inoculada em 5 ml de caldo LB e incubada *overnight* a 37°C. Uma alíquota de 20 µL do crescimento foi então semeada nos poços controle (sem adição de ác. nalidíxico), de maneira confluyente e o experimento de sobrevivência do nematoide realizado com o descrito acima. Como controle negativo do experimento, dois poços da placa não receberam nenhum crescimento bacteriano, apenas os vermes.

4.7 Microscopia óptica de Contraste por Interferência Diferencial (CID)

Para a realização de microscopia óptica de CID foram utilizados os nematoides oriundos do ensaio de sobrevivência descrito no item anterior. Ao final de 24 h de ensaio os poços da placa foram lavados com 1 mL de paraformaldeído a 5% (Sigma-Aldrich), que foi utilizado como fixador, e o conteúdo foi disposto em microtubos de 1,5 mL previamente identificados com a numeração de cada poço. Com o auxílio de pipetas Pasteur descartáveis, algumas gotas do material foram depositadas em lâminas de vidro e cobertas com lamínula. Por fim, o material preparado foi levado ao Microscópio Axio Observer A1 (Zeiss; Oberkochen, Alemanha) equipado com o sistema de CID para a observação de: alterações da morfologia incluindo alterações na cutícula, eclosão de ovos no interior do animal, presença de bolhas apoptóticas no interior do nematoide, e de *S. pyogenes* dentro do mesmo. As imagens foram obtidas com a câmera AxioCam HRm (Zeiss; Oberkochen, Alemanha) acoplada ao microscópio.

4.8 Quantificação de células R-PN e NR-PN dentro de *C. elegans*

Para a realização desse ensaio, uma placa de 24 poços foi preparada como descrito no item 4.6. Foi realizada a leitura com 24h e 48h, para isso os poços selecionados foram lavados

com 1,5 ml de meio S basal adicionado de 100 UI/ml de penicilina (Sigma, St. Louis, MO, EUA), 100 µg/ml de gentamicina (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e 5 µg/mL de ácido nalidíxico com a finalidade de eliminar as bactérias aderidas à cutícula do nematoide. Esse conteúdo foi transferido para microtubos, que foram incubados por 2 horas a 37°C. Em seguida, o tubo foi centrifugado por 30 segundos a 1300 g, o sobrenadante descartado e o sedimento suspenso em 20 µL de meio S basal acrescido de Triton X-100 1% (Sigma, St. Louis, MO, EUA). Bastões estéreis foram utilizados para macerar os animais presentes na suspensão do sedimento. Uma alíquota de 30 µL da solução composta de meio S basal e Triton X-100 1% foi adicionada para ajustar o volume final do macerado (Garsin *et al.*, 2001, com adaptações). Por fim, foi realizada uma diluição seriada até 10⁻⁵ em salina a 0,85% e volumes de 10 µL das diluições 10⁰, 10⁻³, 10⁻⁴ e 10⁻⁵ foram plaqueados em forma de spot em placas de BAS com a adição de ácido nalidíxico (5 µg/mL) para que seja determinado o número de UFC/nematoide.

4.9 Estudo de expressão gênica

4.9.1 Preparo de células de *S. pyogenes* crescidas *in vitro* para extração de RNA

Após a preparação dos inóculos como descrito no item 4.3.1, uma alíquota de 100 µL proveniente da suspensão celular contendo 10¹⁰ UFC/mL (ADP) foi semeada de modo confluyente na superfície de membranas de celofane (Forte do Riachuelo Comércio de Papéis, RJ) estéreis e previamente depositadas na superfície de placas contendo ágar BAS acrescido de penicilina (8 µg/mL). Para obter as células NR-PN, uma alíquota de 100 µL da suspensão celular na concentração de 10⁷ UFC/mL (BDP) foi semeada na superfície das membranas de celofane estéreis depositadas sob placas de BAS sem a adição de penicilina. Após um período de incubação de 24 h a 37°C, as células foram removidas do celofane pela transferência deste, com auxílio de pinças estéreis, para tubo tipo Falcon estéril de 50 mL. O celofane foi lavado com 5 mL de tampão TES (4 mL de Tris-HCl 20mM pH 7,6; 4 mL de EDTA 10mM pH 8,0; 10 mL de NaCl 1N; 80 mL de sacarose 50%; completar o volume para 200 mL de água) e foi agitado vigorosamente com o vórtex visando o desprendimento das células. Em seguida, a suspensão celular foi centrifugada por 30 min a 2000 g, o sobrenadante descartado e o sedimento ressuspenso em 1 mL de tampão TES e 1 mL de solução de álcool-acetona (1:1; álcool etílico absoluto PA, ISOFAR, RJ: acetona, Merck, Alemanha).

Por fim, os volumes contendo as células de *S. pyogenes* R-PN ou NR-PN foram transferidos para tubos tipo Falcon e congelados em *freezer* -80°C.

4.9.2 Preparo de células de *S. pyogenes*, após interação com *C. elegans*, para extração de RNA

Para essa etapa, os animais macerados obtidos como descrito no item 4.8, foram transferidos para tubos tipo Falcon contendo 4 mL de caldo THY e incubados por 18 horas (13 gerações) a 37°C para que um número maior de células bacterianas seja gerado sem que haja alterações no fenótipo (Genteluci *et al.*, 2015). O crescimento celular obtido foi centrifugado a 2000 g por 15 minutos e o sedimento ressuspense em 1 mL de TES. Em seguida foi adicionado 1 mL de álcool-acetona (v/v; 1:1) e as amostras congeladas em *freezer* a uma temperatura de - 80°C até o momento da extração do RNA.

4.9.3 Extração de RNA

O RNA das células foi extraído em duas etapas. Inicialmente, foi realizada uma extração enzimática seguida da extração com o kit comercial *Rneasy mini Kit* (Quiagen, Hilden, Alemanha). Para tal, as células congeladas de *S. pyogenes* R-PN e NR-PN obtidas *in vitro* e *in vivo* (itens 4.9.2 e 4.9.3) foram retiradas do *freezer* -80°C e centrifugadas por 2000 g durante 5 min. O sedimento foi ressuspense em 90 µL de tampão TE (Tris-HCl 20mM pH 7,6; EDTA 10mM pH 8,0) e adicionado de 100 µL de solução de lisozima a 20 mg/mL e 5 µL de solução de mutanolisina a 10.000 U/mL (50 U). O conteúdo foi transferido para microtubos e em estes incubados durante 2 horas à 37°C. Em seguida foi realizada a extração do RNA através da utilização do *Rneasy Mini Kit* (Quiagen, Hilden, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. Após esse procedimento, os RNAs foram quantificados no espectrofotômetro NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific Inc, Wilmington, DE, EUA). Além disso, os RNAs obtidos também tiveram sua integridade avaliada através da técnica de eletroforese em gel de agarose a 1,2% (p/v) em tampão TAE 1X [Tris acetato 20 mM, EDTA 0,5 mM (pH 8,0)], tendo a corrida eletroforética ocorrido por 40 min a 120 V. Por fim, 1 µg do RNA das amostras foi tratado com 1 µL de DNase I *Amplification Grade* (1 U/µL; Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) por 15 min a 25°C. A reação foi interrompida com 1 µL de EDTA (25 mM pH 8,0) e incubação por 10 min a 65°C. Após o tratamento, o RNA extraído foi estocado a -80°C até o momento do uso.

4.9.4 Desenho de *primers* que foram utilizados na técnica de qReal Time-PCR (*Quantitative reverse transcription PCR*)

As sequências dos genes de interesse foram obtidas na base de dados do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank). Para o desenho dos *primers* foi utilizado o genoma de *S. pyogenes* MGAS10750 como base. As condições: tamanho do amplicon entre 50-200 pares de base; *primer* contendo entre 19-23 nucleotídeos; índice GC de 35 a 65%; TM de 60 a 68°C, foram utilizadas durante o desenho. Em seguida, a sequência dos *primers* foi analisada através do programa Premier Biosoft (<http://www.premierbiosoft.com/>). Por fim, os *primers forward* e *reverse* foram analisados no programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para a verificação da não existência de sequências iguais em outros pontos do genoma.

Foram desenhados *primers* para o estudo de genes relacionados: ao estresse oxidativo - *nox* (NADH oxidase), *sodA* (superóxido desmutase) e *perR* (proteína reguladora da captura de ferro) e a fatores de virulência - *mga* (regulador global de genes de virulência), *inlA* (internalina), *ska* (estreptoquinase), *lmb* (proteína de ligação à laminina), *scpA* (C5a peptidase), *slo* (estreptolisina O), *fbp* (proteína de ligação à fibronectina), *emm* (proteína M), *MGAS10750_Spy1285* (hialuronidase), *speA* (exotoxina tipo A) e *speB* (cisteína-protease). Estes são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Genes utilizados para o estudo da expressão gênica

Locus	Nome	Foward	Reverse
MGAS10750_ <i>Spy1021</i>	<i>nox</i>	TTATCCTCGCCGTTGGTTTC	CAAGGAAAGCACCATTACGG
MGAS10750_ <i>Spy1252</i>	<i>sodA</i>	GGCAGATGTCACTAAGATTC	CAAAACGTCCAGTAGCAGC
MGAS10750_ <i>Spy0167</i>	<i>perR</i>	ATTTACCGTGACTTACAGCC	CATAAAGTCATAGTAGGTGGT
MGAS10750_ <i>Spy1811</i>	<i>mga</i>	CTGTGAACGCCTATTGAGC	AGGAATGTTGGATAAGTTGAG
MGAS10750_ <i>Spy1208</i>	<i>inlA</i>	TGGATACCTTGCGTGCCTTA	ATGGGAATGGGGTTGGAGC
MGAS10750_ <i>Spy1778</i>	<i>ska</i>	AGATTTAGACTTTACACCGTTG	GCTGCTAACTCTTGTGATGAA
MGAS10750_ <i>Spy1805</i>	<i>lmb</i>	ACGCTTCAAACACATCAACCT	TCAAATAGAAGCAGATAAGCATT
MGAS10750_ <i>Spy1807</i>	<i>scpA</i>	TACGCCAACCTTCCAGACG	ATGTTGAGTCTGCCGCTGC
MGAS10750_ <i>Spy0147</i>	<i>slo</i>	GTGAGTAATGTAGCCTATGGT	TCTCCTCCTAAAACGACAGC
NGAS743DI45_00795	<i>fbp</i>	ATGCGGAAGGTGACTACTCT	TCTTTTCTCCTGTTCCATTACT
NGAS743DI45_09240	<i>emm</i>	CAATCAAGACCCAACATCAGG	AAGCGTTATGGAGGGTTGCGG
MGAS10750_ <i>Spy1285</i>		TTACAGCATTAGTCTTACCGC	AATCGGAAGGTGCTGCTATG
MGAS10750_ <i>Spy1277</i>	<i>speA</i>	CTGACCCTACTCCAGAACAA	GATCTTACATTAGTCCCTTCTA
MGAS10750_ <i>Spy1828</i>	<i>speB</i>	TGCTAACCCAGTATTTGCCG	AATATCTTCTGTGCTTCGTGC

4.9.5 qRT-PCR

O kit *Power SYBR green* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) foi utilizado para a análise de expressão gênica, por reação de qRT-PCR. Este método possui três etapas: a síntese de cDNA a partir do RNA extraído pela ação da enzima transcriptase reversa; amplificação do cDNA através de PCR; e a marcação do produto da amplificação com o *SYBR green*, um intercalante fluorescente de DNA.

A plataforma utilizada foi o *StepOne Real Time PCR System* (Applied Biosystems; Waltham, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. A análise da curva de dissociação (*melting curve*) foi utilizada para assim confirmar a especificidade de cada reação. O *software StepOne™ Software v 2.1* (Applied Biosystems) foi utilizado para a avaliação dos resultados. A eficiência da reação foi calculada de acordo com a equação $E=10^{-1/slope}$ (Pfaffl, 2004). Para o cálculo do C_T comparativo, foi realizada a determinação da quantificação relativa do transcrito do gene *16S rRNA* (*foward* 5' ACCAAGGCGACGATACATAG 3'; *reverse* 5'

GTGTCTCAGTCCCAGTGTG 3') utilizado como controle endógeno, com a finalidade de normalizar prováveis variações na quantidade e qualidade de mRNA nas diferentes condições.

Os resultados foram a média de dois experimentos biológicos independentes, cada um deles em triplicata (Côrtes *et al.*, 2015).

4.10 Experimentos de fagocitose

4.10.1 Preparação da cultura de monócitos THP-1

Para determinar a taxa de fagocitose das células de *S. pyogenes* R-PN e NR-PN, primeiramente, as células mielomonocíticas da linhagem THP-1 (monócitos THP-1) foram preparadas antes do momento de interação com as células bacterianas. Os monócitos THP-1 são células que foram isoladas do sangue de um indivíduo com de leucemia monocítica aguda (Tsuchiya *et al.*, 1980). Essas células foram cultivadas em meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute 1640; LGC Biotechnologia, Brasil) com adição de 10% de soro fetal bovino (SFB; Gibco), penicilina (1000 UI/mL, LGC Biotechnologia, Brasil) e estreptomicina (1000 UI/mL, LGC Biotechnologia, Brasil) dentro de garrafas plásticas. Posteriormente, essas garrafas foram incubadas em uma estufa com 5% de CO₂ a uma temperatura de 37 °C e foram realizadas duas passagens semanais visando manter a concentração de 4,0x10⁵ células/mL.

4.10.2 Ensaio de fagocitose

Após a preparação dos monócitos THP-1 como descrito no item anterior, foram realizados ensaios com o objetivo de verificar a taxa de fagocitose dessas células após interação com as células bacterianas. Para tal, 1,0x10⁵ monócitos foram expostos a diferentes multiplicidades de infecção (MOI 1 e 10), onde a quantidade de células de monócitos é fixa e a de células bacterianas varia em relação aos monócitos. Para isso, as células bacterianas R-PN e NR-PN, foram previamente preparadas conforme descrito nos itens 4.3.1 e 4.3.2, na superfície de membranas de celofane. Após o período de incubação as células foram removidas do celofane e lavadas com 1 mL de tampão fosfato salina (PBS; Laborclin, Brasil), diluídas e semeadas em BAS para a realização da contagem do número de UFC/ mL e a verificação da padronização do inóculo. Posteriormente, esse conteúdo foi transferido para microtubos aos quais foram adicionados 15 µL do marcador de ácido nucleico SYTO 9 (Thermo Fisher

Scientific) na concentração de $2,5 \times 10^3$ nM e os tubos incubados por 20 min a 37 °C na ausência de luz. Posteriormente, o conteúdo foi centrifugado a 2000 g por 4 min e o sedimento, ressuspenso em 1 mL de PBS dando origem a MOI 10. Para atingir a MOI 1, foi realizada uma diluição de 1:10 em PBS a partir da MOI 10.

Alíquotas de 100 μ L das suspensões bacterianas refratárias e não refratárias foram transferidas para microtubos contendo $1,0 \times 10^5$ monócitos e por fim, os tubos foram incubados durante 30 min a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂. Após a incubação, foi adicionado 300 μ L de azul de Evans (Sigma, St. Louis, MO, EUA) diluído de 1:100, a fim de excluir a fluorescência das bactérias aderidas a membrana do monócito as quais não foram fagocitadas, uma vez que esse corante bloqueia a emissão de fluorescência no comprimento de onda do SYTO9 e não consegue penetrar dentro do monócito. Como controle do experimento o azul de Evans foi adicionado aos monócitos sem previa interação destes com as células bacterianas. Após um período de interação de 5 min, os tubos que tiveram a adição de azul de Evans foram centrifugados a 115 g durante 4 min e o sedimento foi ressuspenso em 200 μ L de PBS. Finalmente, as amostras foram adquiridas ao citômetro de fluxo *FACSCalibur* (BD). Foram adquiridos 20.000 eventos dentro de uma região baseada no tamanho e na granulidade das células viáveis. Para a análise da porcentagem das células fagocitadas e da média de intensidade de fluorescência, os dados foram analisados por meio do *Software FlowJo* 10.0. Os gráficos foram construídos descontando previamente o *background* de fluorescência fornecido pelo tubo controle dos valores obtidos nos tubos dos diferentes experimentos.

Adicionalmente, uma alíquota proveniente de cada uma das culturas de interação (MOI 1 e MOI 10) foi retirada para a realização de um ensaio de quantificação, visando avaliar a taxa de viabilidade bacteriana após um período de 30 min de interação. Para isso, o conteúdo foi transferido para microtubos, os quais foram centrifugados a 115 g durante 4 min e tiveram o sedimento ressuspenso em 1 mL de PBS. Este procedimento foi repetido novamente para que ocorra a remoção de todo meio de cultura. Posteriormente, foi realizada uma nova centrifugação e o sedimento foi ressuspenso em 1 mL de Triton X-100 0,1% para que os monócitos sejam lisados. Por fim, o conteúdo foi diluído e semeado em placas de BAS.

5. RESULTADOS

5.1 Microscopia de fluorescência

A microscopia de fluorescência foi realizada visando comprovar a interação de *S. pyogenes*, na qualidade de células refratárias ou não refratárias a penicilina, com o hospedeiro (*C. elegans*). Células de *S. pyogenes* R-PN (Figura 3) e NR-PN (Figura 4) foram visualizadas ao longo de toda estrutura física do nematoide, demonstrando que a interação entre a célula bacteriana e o animal de fato ocorre, independente do fenótipo da célula bacteriana. Podemos também observar um grande acúmulo das células de *S. pyogenes*, em ambas as condições, na faringe do nematoide, indicando sua ingestão pelo animal (Figuras 3D e Figura 4D).

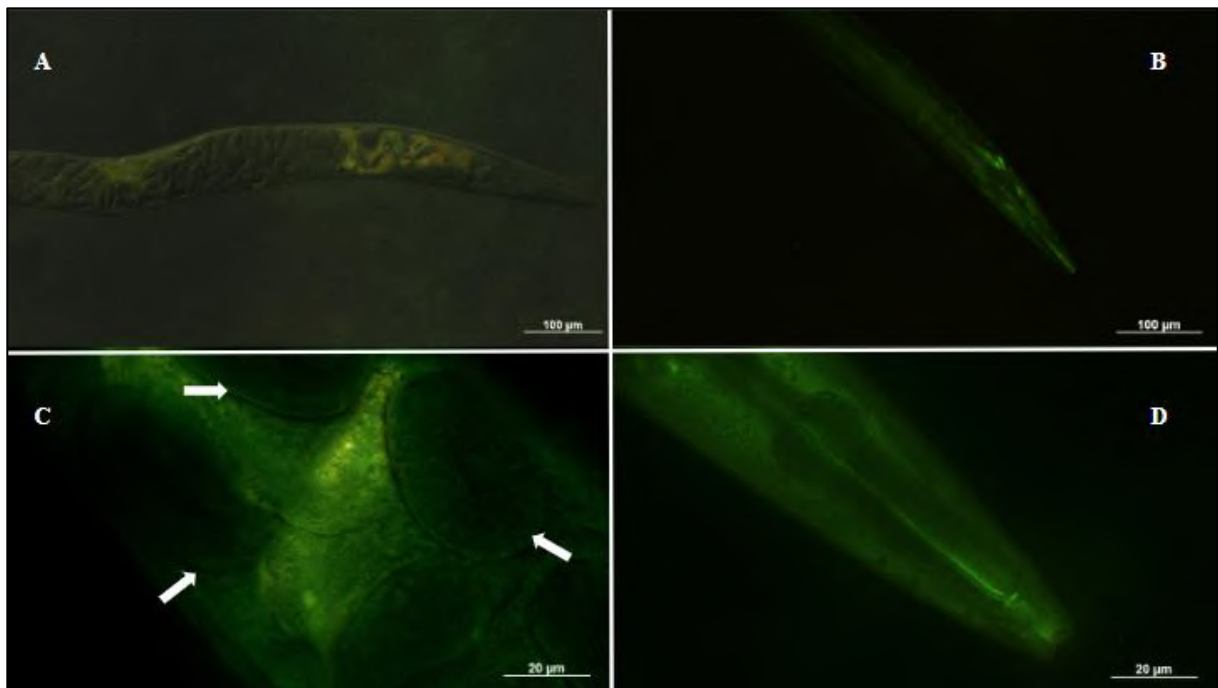


Figura 3 - Microscopia de fluorescência de *C. elegans* expostos a células de *S. pyogenes* refratárias a penicilina (R-PN) marcadas com SYTO9. **A e B.** Presença das células refratárias ao longo de toda estrutura física do nematoide. **C.** Presença de bactérias no útero do animal; as setas apontam para os ovos presentes no local. **D.** Faringe de *C. elegans* com grande acúmulo de células de *S. pyogenes* R-PN.

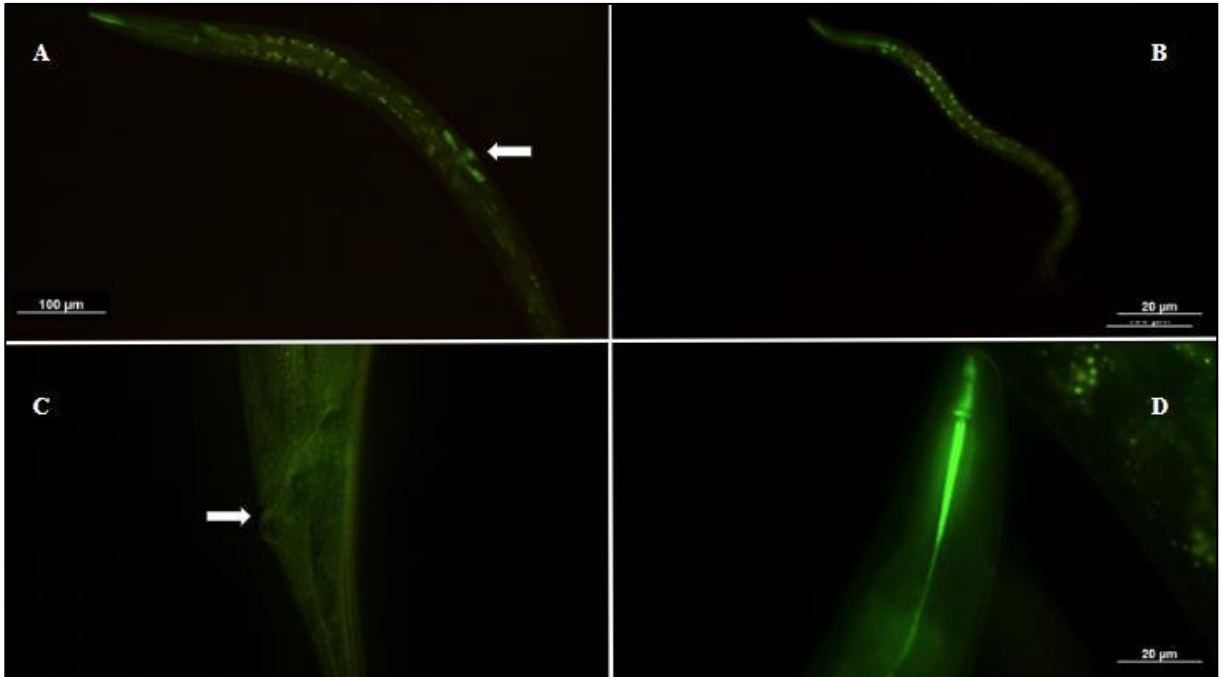


Figura 4 - Microscopia de fluorescência de *C. elegans* após interação com células de *S. pyogenes* não refratárias a penicilina (NR-PN) marcadas com SYTO9. **A e B.** Presença das células não refratárias de *S. pyogenes* ao longo de toda estrutura física do nematoide. **A.** A seta aponta para a vulva com aglomeração de bactérias. **C.** A seta mostra a concentração de bactérias no ânus do nematoide. **D.** Faringe de *C. elegans* com grande acúmulo de células de *S. pyogenes* NR-PN.

5.2 Teste de sobrevivência

A sobrevivência do nematoide *C. elegans* foi avaliada frente a células de *S. pyogenes* R-PN e NR-PN. Foram analisados um total de 1995 nematoides, sendo 863 frente as células NR-PN, 902 com células R-PN e 230 submetidos a presença de *E. coli* (controle). Os dados gerados apontam uma maior taxa de mortalidade dos animais quando exposto às células refratárias a penicilina ($p < 0,0001$). Após um período de 24h de exposição, os nematoides que estavam em contato com as células R-PN apresentaram um índice de 51,7% de sobrevivência. No entanto, nos animais expostos as células NR-PN esse índice foi de 79,5% (Figura 5).

Ademais, durante o monitoramento diário, foi constatado que os animais que interagiram com as células de *S. pyogenes* refratárias à penicilina encontravam-se vagarosos, com motilidade reduzida e presença diminuta de ovos quando em comparação com aqueles que foram expostos às células NR-PN.

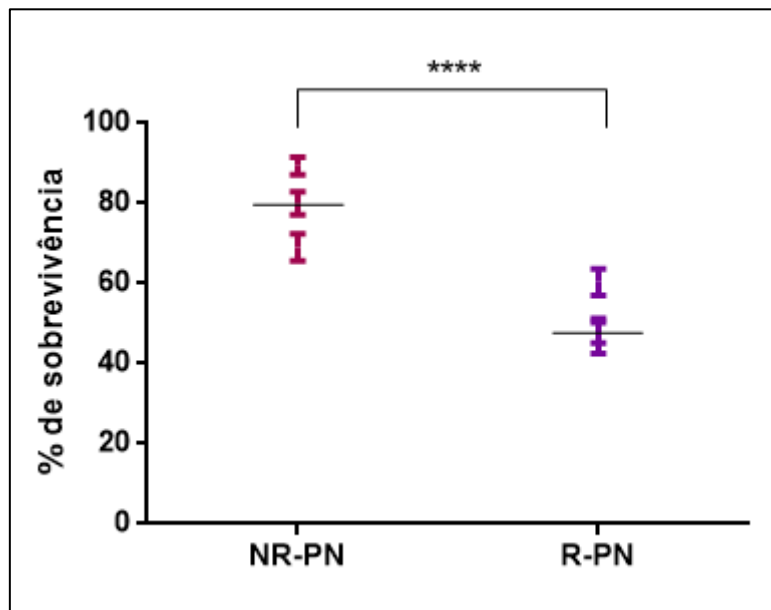


Figura 5 - Ensaio de sobrevivência de *C. elegans* quando expostos às células de *S. pyogenes* não refratárias (NR-PN) e refratárias a penicilina (R-PN) ao final de 24 h de interação. ****, $p < 0,0001$.

5.3 Microscopia óptica de Contraste por Interferência Diferencial (CID)

A microscopia óptica de CID foi realizada com o propósito de identificar e quantificar as lesões promovidas pelas células de *S. pyogenes* R-PN (Figura 6) e NR-PN (Figura 7). Para tal foram avaliados um total de 60 animais sendo que metade destes tinham interagido com células R-PN e a outra metade com as NR-PN. Foram analisadas alterações morfológicas em estruturas bem preservadas do nematoide como o intestino, a vulva e a cutícula. Dessa forma, verificamos alterações morfológicas em 43,3% dos animais que interagiram com as células de *S. pyogenes* R-PN e em 6,7% dos expostos às células NR-PN após 24 h de interação (Figura 8).

Além disso, foi possível observar alterações na oviposição quando comparamos *C. elegans* expostos as células de *S. pyogenes* R-PN e NR-PN. Em 100% dos animais expostos a células R-PN foi observada eclosão interna, e em muitas destas as larvas geradas romperam as paredes dos órgãos do nematoide, sendo responsáveis por lesões e pela desorganização do corpo da progenitora, levando-a à morte (Figura 8). Esse fenômeno é descrito como endotoquia

matricida (Johnigk e Ehlers, 1999). Nos nematoides expostos a células NR-PN a taxa de eclosão interna observada foi de 26,78% (Figura 8).

Adicionalmente, identificamos a presença de estruturas esféricas semelhantes a bolhas apoptóticas no interior do animal em 100% dos nematoides que interagiram com as células R-PN (Figura 6D) e 80% nos expostos as NR-PN (Figura 8).

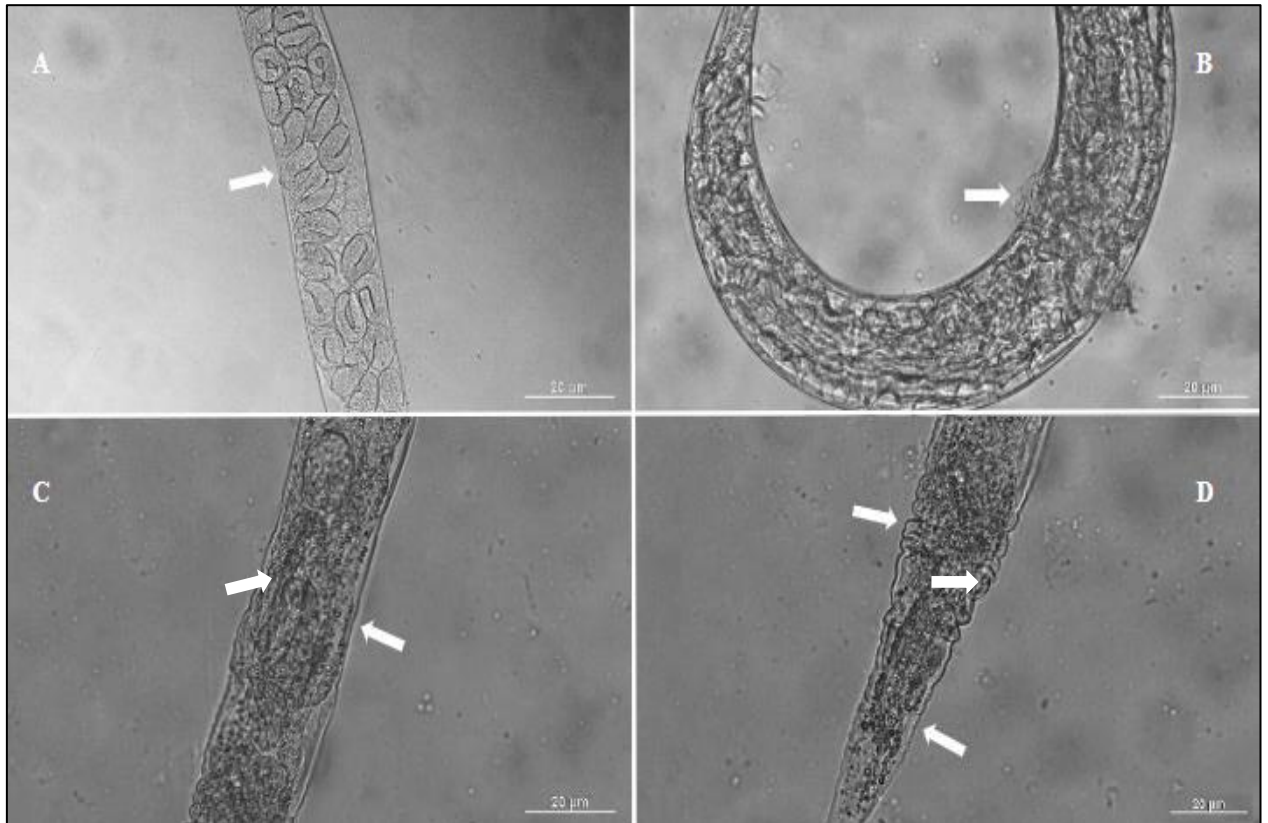


Figura 6 - Microscopia óptica de CID de *Caenorhabditis elegans* expostos as células de *S. pyogenes* 37-97 refratárias a penicilina (R-PN). **A.** A seta aponta as larvas geradas dos ovos que foram incapazes de realizar a oviposição. **B-D.** Nematoides que exibiram alteração no padrão morfológico. **B.** Alteração na vulva do animal. **C.** Degeneração de tecidos internos. **D.** Alteração na cutícula e presença de bolhas apoptóticas.

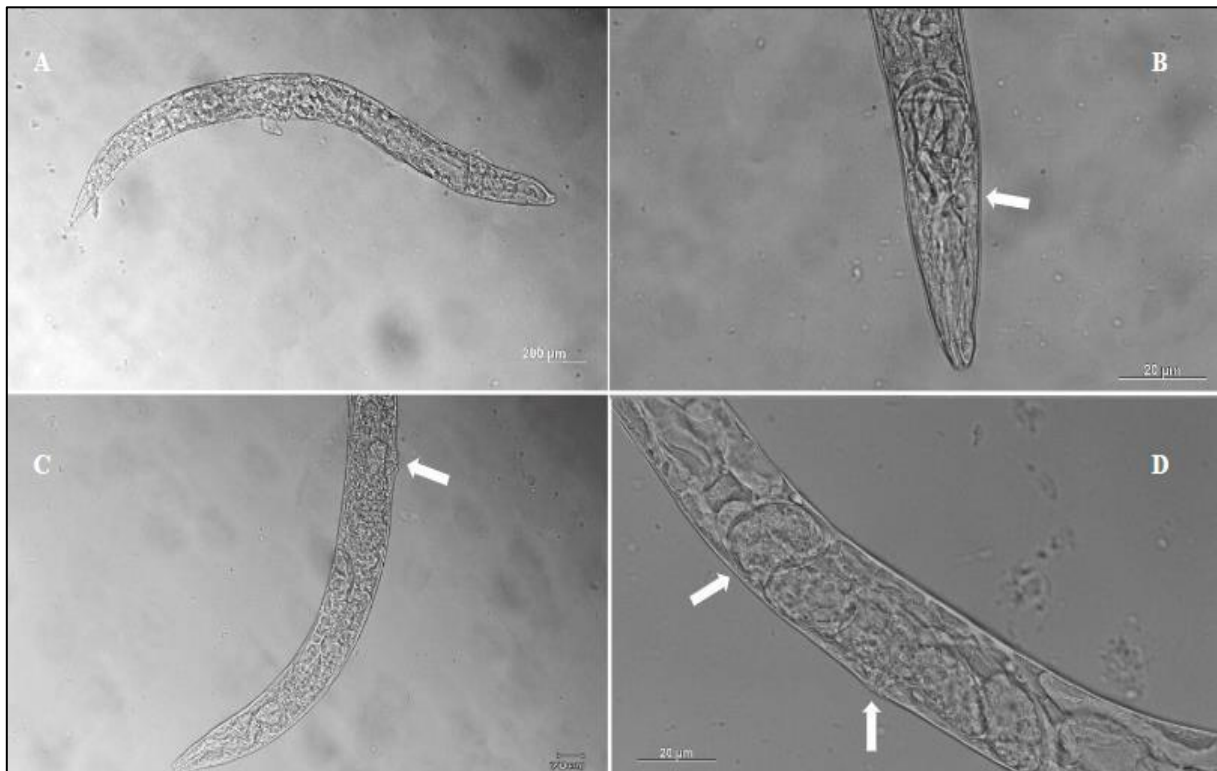


Figura 7 - Microscopia óptica de CID dos nematoides que interagiram com as células de *S. pyogenes* 37-97 não refratárias a penicilina (NR-PN). **A-C**. Animais com a morfologia íntegra. **B**. As setas apontam para a cutícula íntegra. **C**. As setas apontam para a vulva bem preservada. **D**. Nematóide com ovos no útero. As setas mostram os ovos e a estrutura da vulva bem preservada.

Por intermédio da microscopia de CID, foi possível verificar que as alterações na estrutura interna e na cutícula são predominantemente associadas às células de *S. pyogenes* R-PN (Figura 6). Esses resultados estão coerentes com os apresentados no ensaio de sobrevivência, onde as células R-PN apresentaram uma maior capacidade de matar o nematóide.

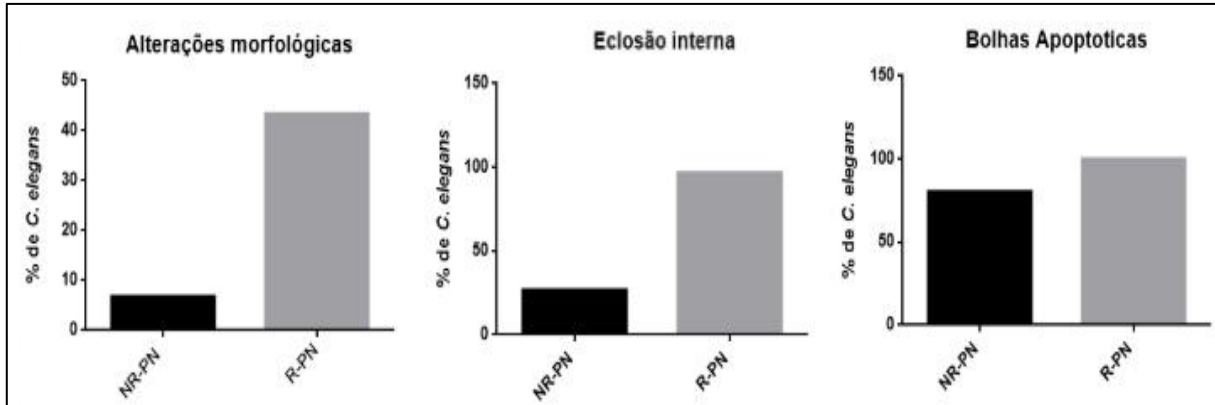


Figura 8 - Parâmetros verificados na microscopia óptica de contraste por interferência diferencial em nematoides *C. elegans* expostos a células de *S. pyogenes* 37-97 refratárias à penicilina (R-PN) e não refratárias à penicilina (NR-PN).

5.4 Quantificação de células de *S. pyogenes* R-PN e NR-PN dentro de *C. elegans*

Por meio do ensaio de quantificação das bactérias presentes no interior de *C. elegans* foi constatado, no segundo dia de interação, um número de UFC por nematoide maior naqueles animais que ingeriram as células R-PN, enquanto comparado com os nematoides expostos às células NR-PN (Figura 9). A amostra de *E. coli* OP50 utilizada normalmente pelo animal como alimento para sua manutenção no laboratório foi utilizada como controle.

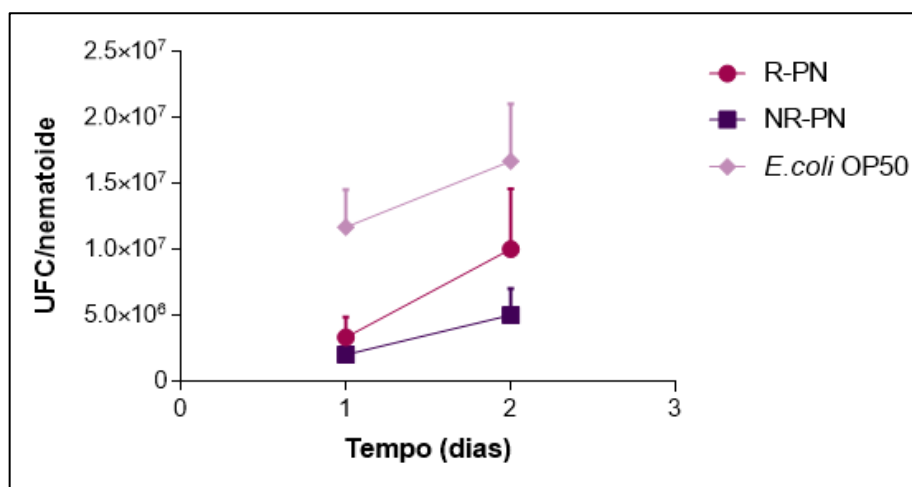


Figura 9 - Ensaio de quantificação de células viáveis de *S. pyogenes* 37-97 refratárias (R-PN) e não refratárias à penicilina (NR-PN) dentro do nematoide.

5.5 Comparação da expressão gênica *in vitro* e *in vivo*.

Os níveis transcricionais de genes relacionados com estresse oxidativo e alguns outros fatores de virulência foram analisados. É importante ressaltar que nas análises de expressão gênica, somente as variações ao menos duas vezes maiores em comparação com a amostra calibradora (*S. pyogenes* NR-PN) foram consideradas significativas (Côrtes *et al.*, 2015).

Além de células crescidas *in vitro*, os RNAs foram também extraídos de células de *S. pyogenes* refratárias e não refratárias a penicilina, obtidas do interior de *C. elegans*. Nesse modelo as células bacterianas foram recuperadas do interior do nematoide após 24 horas de interação e tiveram seu RNA extraído e tratado para serem analisados através da técnica de qRT-PCR. Com o objetivo de elaborar um estudo comparativo, nos ensaios *in vitro* e *in vivo* foi estudada a expressão dos mesmos genes (Tabela 3 e Tabela 4).

Tabela 3. Genes associados ao estresse oxidativo, proteínas que são codificadas por eles e suas funções preditas por meio de homologia.

Gene ¹ /Locus	Proteína	Processo biológico
<i>nox</i> / <i>MGAS10750_Spy1021</i>	NADH oxidase formadora de H ₂ O	NADH oxidase formadora de H ₂ O
<i>sodA</i> / <i>MGAS10750_Spy1252</i>	Superóxido desmutase	Atividade de superóxido desmutase
<i>perR</i> / <i>MGAS10750_Spy0167</i>	Proteína reguladora da captura do ferro	Resposta ao peróxido de hidrogênio, dependente da concentração intracelular de ferro

¹Anotação por homologia conforme o Uniprot.

Tabela 4. Genes associados a importantes fatores de virulência de *S. pyogenes*, proteínas que são codificadas por eles e suas funções preditas por meio de homologia.

Gene¹/Locus	Proteína	Processo biológico
<i>mga</i> / <i>MGAS10750_Spy1811</i>	Regulador positivo	Regulador
<i>inlA</i> / <i>MGAS10750_Spy1208</i>	Proteína internalina	Proteína extracelular envolvida na invasão
<i>ska</i> / <i>MGAS10750_Spy1778</i>	Estreptoquinase	Atividade quinase/ ativação do plasminogênio
<i>lmb</i> / <i>MGAS10750_Spy1805</i>	Proteína de ligação à laminina	Adesão celular
<i>scpA</i> / <i>MGAS10750_Spy1807</i>	C5a peptidase	Atividade endopeptidase
<i>slo</i> / <i>MGAS10750_Spy0147</i>	Estreptolisina O	Atividade de toxina
<i>fbp</i> / <i>NGAS743_0795</i>	Proteína de ligação à fibronectina	Componente da membrana celular
<i>emm</i> / <i>NGAS743_DI49240</i>	Proteína M	Patogênese/fagocitose
<i>MGAS10750_Spy1285</i>	Hialuronoglicosaminidase	Formação da cápsula
<i>speA</i> / <i>MGAS10750_Spy1277</i>	Superantígeno A	Patogênese
<i>speB</i> / <i>MGAS10750_Spy1828</i>	Exotoxina B	Atividade de cisteína-protease

¹Anotação por homologia conforme o Uniprot.

Nos ensaios *in vitro*, foi constatado que os genes homólogos a *sodA* e *perR*, que codificam para superóxido desmutase e para uma proteína repressora relacionada com a concentração intracelular de ferro, respectivamente, apresentaram uma diminuição em relação à transcrição gênica. Verificou-se diminuição na expressão de 2x ($p=0,0002$) e de 2,1x ($p\leq 0,0001$), para os homólogos dos genes *sodA* e *perR*, respectivamente. O gene homólogo ao *nox* exibiu um aumento na expressão de 1,2x ($p=0,055$). Entretanto, esse aumento não foi considerado significativo (Figura 10).

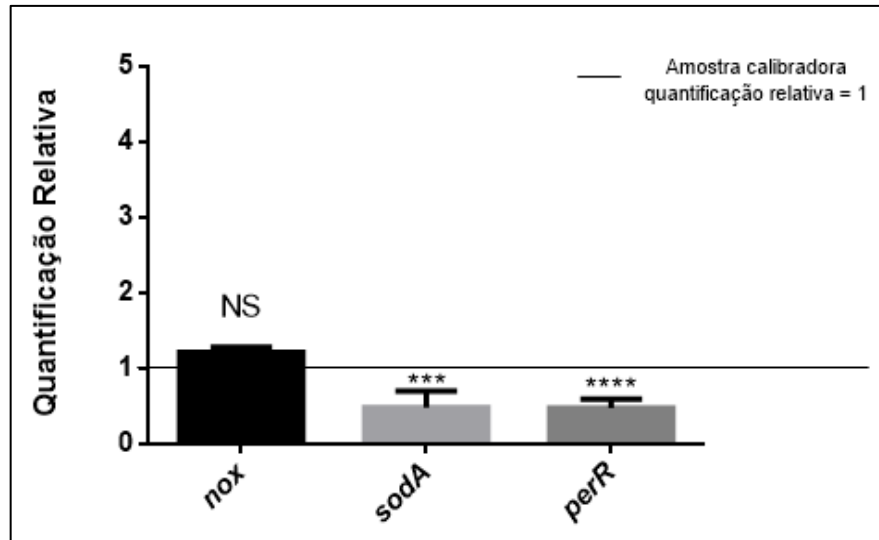


Figura 10 - Expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo em células *S. pyogenes* 37-97 refratárias a penicilina (R-PN) em ensaios *in vitro*. Para a amostra calibradora (NR-PN) foi atribuída a quantificação relativa de 1 (representada pela linha horizontal). ***, $p < 0,0005$; ****, $p < 0,0001$

No estudo de expressão de genes associados ao estresse oxidativo em células de *S. pyogenes* que foram expostas ao hospedeiro *C. elegans*, os resultados encontrados foram similares ao observado no experimento *in vitro* para o gene homólogo à *soda* (Figura 11). A expressão deste apresentou-se 1,6x ($p \leq 0,0001$) inferior quando comparada com a amostra calibradora. No entanto, a expressão dos genes análogos ao *nox* e ao *perR* foram divergentes *in vivo* e *in vitro*, uma vez que após interação com o *C. elegans*, foi observada redução de 2,6x ($p \leq 0,0001$) e aumento de 3,2x ($p \leq 0,0001$) na expressão desses genes, respectivamente (Figura 11).

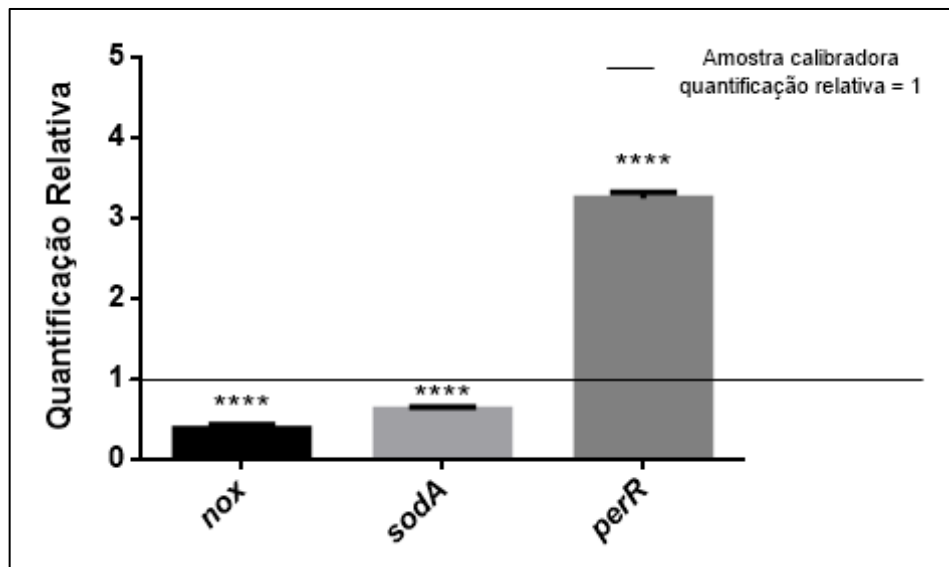


Figura 11. Expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo em células de *S. pyogenes* 37-97 refratárias a penicilina (R-PN) em ensaios *in vivo*, após a interação com o hospedeiro *C. elegans*. Para a amostra calibradora (NR-PN) foi atribuída a quantificação relativa de 1 (representada pela linha horizontal). ****, $p < 0,0001$.

Com relação a expressão de outros genes de virulência na patogenicidade de *S. pyogenes* em células R-PN e NR-PN, *in vitro* verificou-se uma superexpressão para os genes *scpA* e *MGAS10750_Spy1285* em 4,3x ($p = 0,003$) e 2,2x ($p = 0,0005$), respectivamente, nas células R-PN em relação as NR-PN (Figura 14). Os genes *emm* e *speA* também apresentaram um aumento de expressão. Esse aumento foi de 1,1x ($p = 0,4178$) no gene que codifica para a proteína M e de 3,2x ($p \leq 0,0001$) no que codifica para o superantígeno A. Para o gene *mga* somente um aumento na expressão de 0,2x ($p = 0,7253$) em relação a amostra calibradora foi encontrado. Os genes *inlA*, *ska*, *lmb*, *slo* e *fbp* exibiram uma diminuição na expressão de 2,7x ($p \leq 0,0001$), 1,6x ($p = 0,001$), 3,4x ($p \leq 0,0001$), 1,7x ($p = 0,0002$) e 4,3x ($p \leq 0,0001$), respectivamente. O gene *speB* destacou-se por apresentar uma diminuição de 1.000x ($p \leq 0,0001$) em relação a amostra calibradora (Figura 14).

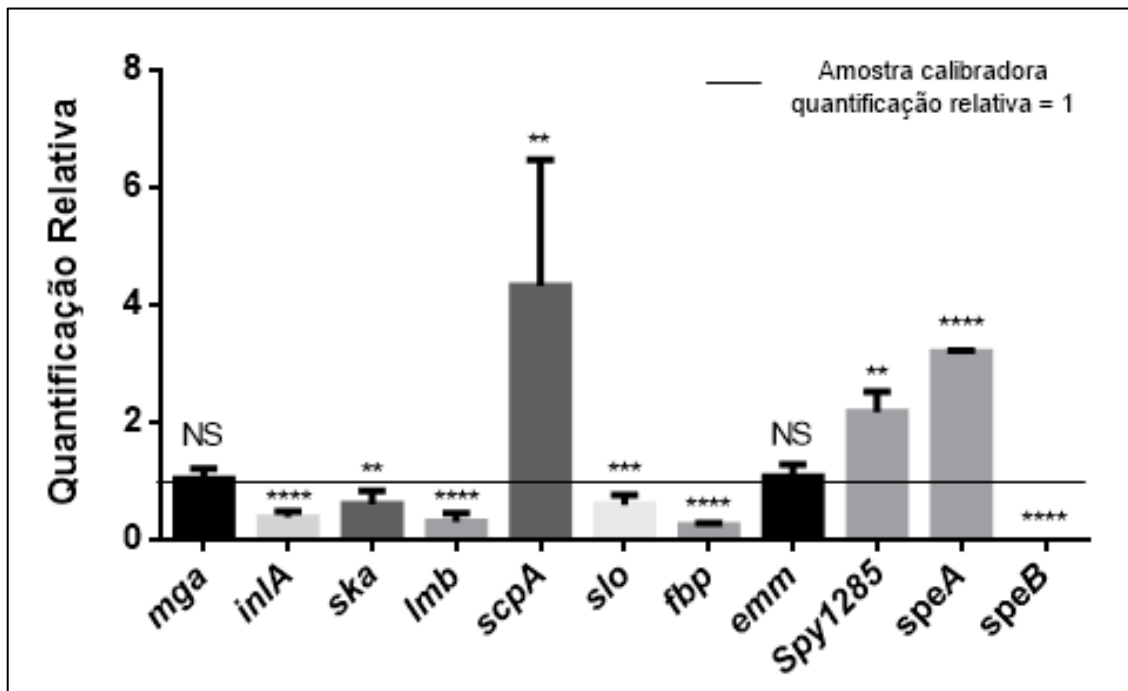


Figura 12 - Expressão de genes relacionados a fatores de virulência em células de *S. pyogenes* 37-97 refratárias a penicilina (R-PN) em ensaios *in vitro*. Para a amostra calibradora (NR-PN) foi atribuída a quantificação relativa de 1 (representada pela linha horizontal).

Em relação a expressão gênica de células R-PN e NR-PN que interagiram com o nematoide, os genes *ska*, *scpA* e *slo* apresentaram aumento nos níveis transcricionais nas células R-PN em 4x ($p \leq 0,0001$), 1,9x ($p = 0,0008$) e 2,3x ($p \leq 0,0001$). Os genes *MGAS10750_Spy1285* e *speA* apresentaram redução na expressão de 1,9x e 1,8x ($p \leq 0,0001$, para ambos), a diminuição, entretanto, foi maior nos genes *mga*, *inlA*, *lmb*, *fbp* e *emm*. Em números, esses decréscimos foram de 20x ($p < 0,0001$), 7,7x ($p \leq 0,0001$), 16,6x ($p \leq 0,0001$), 7,6x ($p \leq 0,0001$) e 4,3x ($p \leq 0,0001$), respectivamente. Os resultados obtidos na expressão do gene *speB* foram totalmente opostos em comparação com a expressão *in vitro*. No cenário *in vivo*, verificou-se uma superexpressão de 374x ($p \leq 0,0001$). Portanto, ao comparar expressão dos genes relacionados com a virulência *in vivo* e *in vitro*, verificou-se que em ambos há um aumento na expressão do gene *scpA* (1,9x e 4,3x, respectivamente). Entretanto, o aumento na expressão observado nos ensaios *in vitro* dos genes *MGAS10750_Spy1285* e *speA* não foram repetidos nos ensaios *in vivo*, que por sua vez exibiu aumento na expressão dos genes *ska*, *slo* e *speB*.

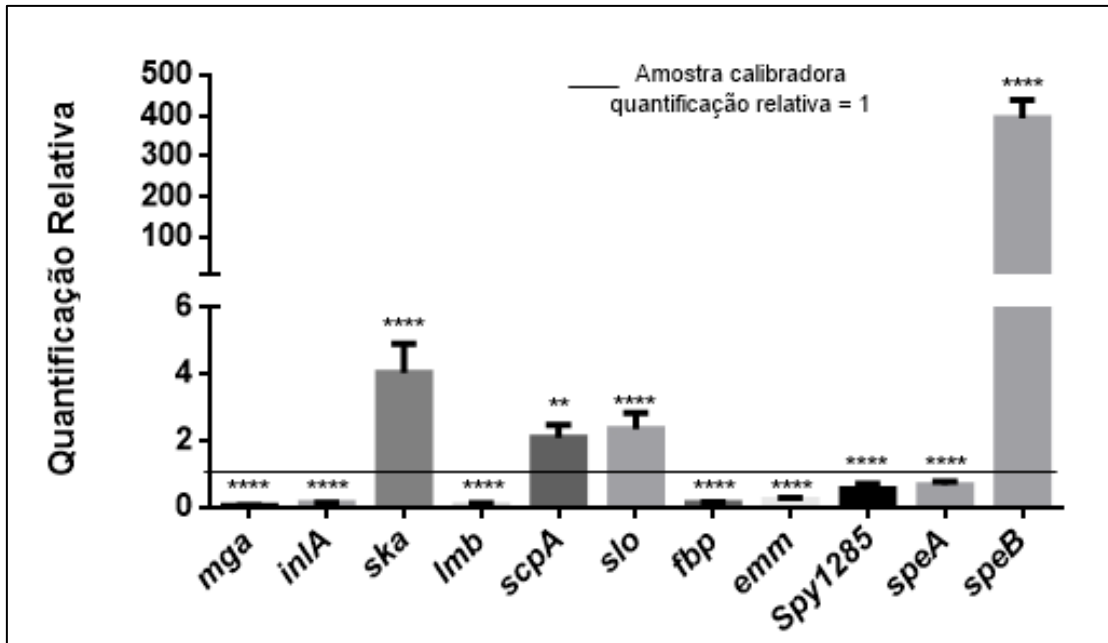


Figura 13 - Expressão de genes relacionados a fatores de virulência em células de *S. pyogenes* 37-97 refratárias a penicilina (R-PN) em ensaios *in vivo*, após a interação com o hospedeiro *C. elegans*. Para a amostra calibradora (NR-PN) foi atribuída a quantificação relativa de 1 (representada pela linha horizontal). **, $p < 0,005$; ****, $p < 0,0001$.

5.6 Fagocitose

O ensaio de fagocitose foi executado com a finalidade de avaliar se as bactérias refratárias e não refratárias são fagocitadas na mesma intensidade por monócitos humanos. Os resultados relatados abaixo são preliminares, uma vez que um número maior de experimentos deve ser realizado. Nos resultados obtidos, a média de intensidade de fluorescência sugere que a quantidade de bactérias dentro dos monócitos é maior na MOI 10, tanto em relação a células R-PN quanto a NR-PN (Figura 16). Esse resultado era esperado devido ao fato da MOI 10 apresentar uma maior concentração bacteriana (10 bactérias para um monócito) em comparação a MOI 1 (1:1). A média de intensidade emitida pelas células R-PN na MOI 10 foi de 383 enquanto que na MOI 1 foi de 86,4. As células NR-PN apresentaram uma média de intensidade de 226 na MOI 10 e 162 na MOI 1.

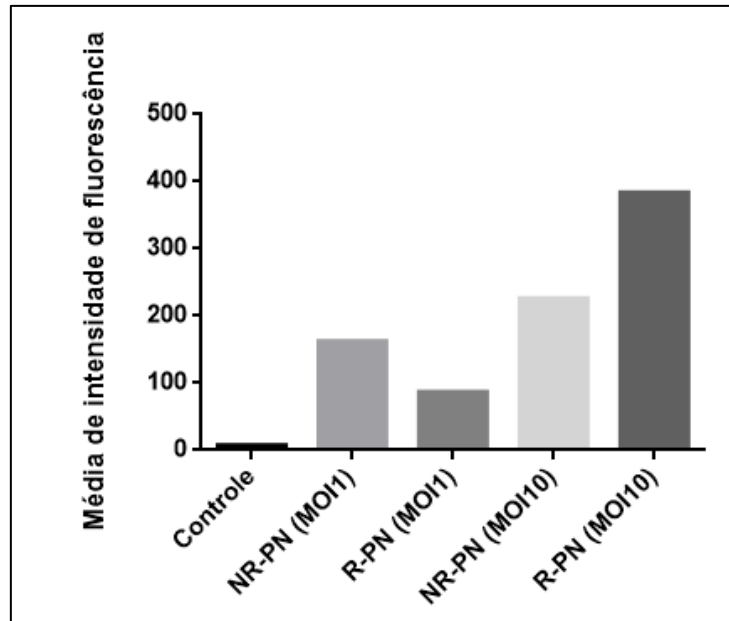


Figura 14 - Média de intensidade de fluorescência. O controle foi preparado somente com a adição de Azul de Evans na cultura de monócitos. Nos demais, adicionou-se as células R-PN e NR-PN nas MOIs 1 e 10.

Em relação a população de bactérias que foram fagocitadas, 32,6% dos monócitos fagocitaram a população de células R-PN na MOI 10; em relação a MOI 1, esse número foi de 53,1%. Já frente as células NR-PN, 58,9% dos monócitos fagocitaram a população na MOI 10 e 63,4%, na MOI 1 (Figura 17). Logo, as células NR-PN foram mais fagocitadas em comparação com as células refratárias, tanto na MOI 1 quanto na MOI 10.

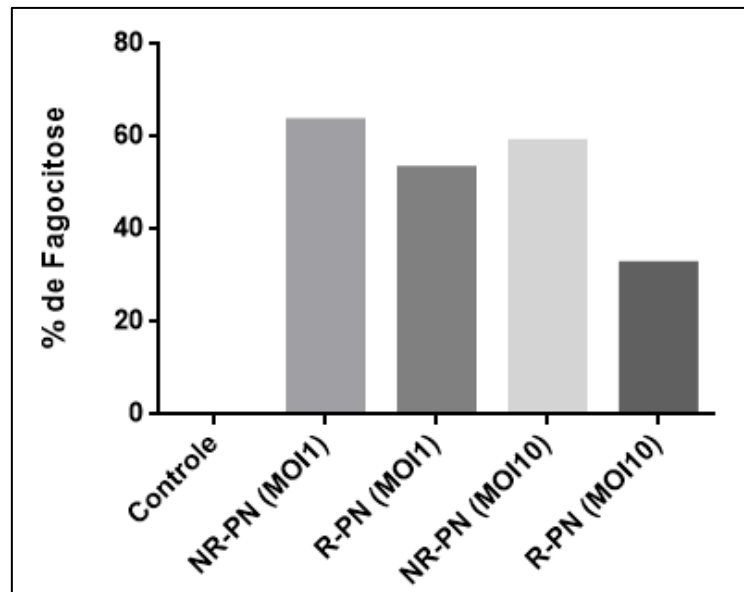


Figura 15 - Porcentagem de monócitos que fagocitaram *S. pyogenes* marcados por SYTO 9. O controle foi preparado somente com a adição de Azul de Evans na cultura de monócitos. Nos demais experimentos, adicionou-se aos monócitos as células de *S. pyogenes* R-PN ou NR-PN nas MOIs 1 ou 10.

No ensaio de quantificação de viabilidade bacteriana verificou-se um número de $3,3 \times 10^4$ UFC/mL de células refratárias viáveis na MOI 1 recuperadas de dentro do monócito, já na MOI 10, esse número foi de $3,1 \times 10^5$ UFC/mL (Figura 18). Em relação as células não refratárias na MOI 1, foram recuperadas $1,2 \times 10^5$ UFC/mL e na MOI 10, $1,3 \times 10^7$ UFC/mL. À vista disso, verificou-se que as células NR-PN na MOI 10 foram as células que mais sobreviveram dentro do monócito apesar de terem sido mais fagocitadas (58,9%). Apesar de serem menos fagocitadas (32,6%) as células R-PN sobrevivem menos dentro do monócito.

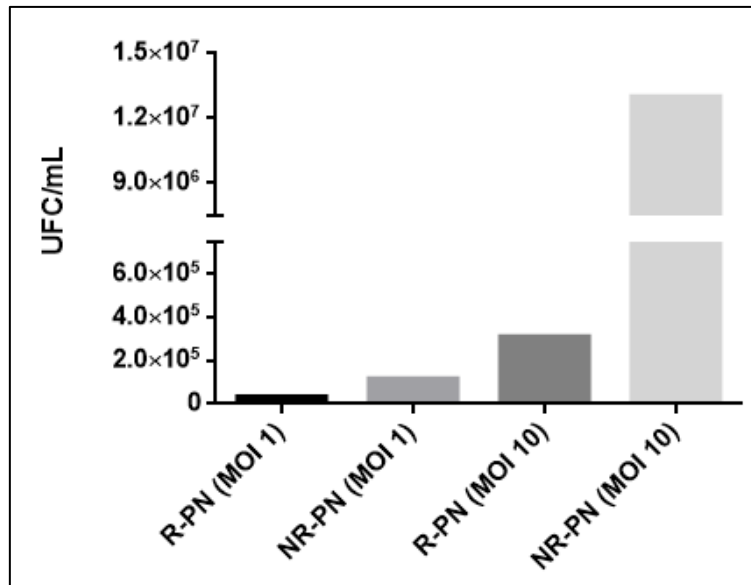


Figura 16 –Ensaio de quantificação de viabilidade bacteriana.

6. DISCUSSÃO

Streptococcus pyogenes é um patógeno responsável por uma ampla gama de doenças que variam de infecções leves (como a faringite) à invasivas e potencialmente fatais, tendo como exemplo a bacteremia e a fascíte necrotizante (Walker *et al.*, 2014). Apesar da conhecida suscetibilidade de *S. pyogenes* a esse β -lactâmico *in vitro*, existe muitos relatos de falhas terapêuticas em pacientes que utilizam a penicilina (Casey e Pichichero, 2007; Ogawa *et al.*, 2011). Com a finalidade de explicar essas falhas, foram pressupostas diferentes explicações, porém esse fenômeno até o momento ainda não foi realmente elucidado (Ogawa *et al.*, 2011). Em trabalho anterior do nosso grupo verificou-se em 211 amostras clínicas de *S. pyogenes* que todas exibiam a capacidade de refratariedade quando alta densidade celular era semeada em concentrações de penicilina correspondente a até 800 vezes a CMI (Coronado, 2012). Aprofundando os estudos sobre esse fenômeno, foi realizada a análise do genoma completo das amostras NR-PN e R-PN com o intuito de verificar se alguma mutação estaria envolvida com o surgimento deste fenótipo. Porém, nenhum SNP diferencial foi encontrado, o que eliminou essa hipótese (Martini, 2019). O fenômeno da refratariedade foi então associado a natureza fenotípica das amostras, visto que no trabalho de Martini (2019) foram analisados a expressão de genes envolvidos na biossíntese de aminoácidos e crescimento celular em células refratárias. Além disso, foi verificado o aumento da expressão de bombas de efluxo além da superexpressão de um sistema toxina-antitoxina (homólogo ao *hicA/hicB*). Corroborando com estes dados, Butt e colaboradores em 2014, verificaram que este sistema toxina-antitoxina estava associado a formação de células *persisters* em *Burkholderia pseudomallei*. À vista disso, concluiu-se que em *S. pyogenes* ao ser exposto ao β -lactâmico numa elevada densidade populacional, uma pequena parte da população bacteriana adaptou-se fenotipicamente as altas concentrações bactericidas e, por fim, tornaram-se persistentes.

Estudos das células *persisters* não se limitam ao conhecimento da geração deste fenótipo. Na literatura são encontrados trabalhos que estudam a virulência de *persisters* de outras espécies bacterianas como *S. aureus* e *E. coli*, mostrando que apresentam menor capacidade de gerar infecção em vários modelos experimentais (Mina e Marques, 2016). No entanto nenhum estudo sobre a virulência de células refratárias de *S. pyogenes* foi até então publicado. Visto que células *persisters* podem mudar o cenário de uma infecção, principalmente em pacientes debilitados e imunocomprometidos, neste trabalho buscamos comparar o

potencial de virulência entre células bacterianas refratárias a penicilina e células sensíveis. Para tal, foi empregado o modelo experimental de *C. elegans*.

O modelo experimental que emprega o nematoide *C. elegans* apresenta uma série de vantagens em relação ao clássico modelo murino, as quais foram responsáveis por torná-lo bastante utilizado em estudos de virulência. Entre estas temos, a fácil manipulação em condições de laboratório, a ausência de necessidade de aprovação pelo comitê de ética para realização dos experimentos, a alta taxa de oviposição (cada adulto põe cerca de 300 ovos), o baixo custo de manutenção, e a homologia de 60% a 80% entre seu genoma e o de mamíferos (Blaxter, 2011; Son *et al.*, 2019).

É interessante ressaltar que a utilização da técnica de microscopia de fluorescência promoveu a visualização das células R-PN e NR-PN na parte externa e também no interior da estrutura física do animal. Isso confirma que o modelo pode ser usado para estudos com *S. pyogenes* e demonstra que a interação não é apenas externa, mas que o *S. pyogenes* é ingerido pelo *C. elegans* podendo liberar suas enzimas no interior do animal.

No que se refere aos nematoides que interagiram com as células não refratárias, foi observado que embora a interação tenha gerado alterações morfológicas, estas não foram tão significativas a ponto de interferir na oviposição e no ciclo de vida do animal. Ao contrário, as células R-PN de *S. pyogenes* promoveram alterações morfológicas e na oviposição em quase 50% e na totalidade dos nematódeos, respectivamente. Células R-PN de *S. pyogenes* também promoveram uma maior taxa de mortalidade do animal quando comparadas às células NR-PN. É importante ressaltar que nossos resultados foram divergentes dos publicados por Mina e Marques, que estudaram o potencial de virulência de *persister* de *S. aureus* empregando os modelos de *C. elegans* e de *Arabidopsis thaliana* (Mina e Marques, 2016). Este último é uma pequena planta utilizada como modelo para avaliar a virulência e patogenicidade bacteriana, já que seu sistema imune inato apresenta semelhanças com o sistema imunológico inato de mamíferos (Nishimura e Dangl, 2011). Os autores verificaram que *persisters* de *S. aureus* são menos virulentos por apresentarem uma menor taxa de mortalidade em *C. elegans* e não serem capazes de infectar as células de *A. thaliana* (Mina e Marques, 2016). Entretanto, Yee e colaboradores observaram que *persisters* de *S. aureus* em modelos animais de *C. elegans* causaram uma maior mortalidade dois dias após a infecção (Yee *et al.*, 2019). Resultados estes que condizem com os apresentados neste trabalho.

No ensaio de quantificação de células refratárias e não refratárias presentes no interior de *C. elegans*, foi verificado no segundo dia de interação maior número de UFC por nematoide para aqueles animais que interagiram com as células R-PN.

O nematoide *C. elegans* possui um sistema quimiossensorial bem desenvolvido, e devido a isso o animal tem a capacidade de detectar sinais olfativos e gustativos ligados a alimentos presentes no ambiente, perigos e também a presença de outros animais (Shingai *et al.*, 2014; Hoang e Miller, 2017). As indicações quimiossensoriais são responsáveis pelo escape da circunstâncias de risco, por alterações na motilidade e pela entrada e saída da célula do estágio *Dauer*, fase em que o nematoide encontra-se resistente a estresses ambientais e pode manter-se na ausência de alimento (Bargmann, 2006). Mesmo assim, aparentemente as células refratárias mascaram seu potencial risco, permitindo ser ingerida pelo nematoide e dessa forma, exibem seu potencial patogênico refletido em suas lesões e mortalidade após ingestão.

O animal possui uma classe de neurônios gustatórios, composta por dois neurônios que são morfologicamente simétricos: ASE esquerda (ASEL) e ASE direita (ASER). ASEL é responsável para atrair os nematoides para o íon Na^+ e o ASER, para atração pelo Cl^- e pelo K^+ . Além disso, um aumento nas concentrações de NaCl induz a ativação do ASEL. De maneira oposta, a diminuição nas concentrações de NaCl ativa o ASER. A atividade desses neurônios está relacionada ao comportamento do animal, uma vez que o ASEL induz a reação de ir em frente, enquanto que o ASER induz a reação de dar a volta (Pierce-Shimomura *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2008; Ortiz *et al.*, 2009). Por outro lado, o nematoide também é atraído por moléculas de butanona e álcool isoamílico (Shingai *et al.*, 2014).

Em 2002, Jansen e colaboradores realizaram um estudo de patogênese de *S. pyogenes* no modelo de *C. elegans*. Nesse trabalho, os autores demonstram que a morte dos nematoides é mediada devido às concentrações de H_2O_2 produzido pela bactéria. Além disso, eles afirmam que a morte dos animais não é causada por processos semelhantes a infecções nem por exotoxinas estreptocócicas (Jansen *et al.*, 2002). Em 2015, Bhatla e Horvitz verificaram como a presença de H_2O_2 afeta a sensação gustativa em *C. elegans*. Os resultados mostraram que os receptores gustativos GUR-3 e LITE-1 induzem a inibição da alimentação e promovem a evasão locomotora em resposta ao peróxido de hidrogênio (Bhatla e Horvitz, 2015).

Portanto, com os resultados apresentados neste trabalho diversas hipóteses podem ser formuladas para explicar o maior número de UFC por nematoide exibido nos animais que se alimentaram das células R-PN de *S. pyogenes*. Essas células poderiam produzir maiores quantidades de íons e moléculas responsáveis por estimular os receptores gustativos e assim,

atrair os animais e despertar o apetite. Outra explicação para o resultado seria a menor produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), incluindo o peróxido de hidrogênio pelas células refratárias quando em comparação com as células não refratárias. Assim, os nematoides não escapariam de uma bactéria que aparentemente seria menos agressiva a eles devido a menor produção de ROS. Entretanto, se esta hipótese estiver correta, outros mecanismos podem ser responsáveis por induzir a morte em *C. elegans* e não somente a produção de H_2O_2 , uma vez que nos resultados dos ensaios de sobrevivência deste trabalho, as células refratárias induziram maior taxa de mortalidade. Logo, a expressão dos fatores de virulência é importante para a patogênese promovida pelas células refratárias.

A literatura aponta que estudos *in vivo* com células de *S. pyogenes* indicam que durante a infecção de tecidos moles de camundongos, a bactéria promove a regulação de genes envolvidos na proteção ao estresse oxidativo (Graham *et al.*, 2006). Além disso, em estudos que simularam a infecção bacteriana em sangue humano, demonstraram a regulação negativa dos genes da glicólise e a indução de genes envolvidos no catabolismo de aminoácidos, além de vários tipos de genes de virulência (Graham *et al.*, 2005). Portanto, esses resultados sugerem que *S. pyogenes* altera seu nível de expressão de fatores de virulência e vias metabólicas para se adaptar ao ambiente hospedeiro.

Durante o processo de estabelecimento de uma infecção uma série de vias biológicas transcorrem simultaneamente. Devido a isso, é necessário que o microrganismo possua sistemas reguladores que ordenem mudanças na expressão gênica de acordo o estágio de desenvolvimento da infecção. Nesse âmbito, a resposta da bactéria frente ao estresse oxidativo são fundamentais pois representam a adaptação do patógeno a um ambiente hostil (hospedeiro). O estresse oxidativo é o produto das espécies reativas de oxigênio (ROS) e podem ser responsáveis por danificar ácidos nucleicos, proteínas e membranas celulares tanto em eucariotos como em procariotos. Dependendo da concentração, ROS podem ser essenciais ou prejudiciais à sobrevivência celular (Henningham *et al.*, 2015).

A proteína superóxido desmutase A (SodA) corresponde a primeira linha de defesa contra o estresse por superóxido. Em sua atividade, a proteína converte superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e $2 OH^-$ (Liochev e Fridovich, 2007). Entretanto, *S. pyogenes* não sintetiza a enzima catalase para degradar o H_2O_2 . Por isso, a bactéria depende da produção de enzimas que atuam para neutralizar peróxidos endógenos e exógenos (Brenot, King e Caparon, 2005). Uma dessas enzimas é a NADH oxidase (NoxA), a qual atua na decomposição de H_2O_2 e na recuperação de NAD^+ , que desempenha um papel central em diversas vias

metabólicas da bactéria, tal qual o reparo de DNA e apoptose (Massudi *et al.*, 2012). A regulação da resposta ao estresse por peróxido decorre por meio do regulador transcricional PerR, o qual é um regulador negativo, sendo uma metaloproteína dependente de zinco que é membro de uma família de reguladores transcricionais de ligação de metais do regulador da absorção férrica (Fur, do inglês: *ferric uptake regulator*).

No presente trabalho foi observado que nenhum dos genes associados à estresse (*nox*, *sodA* e *perR*) apresentou um aumento de expressão significativo nas células refratárias nos ensaios *in vitro*. Já nos experimentos *in vivo*, o gene homólogo ao *perR* manifestou um aumento de 3,2x na sua expressão. Em 2002, Ricci, Janulczyk, e Björck realizaram um estudo utilizando uma cepa mutante de *S. pyogenes* com nocaute no gene *perR* com o objetivo de verificar a influência da proteína no metabolismo da bactéria. É interessante ressaltar que um dos resultados apresentados mostrou que a cepa mutante teve sua virulência atenuada ao ser testada em um modelo murino. Portanto, os autores chegaram à conclusão que o PerR está envolvido na regulação das respostas à homeostase do ferro e ao estresse oxidativo, além de contribuir para a virulência de *S. pyogenes* (Ricci, Janulczyk, e Björck, 2002). Em 2005, outro estudo verificou que mutantes nocaute no gene *perR* de *S. pyogenes* tiveram a virulência atenuada em modelo murino. Logo, concluiu-se que a regulação apropriada da resposta ao estresse por peróxido é crítica para a virulência (Brenot, King e Caparon, 2005). Em trabalhos com células *persisters* de *P. aeruginosa* e *E. coli* o estresse oxidativo foi apontado como um importante processo para o fenótipo de persistência (Xu *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2012). Entretanto, nos ensaios *in vivo* de nosso estudo, verificou-se a superexpressão do gene análogo ao *perR* associada com menor sobrevivência do *C. elegans* frente as células refratárias, se apresentaram mais virulentas. Estes resultados estão em discordância com os que empregaram os modelos murinos, já que nestes a virulência foi aumentada. No entanto, o aumento na expressão do gene homólogo ao *perR* poderia explicar a menor expressão de *sodA* e *nox* nos ensaios *in vivo*. Se há uma diminuição na síntese de H₂O₂, logo não é tão necessária a ação do gene *nox* para degradá-lo. Esse fato também seria concordante com a hipótese de que as células R-PN produzem menos H₂O₂ e, portanto, enganam o *C. elegans*, mas acabam matando-o, pois, uma vez dentro do animal expressam mais fatores de virulência como as enzimas estreptolisina O (SLO) e SpeB.

Os resultados dos ensaios de sobrevivência deste trabalho foram ratificados com os dados obtidos pela expressão de genes de virulência *in vivo*. O gene *ska* que codifica para a estreptoquinase apresentou uma superexpressão de 4x. A estreptoquinase é uma proteína importante para o estabelecimento de *S. pyogenes* no hospedeiro, visto que sua atividade resulta

na conversão enzimática de plasminogênio em plasmina (Cook *et al.*, 2012). A estreptoquinase é crucial para a ativação inadequada da plasmina, gerando danos aos tecidos e disseminação das bactérias (Sun *et al.*, 2004). Em 2003, Rezcallah e colaboradores publicaram um trabalho em que empregaram o modelo murino para verificar a expressão de alguns genes relacionados a virulência de *S. pyogenes*. Os resultados demonstraram que o gene *ska* teve sua expressão aumentada. Logo, a interação de patógenos invasivos com o plasminogênio do hospedeiro tem sido proposta como uma característica comum dos patógenos invasores (Rezcallah, Boyle e Sledjeski, 2003). Em 2013, Ly e colaboradores realizaram um estudo que demonstrou que cepas de *S. pyogenes* que tiveram o gene *ska* nocauteado não foram capazes de degradar do fator de complemento C3b e apresentaram uma maior taxa de mortalidade quando expostas a uma linhagem de neutrófilos humanos. Além disso, ao empregar um modelo de ensaios *in vivo* utilizando camundongos transgênicos que expressavam plasminogênio humano, foi verificado um aumento da sobrevivência das bactérias que não tiveram o gene *ska* nocauteado (Ly *et al.*, 2013).

Os resultados de nosso trabalho ainda demonstram que os genes *scpA* e *slo* apresentaram uma maior expressão nos ensaios *in vivo* (2,1x e 2,3x, respectivamente). O gene *scpA* codifica para a C5a peptidase, uma enzima que cliva o componente C5a do sistema complemento. Yinduo e colaboradores fizeram um estudo com cepas de *S. pyogenes* mutantes para o gene *scpA* e empregaram o modelo murino para avaliar a taxa de sobrevivência dos animais infectados. Como resultados, foi observado que o nocaute desse gene não afetou a virulência das bactérias (Yinduo *et al.*, 1996). Em contraste a esses achados, Husmann e colaboradores também utilizaram o modelo de infecção murino com mutantes que tiveram o gene *scpA* nocauteado. Nos ensaios, os pesquisadores fizeram a inoculação intratraqueal nos animais e demonstraram que a C5a peptidase tem um papel na infecção invasiva em camundongos (Husmann *et al.*, 1997). O gene *slo* codifica para a estreptolisina O, uma exotoxina que funciona como uma citolisina ativada por tiol. Essa exotoxina é responsável pela formação de poros nas membranas de células eucarióticas, levando-as a morte (Tweten, Hotze e Wade, 2015). Em 2016, Sharma e colaboradores verificaram que cepas de *S. pyogenes* que não possuíam o gene *slo* apresentavam uma menor taxa de sobrevivência intracelular em queratinócitos humanos em comparação com a cepa tipo selvagem (Sharma *et al.*, 2016). Zhu e colaboradores avaliaram o papel da estreptolisina O na virulência em modelos de camundongos com miosite necrosante, bacteremia e infecção de pele e tecidos moles. Os resultados apontaram que as cepas sem o gene *slo* são deficientes na capacidade de causar miosite necrosante nos animais. Além disso, os mutantes sem SLO são significativamente atenuados nos modelos de bacteremia e infecção

de tecidos moles. A cepa mutante sem produção SLO também é severamente falha na capacidade de resistir à morte por leucócitos polimorfonucleares humanos (Zhu et al., 2016). Portanto, é notória a contribuição da SLO para a patogênese de *S. pyogenes* nos ensaios de virulência.

O presente trabalho evidenciou a superexpressão (374x) do gene *speB* em ensaios *in vivo* em contraste com a expressão diminuta (1.000x) dos experimentos *in vitro*. O gene *speB* codifica para a exotoxina pirogênica B. As exotoxinas pirogênicas estreptocócicas são conhecidas por sua patogenicidade, aumento do choque endotóxico e efeitos superantigênicos no sistema imunológico (Cunningham, 2000). SpeB é uma cisteína-protease que degrada a vitronectina, fibronectina e componentes do sistema complemento. Além disso, SpeB age em outras proteínas estreptocócicas degradando-as ou liberando-as da superfície bacteriana. Embora exista muita informação na literatura sobre essa enzima, muitas das ações relatadas produziram resultados fisiológicos contraditórios (Nelson, Garbe e Collin, 2011).

SpeB é altamente conservada na maioria das cepas de *S. pyogenes*, porém sua expressão varia dependendo do tipo de infecção (Shanon et al., 2019). Cepas isoladas de impetigo têm níveis significativamente mais altos de atividade SpeB em comparação a isolados de faringite (Ringdahl et al., 2000). Porém Ly e colaboradores publicaram um trabalho demonstrado que isolados provenientes de faringite não possuíam atividade SpeB (Ly et al., 2017). Em trabalhos realizados com modelos murinos de infecção, não há concordância nos resultados apresentados. Em alguns relatos, cepas com o gene *speB* nocauteado mostram-se pouco virulentas em modelos de infecção invasiva em ratos, entretanto outros estudos mostram que não ocorreu nenhuma atenuação de virulência em cepas mutantes semelhantes (Asbaugh e Wessels, 2001). Portanto, conclui-se que a diversidade de alvos da proteína SpeB pode contribuir para que a enzima atue como fator de virulência ou exerça um papel de regulação da virulência através da degradação das próprias proteínas bacterianas. Apesar de não existir estudos na literatura acerca da expressão de *speB* em *S. pyogenes* após a interação com *C. elegans*, é importante ressaltar que em função de nossos resultados podemos sugerir que a expressão aumentada do gene *speB* pode estar associada com a maior taxa de mortalidade dos animais expostos às células refratárias.

S. pyogenes é um patógeno bem adaptado ao hospedeiro, em razão disso é fundamental que a bactéria apresente repertórios distintos de fatores de virulência, incluindo a proteína M, superantígenos e proteases responsáveis por garantir a sobrevivência frente as defesas do hospedeiro (Oehmcke et al., 2010). A capacidade de resistir a fagocitose é uma importante

estratégia bacteriana para promover a patogenicidade. Diante disso, há diversos trabalhos que visam entender a relação dos fatores de virulência de *S. pyogenes* com células fagocíticas. Em 2018, Suvorova e colaboradores estudaram os efeitos da proteína M na produção de ânions de nitróxido, superóxido e a produção de IL-6, IL-10 e IL-17 em macrófagos peritoniais de camundongo. Como resultado, verificou-se que a proteína M foi capaz de alterar a resposta dos macrófagos, exibindo atividade antifagocítica, impedindo a formação de ROS e estimulando a produção da citocina anti-inflamatória IL-10 (Suvorova *et al.*, 2018). No trabalho publicado de Lynskey e colaboradores, foi observado que a ação da C5a peptidase (ScpA) resultou na interrupção da fagocitose por neutrófilos humanos devido a clivagem de C3a (Lynskey *et al.*, 2017). Em experimentos preliminares de nosso estudo, as células R-PN de *S. pyogenes* foram menos fagocitadas na MOI 10 em relação as células NR-PN. Essa circunstância pode estar associada pela maior expressão de genes que codificam para fatores de virulência, como o *scpA* e *slo*. Além disso, neste trabalho foi observado que a população de células R-PN apresentou uma menor taxa de sobrevivência na MOI 10 em comparação com as NR-PN. Indica que as células refratárias sobrevivem menos no interior da célula fagocíticas testada.

Os resultados obtidos pelo presente trabalho são relevantes para a compreensão dos mecanismos de virulência de células refratárias de *S. pyogenes*. Para tal, utilizou-se o modelo do nematoide *C. elegans* para os ensaios *in vivo*. Neste trabalho, o animal mostrou-se ser um modelo apropriado para a realização de análises comparativas do potencial de virulência entre células refratárias e não refratárias a penicilina de *S. pyogenes*. Esses ensaios podem ter importância clínica visto que essas células refratárias podem estar relacionadas com o aumento de falhas terapêuticas e com a cronicidade de infecções. Ainda, foi verificado a expressão de diferentes genes diretamente relacionados a patogênese da bactéria e sua associação com a fagocitose de uma linhagem de monócitos humanos.

7. CONCLUSÃO

Com base nos resultados exibidos neste trabalho, foi concluído que:

A utilização do nematoide *Caenorhabditis elegans* como modelo de estudos *in vivo* para a comparação de virulência entre células refratárias e não refratárias de *Streptococcus pyogenes* mostrou-se eficiente e condizente.

As análises de microscopia de fluorescência demonstraram que o nematoide interage com a amostra em ambas as condições. Além de estarem aderidos ao longo de toda estrutura física também são observados no interior do corpo do nematoide.

Os ensaios de sobrevivência evidenciaram uma maior taxa de mortalidade de *C. elegans* quando expostos às células R-PN, em comparação com as células NR-PN.

As análises de microscopia óptica apontaram um maior conjunto de danos e alterações nos nematoides que interagiram com as células R-PN. Resultados estes condizentes com os ensaios de sobrevivência realizados.

A quantificação de células R-PN e NR-PN presentes no interior do animal apontou que a amostra refratária foi encontrada em maior quantidade quando comparada com a não refratária.

Nos ensaios *in vitro*, a análise de expressão de genes de virulência, os genes *scpA* (C5a peptidase), *MGAS10750_Spy1285* (hialuronidase) e *speA* (superantígeno A) apresentaram um aumento na sua expressão em células R-PN.

Nos ensaios *in vivo*, a análise de expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo evidenciou a superexpressão do gene análogo ao *perR* (proteína reguladora da captura do ferro) e repressão dos genes *sodA* e *nox*. A análise dos demais genes de virulência ressaltou a superexpressão do gene *speB* e aumento de *slo*.

Nos ensaios de fagocitose, foi observado que as células R-PN foram percentualmente menos fagocitadas por monócitos quando em comparação a população de células RN-PN. No entanto, no ensaio de quantificação de viabilidade bacteriana, verificou-se um maior número de células viáveis de NR-PN na MOI 10, recuperadas após interação com o monócito.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bargmann, C.I. (2006). Chemosensation in *C. elegans*. WormBook 1–29. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.123.1>
- Barkowsky, G., Lemster, A., Pappesch, R., Jacob, A., Krüger, S., Schröder, A., Kreikemeyer, B., e Patenge, N. (2019). Influence of different cell-penetrating peptides on the antimicrobial efficiency of PNAs in *Streptococcus pyogenes*. Mol. Ther. Nucleic Acid 18, 444–454.
- Barnett, T.C., Cole, J.N., Rivera-Hernandez, T., Henningham, A., Paton, J.C., Nizet, V. e Walker, M.J. (2015). Streptococcal toxins: role in pathogenesis and disease. Cell. Microbiol. 17, 1721–1741.
- Barrière, A. e Félix, M.A. (2005). High local genetic diversity and low outcrossing rate in *Caenorhabditis elegans* natural populations. Curr. Biol. 15, 1176–1184.
- Bastiat-Sempe, B., Love, J.F., Lomayesva, N. e Wessels, M.R. (2014). Streptolysin O and NAD-glycohydrolase prevent phagolysosome acidification and promote group A *Streptococcus* survival in macrophages. MBio 5, 1–11.
- Bessen, D.E. (1994). Localization of immunoglobulin A-binding sites within M or M-like proteins of group A streptococci. Infect. Immun. 62, 1968–1974.
- 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.
- Bigger, J.W. (1944). Treatment of staphylococcal infections by intermittent sterilisation. Lancet 497–500.
- Blaxter, M. (2011). Nematodes: The worm and its relatives. PLoS Biol. 9, e1001050.
- Bolm, M., Jansen, W.T.M., Schnabel, R. e Chhatwal, G.S. (2004). Hydrogen peroxide-mediated killing of *Caenorhabditis elegans*: a common feature of different streptococcal species. Infect. Immun. 72, 1192–1194.
- De Bono, M., e Bargmann, C.I. (1998). Natural variation in a neuropeptide Y receptor homolog modifies social behavior and food response in *C. elegans*. Cell. 94, 679–689.
- De Bono, M., Tobin, D.M., Davis, M.W., Avery, L., e Bargmann, C.I. (2002). Social feeding in *Caenorhabditis elegans* is induced by neurons that detect aversive stimuli. Nature. 419, 899–903.
- Bonofiglio, L., Galletti, P., García Gabarrot, G., Kaufman, S., Mollerach, M., Toresani, I., Vigliarolo, L., von Specht, M. e Lopardo, H.A. (2018). Susceptibility to β -lactams in β -hemolytic streptococci. Rev. Argent. Microbiol. 50, 431–435.
- Brenner, S. (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. Genetics 77, 71–94.
- Brenot, A., King, K.Y., e Caparon, M.G. (2005). The PerR regulon in peroxide resistance and virulence of *Streptococcus pyogenes*. Mol. Microbiol. 55, 221–234.
- Brook, I. (2007). Overcoming penicillin failures in the treatment of Group A streptococcal pharyngo-tonsillitis. Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol. 71, 1501–1508.
- C. elegans* Sequencing Consortium (1998). Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. Science. 282, 2012–2019.
- Carapetis, J.R., Steer, A.C., Mulholland, E.K. e Weber, M. (2005). The global burden of group A streptococcal diseases. Lancet Infect. Dis. 5, 685–694.
- Carlsson, F., Sandin, C. e Lindahl, G. (2005). Human fibrinogen bound to *Streptococcus pyogenes* M protein inhibits complement deposition via the classical pathway. Mol. Microbiol. 56, 28–39.
- Casey, J.R. e Pichichero, M.E. (2007). The evidence base for cephalosporin superiority over penicillin in streptococcal pharyngitis. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 57, 39S–45S.
- CDC *Streptococcus* Laboratory. Disponível em: <https://www.cdc.gov/streplab/groupa-strep/emm-background.html>. Acesso em 01/05/2019.

- Chambers, H.F. (1999). Penicillin-binding protein-mediated resistance in pneumococci and staphylococci. *J. Infect. Dis.* 179 Suppl, S353-359.
- Cho, K.H. e Caparon, M.G. (2005). Patterns of virulence gene expression differ between biofilm and tissue communities of *Streptococcus pyogenes*. *Mol. Microbiol.* 57, 1545–1556.
- Clinical and Laboratory Standards Institute-NCCLS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Fifteenth informational supplement. CLSI/NCCLS document M100-S15
- Conlon, B.P. (2014). *Staphylococcus aureus* chronic and relapsing infections: evidence of a role for *persisters* cells. *BioEssays* 36, 991–996.
- Conlon, B.P., Rowe, S.E., Gandt, A.B., Nuxoll, A.S., Donegan, N.P., Zalis, E.A., Clair, G., Adkins, J.N., Cheung, A.L., e Lewis, K. (2016). *Persister* formation in *Staphylococcus aureus* is associated with ATP depletion. *Nat. Microbiol.* 1, 1–16.
- Cook, S.M., Skora, A., Gillen, C.M., Walker, M.J. e McArthur, J.D. (2012). Streptokinase variants from *Streptococcus pyogenes* isolates display altered plasminogen activation characteristics - implications for pathogenesis. *Mol. Microbiol.* 86, 1052–1062.
- Coronado, A.Z. (2012). Estudo sobre o fenômeno de indução de resistência fenotípica a múltiplas drogas expressa por *Streptococcus pyogenes* em alta densidade populacional. Dissertação (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Goés, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 213f.
- Cortés, G. e Wessels, M.R. (2009). Inhibition of dendritic cell maturation by group A *Streptococcus*. *J. Infect. Dis.* 200, 1152–1161.
- Côrtes, M.F., Beltrame, C.O., Ramundo, M.S., Ferreira, F.A., e Figueiredo, A.M.S. (2015). The influence of different factors including *fnbA* and *mecA* expression on biofilm formed by MRSA clinical isolates with different genetic backgrounds. *Int. J. Med. Microbiol.* 305, 140–147.
- Courtney, H.S., Ofek, I., Penfound, T., Nizet, V., Pence, M.A., Kreikemeyer, B., Podbielbski, A., Hasty, D.L. e Dale, J.B. (2009). Relationship between expression of the family of M proteins and lipoteichoic acid to hydrophobicity and biofilm formation in *Streptococcus pyogenes*. *PLoS One* 4(1), e4166.
- Cunningham, M.W. (2000). Pathogenesis of group A streptococcal infections. *Clin. Microbiol. rev.* 13, 470–511.
- Cywes, C., Stamenkovic, I. e Wessels, M.R. (2000). CD44 as a receptor for colonization of the pharynx by group A *Streptococcus*. *J. Clin. Invest.* 106, 995–1002.
- Dale, J.B., Washburn, R.G., Marques, M.B. e Wessels, M.R. (1996). Hyaluronate capsule and surface M protein in resistance to opsonization of group A streptococci. *Infect. Immun.* 64, 1495–1501.
- Defraigne, V., Verstraete, L., Van Bambeke, F., Anantharajah, A., Townsend, E.M., Ramage, G., Corbau, R., Marchand, A., Chaltin, P., Fauvart, M., e Michiels, J. (2017). Antibacterial activity of 1-[(2,4-dichlorophenethyl)amino]-3-phenoxypropan-2-ol against antibiotic-resistant strains of diverse bacterial pathogens, biofilms and in pre-clinical infection models. *Front. Microbiol.* 8, 1–10.
- Dhar, N. e McKinney, J.D. (2010). *Mycobacterium tuberculosis* persistence mutants identified by screening in isoniazid-treated mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 12275–12280.
- Dimov, I. e Maduro, M.F. (2019). The *C. elegans* intestine: organogenesis, digestion, and physiology. *Cell. Tissue Res.* <https://doi.org/10.1007/s00441-019-03036-4>
- Dörr, T., Vulić, M. e Lewis, K. (2010). Ciprofloxacin causes *persister* formation by inducing the TisB toxin in *Escherichia coli*. *PLoS Biol.* 8, 29–35.
- Drescher, S.P.M., Gallo, S.W., Ferreira, P.M.A., Ferreira, C.A.S. e Oliveira, S.D. (2019). *Salmonella enterica* *persister* cells form unstable small colony variants after in vitro exposure to ciprofloxacin. *Sci. Rep.* 9, 1–11.
- Ellen, R.P. e Gibbons, R.J. (1972). M protein-associated adherence of *Streptococcus pyogenes* to epithelial surfaces: prerequisite for virulence. *Infect. Immun.* 5, 826–830.
- Ellen, R.P., Lépine, G. e Nghiem, P.-M. (1997). in vitro models that support adhesion. *Adv Dent Res.* 11, 33–42.
- Erkut, C. e Kurzchalia, T. V. (2015). The *C. elegans dauer* larva as a paradigm to study metabolic suppression and

desiccation tolerance. *Planta* 242, 389–396.

Euzéby, J.P. (1997). List of bacterial names with standing in nomenclature. Disponível em <http://www.bacterio.net/streptococcus.html>. Acesso em 28/03/2019.

Facklam, R. (2002). What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 613–630.

Falkow, S. (2004). Molecular Koch's postulates applied to bacterial pathogenicity — a personal recollection 15 years later. *Nature Reviews*.2, 67-72.

Fauvart, M., de Groote, V.N. e Michiels, J. (2011). Role of persister cells in chronic infections: clinical relevance and perspectives on anti-persister therapies. *J. Med. Microbiol.* 60, 699–709.

Fielenbach, N. e Antebi, A. (2008). *C. elegans* dauer formation and the molecular basis of plasticity. *Genes & Development*. 22, 2149–2165.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. e Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 391, 806–811.

Fischetti, V.A. (1989). Streptococcal M protein: molecular design and biological behavior. *Clin. Microbiol. Rev.* 2, 285–314.

Fischetti, V.A. (2019). Vaccine approaches to protect against group A streptococcal pharyngitis. *Microbiol Spectrum*. 7, 1–13.

Francis, T. e Terrell, E.E. (1934). Experimental type III pneumococcus pneumonia in monkeys. *The J. Exp. Med.* 59, 609-640.

Garsin, D.A., Sifri, C.D., Mylonakis, E., Qin, X., Singh, K. V., 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.* 98, 10892–10897.

Genteluci, G.L., Silva, L.G., Souza, M.C., Glatthardt, T., de Mattos, M.C., Ejzemberg, R., Alviano, C.S., Figueiredo, A.M.S., e Ferreira-Carvalho, B.T. (2015). Assessment and characterization of biofilm formation among human isolates of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*. *Int. J. Med. Microbiol.* 305, 937–947.

Goneau, L.W., Yeoh, N.S., MacDonald, K.W., Cadieux, P.A., Burton, J.P., Razvi, H. e Reid, G. (2014). Selective target inactivation rather than global metabolic dormancy causes antibiotic tolerance in uropathogens. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 2089–2097.

Goodwin, E.B. e Ellis, R.E. (2002). Turning clustering loops: sex determination in *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Biol.* 12, R111–R120.

Gotfredsen, M. e Gerdes, K. (1998). The *Escherichia coli relBE* genes belong to a new toxin-antitoxin gene family. *Mol. Microbiol.* 29, 1065–1076.

Grady, K.F.O., Kelpie, L., Andrews, R.M., Curtis, N., Nolan, T.M., Selvaraj, G., Passmore, J.W., Oppedisano, F., Carnie, J.A. e Carapetis, J.R. (2007). The epidemiology of invasive group A streptococcal disease in Victoria, Australia. *Medical Journal of Australia*. 186, 565–569.

Grant, S.S. e Hung, D.T. (2013). Persistent bacterial infections, antibiotic tolerance, and the oxidative stress response. *Virulence* 4, 273–283.

Gray, J.M., Karow, D.S., Lu, H., Chang, A.J., Chang, J.S., Ellis, R.E., Marietta, M.A., e Bargmann, C.I. (2004). Oxygen sensation and social feeding mediated by a *C. elegans* guanylate cyclase homologue. *Nature* 430, 317–322.

Griffith, F. (1934). The serological classification of *Streptococcus pyogenes*. *J. Hyg. (Lond)*. 34, 542–584.

Hamamoto, H., Kurokawa, K., Kaito, C., Kamura, K., Razanajatovo, I.M., Kusuhara, H., Santa, T. e Sekimizu, K. (2004). Quantitative evaluation of the therapeutic effects of antibiotics using silkworms infected with human pathogenic microorganisms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 774–779.

Harms, A., Maisonneuve, E. e Gerdes, K. (2016). Mechanisms of bacterial persistence during stress and antibiotic exposure. *Science*. 354.

- Henningham, A., Döhrmann, S., Nizet, V., e Cole, J.N. (2015). Mechanisms of group A *Streptococcus* resistance to reactive oxygen species. *FEMS Microbiol. Rev.* 39, 488–508.
- Hoang, H.D., e Miller, M.A. (2017). Chemosensory and hyperoxia circuits in *C. elegans* males influence sperm navigational capacity. *PLoS Biol.* 15, 1–26.
- Hodgkin, J.A. e Brenner, S. (1977). Mutations causing transformation of sexual phenotype in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics.* 86, 275–287.
- Horstmann, R.D., Sievertsen, H.J., Leippe, M. e Fischetti, V.A. (1992). Role of fibrinogen in complement inhibition by streptococcal M protein. *Infect. Immun.* 60, 5036–5041.
- Hoyle, B.D. e Costerton, J.W. (1991). Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms. *Prog. Drug Res.* 37, 91–105.
- Hynes, W.L. (2004). Virulence factors of the group A streptococci and genes that regulate their expression. *Front. Biosci.* 7046–7063.
- Jansen, W.T., 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.
- Johnigk, S.A., e Ehlers, R.U. (1999). *Endotokia matricida* in hermaphrodites of *Heterorhabditis* spp. and the effect of the food supply. *Nematology* 1, 717–726.
- Jolivet-Gougeon, A. e Bonnaure-Mallet, M. (2014). Biofilms as a mechanism of bacterial resistance. *Drug Discov. Today Technol.* 11, 49–56.
- Joshua, G.W.P., Karlyshev, A. V., Smith, M.P., Isherwood, K.E., Titball, R.W. e Wren, B.W. (2003). A *Caenorhabditis elegans* model of *Yersinia* infection: biofilm formation on a biotic surface. *Microbiology* 149, 3221–3229.
- Kaletta, T. e Hengartner, M.O. (2006). Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 387–399.
- Kasper, K.J., Zeppa, J.J., Wakabayashi, A.T., Xu, S.X., Mazzuca, D.M., Welch, I., Baroja, M.L., Kotb, M., Cairns, E., Cleary, P.P., Haeryfar, S.M.M. e McCormick, J.K. (2014). Bacterial superantigens promote acute nasopharyngeal infection by *Streptococcus pyogenes* in a human MHC Class II-Dependent Manner. *PLoS Pathog.* 10, e1004155.
- Kaufmann, S.H.E. e Schaible, U.E. (2005). 100th anniversary of Robert Koch's Nobel Prize for the discovery of the tubercle bacillus. *Trends Microbiol.* 13, 469–475.
- Kim, W., Zhu, W., Hendricks, G.L., Van Tyne, D., Steele, A.D., Keohane, C.E., Fricke, N., Conery, A.L., Shen, S., Pan, W., Lee, K., Rajamuthiah, R., Fuchs, B.B., Vlahovska, P.M., Wuest, W.M., Gilmore, M.S., Gao, H., Ausubel, F.M. e Mylonakis, E. (2018). A new class of synthetic retinoid antibiotics effective against bacterial persisters. *Nature* 556, 103–107.
- Kostakioti M., Hadjifrangiskou M. e Hultgren S.J. (2013). Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. *Cold Spring Harb Perspect Med.* <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a010306>
- Kostic, M., Bedekovic, V., Bastijancic-Kokic, B. e Lauc, T. (2019). Unnecessary prescribing of antibiotics to healthy/asymptomatic school-age carriers of potentially pathogenic bacteria. *Saudi Med. J.* 40, 405–408.
- Kurz, C.L., Chauvet, S., Andrès, E., Aurouze, M., Vallet, I., Michel, G.P.F., Uh, M., Celli, J., Filloux, A., De Bentzmann, S., Steinmetz, I., Hoffmann, J.A., Finlay, B.B., Gorvel, J.P., Ferrandon, D. e Ewbank, J.J. (2003). Virulence factors of the human opportunistic pathogen *Serratia marcescens* identified by in vivo screening. *EMBO J.* 22, 1451–1460.
- Laabei, M. e Ermert, D. (2018). Catch me if you can: *Streptococcus pyogenes* complement evasion strategies. *J. Innate Immun.* 11, 3–12.
- LaFleur, M.D., Qi, Q. e Lewis, K. (2010). Patients with long-term oral carriage harbor high-persister mutants of *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 39–44.
- Lancefield, R.C. (1933). A serological differentiation of human and other groups of haemolytic streptococci. *Exp.*

J. Med. 57, 571–595.

Lefébure, T., Richards, V.P., Lang, P., Pavinski-Bitar, P. e Stanhope, M.J. (2012). Gene repertoire evolution of *Streptococcus pyogenes* inferred from phylogenomic analysis with *Streptococcus canis* and *Streptococcus dysgalactiae*. PLoS One. 7, e37607.

Lewis, K. (2010). Persister Cells. Annu. Rev. Microbiol. 64, 357–372.

Liochev SI e Fridovich I. (2007). The effects of superoxide dismutase on H₂O₂ formation. Free Radical Bio Med 42, 1465–9.

Luca-Harari, B., Darenberg, J., Neal, S., Siljander, T., Strakova, L., Tanna, A., Creti, R., Ekelund, K., Koliou, M., Tassios, P.T., Van Der Linden, M., Straut, M., Vuopio-Varkila, J., Bouvet, A., Efstratiou, A., Schalén, C., Henriques-Normark, B. e Jasir, A. (2009). Clinical and microbiological characteristics of severe *Streptococcus pyogenes* disease in Europe. J. Clin. Microbiol. 47, 1155–1165.

Mahajan-Miklos, S., Rahme, L.G. e Ausubel, F.M. (2000). Elucidating the molecular mechanisms of bacterial virulence using non-mammalian hosts. Mol. Microbiol. 37, 981–988.

Marroquin, L.D., Elyassnia, D., Griffitt, J.S., Feitelson, J.S. e Aroian, R. V. (2000). *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxin susceptibility and isolation of resistance mutants in the nematode *Caenorhabditis elegans*. 17, 13–17.

Massudi H, Grant R, Guillemin GJ, e Braidy N. (2012). NAD⁺ metabolism and oxidative stress: the golden nucleotide on a crown of thorns. Redox Rep. 17, 28–46.

McDermott, W. (1958). Microbial persistence. Harvey Lect. 63, 1–31.

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.

Mina, E.G. e Marques, C.N.H. (2016). Interaction of *Staphylococcus aureus* persister cells with the host when in a persister state and following awakening. Sci. Rep. 6, 1–10.

Mora, M., Bensi, G., Capo, S., Falugi, F., Zingaretti, C., Manetti, A.G.O., Maggi, T., Taddei, A.R., Grandi, G., e Telford, J.L. (2005). Group A *Streptococcus* produce pilus-like structures containing protective antigens and Lancefield T antigens. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102, 15641–15646.

Mulcahy, L.R., Burns, J.L., Lory, S. e Lewis, K. (2010). Emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains producing high levels of persister cells in patients with cystic fibrosis. J. Bacteriol. 192, 6191–6199.

Nakata, M., Sumitomo, T., Patenge, N., Kreikemeyer, B., e Kawabata, S. (2019). Thermosensitive pilus production by FCT type 3 *Streptococcus pyogenes* controlled by Nra regulator translational efficiency. Mol. Microbiol. [https:// doi: 10.1111/MMI.14408](https://doi.org/10.1111/MMI.14408)

Neely, M.N., Pfeifer, J.D. e Caparon, M. (2002). *Streptococcus-Zebrafish* model of bacterial pathogenesis. Infection and Immunity. 70, 3904–3914.

Nelson, D.C., Garbe, J. e Collin, M. (2011). Cysteine proteinase SpeB from *Streptococcus pyogenes*-A potent modifier of immunologically important host and bacterial proteins. Biol. Chem. 392, 1077–1088.

Nishimura, M.T., e Dangl, J.L. (2011). *Arabidopsis* and the plant immune system. Plant J. 61, 1053–1066.

Nobbs, A.H., Lamont, R.J. e Jenkinson, H.F. (2009). *Streptococcus* adherence and colonization. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 73, 407–450.

Norrby-Teglund, A., Chatellier, S., Low, D.E., McGeer, A., Green, K., e Kotb, M. (2000). Host variation in cytokine responses to superantigens determine the severity of invasive group A streptococcal infection. Eur. J. Immunol. 30, 3247–3255.

Oehmcke, S., O. Shannon, M. Morgelin, e Herwald H. (2010). Streptococcal M proteins and their role as virulence determinants. Clin. Chim. Acta 410, 1172–1180.

Ogawa, T., Terao, Y., Okuni, H., Ninomiya, K., Sakata, H., Ikebe, K., Maeda, Y. e Kawabata, S. (2011). Biofilm formation or internalization into epithelial cells enable *Streptococcus pyogenes* to evade antibiotic eradication in patients with pharyngitis. Microb. Pathog. 51, 58–68.

- Okada, N., Pentland, A.P., Falk, P. e Caparon, M.G. (1994). M protein and protein F act as important determinants of cell-specific tropism of *Streptococcus pyogenes* in skin tissue. *J. Clin. Invest.* 94, 965–977.
- Ortiz, C.O., Faumont, S., Takayama, J., Ahmed, H.K., Andrew, D., Pocock, R., McCormick, K.E., Kunimoto, H., Iino, Y., Lockery, S., e Hobert, O. (2009). Lateralized gustatory behavior of *C. elegans* is controlled by specific receptor-type guanylyl cyclases. *Curr. Biol.* 19, 996–1004.
- Page, R. e Peti, W. (2016). Toxin-antitoxin systems in bacterial growth arrest and persistence. *Nat. Chem. Biol.* 12, 208–214.
- Pierce-Shimomura, J.T., Faumont, S., Gaston, M.R., Pearson, B.J., e Lockery, S.R. (2001). The homeobox gene *lim-6* is required for distinct chemosensory representations in *C. elegans*. *Nature.* 410, 694–698.
- Pimenta, A.L., Racher, K., Jamieson, L., Blight, M.A., e Holland, I.B. (2005). Mutations in HlyD, part of the type 1 translocator for hemolysin secretion, affect the folding of the secreted toxin. 187, 7471–7480.
- Prax, M., e Bertram, R. (2014). Metabolic aspects of bacterial persisters. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4, 1–6
- Proft, T. e Fraser, J.D. (2003). Bacterial superantigens review. *Clin. Exp. Immunol.* 133, 299–306.
- Reglinski, M. e Sriskandan, S. (2014). The contribution of group A streptococcal virulence determinants to the pathogenesis of sepsis. *Virulence* 5, 127–136.
- Ricci, S., Janulczyk, R., e Björck, L. (2002). The regulator PerR is involved in oxidative stress response and iron homeostasis and is necessary for full virulence of *Streptococcus pyogenes*. *Infect. Immun.* 70, 4968–4976.
- Riddle, D.L., Swanson, M.M. e Albert, P.S. (1981). Interacting genes in nematode dauer larva formation. *Nature* 290, 668–671.
- Rio-Marques, L., Hartke, A., e Bizzini, A. (2014). The effect of inoculum size on selection of *in vitro* resistance to vancomycin, daptomycin, and linezolid in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microb. Drug Resist.* 20, 539–543.
- Roberts, A.L., Connolly, K.L., Kirse, D.J., Evans, A.K., Poehling, K.A., Peters, T.R. e Reid, S.D. (2012). Detection of group A *Streptococcus* in tonsils from pediatric patients reveals high rate of asymptomatic streptococcal carriage. *BMC Pediatr.* 12:3, 1–9.
- Rossoni, R.D., Ribeiro, F. de C., dos Santos, H.F.S., dos Santos, J.D., Oliveira, N. de S., Dutra, M.T. dos S., de Lapena, S.A.B. e Junqueira, J.C. (2019). *Galleria mellonella* as an experimental model to study human oral pathogens. *Arch. Oral Biol.* 101, 13–22.
- Ruediger, G.F. (1906). The cause of green coloration of bacterial colonies in blood-agar plates. *J. Infect. Dis.* 3, 663–665.
- Sestak, K. (2018). Non-human primate models of enteric viral infections. *Viruses* 10, 544.
- Sherman, J.M. (1937). The Streptococci. *Bacteriol. Rev.* 1, 3–97.
- Shingai, R., Ichijo, H., Wakabayashi, T., Tanaka, H., e Ogurusu, T. (2014). Chemotaxis behavior toward an odor is regulated by constant sodium chloride stimulus in *Caenorhabditis elegans*. *Neurosci. Res.* 81–82, 51–54
- Singletary, L.A., Gibson, J.L., Tanner, E.J., McKenzie, G.J., Lee, P.L., Gonzalez, C. e Rosenberg, S.M. (2009). An SOS-regulated type 2 toxin-antitoxin system. *J. Bacteriol.* 191, 7456–7465.
- Soderholm, A.T., Barnett, T.C., Sweet, M.J. e Walker, M.J. (2017). Group A streptococcal pharyngitis: immune responses involved in bacterial clearance and GAS-associated immunopathologies. *J. Leukoc. Biol.* 103, jlb.4MR0617-227RR.
- Son, H.G., Altintas, O., Kim, E.J.E., Kwon, S. e Lee, S.J. V. (2019). Age-dependent changes and biomarkers of aging in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* 18, 1–11.
- Steer, A.C., Lamagni, T., Curtis, N. e Carapetis, J.R. (2012). Invasive group a streptococcal disease: epidemiology, pathogenesis and management. *Drugs* 72, 1213–1227.
- Stepanyan, K., Wenseleers, T., Duéñez-Guzmán, E.A., Muratori, F., Van Den Bergh, B., Verstraeten, N., De Meester, L., Verstrepen, K.J., Fauvart, M. e Michiels, J. (2015). Fitness trade-offs explain low levels of persister

- cells in the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Ecol.* 24, 1572–1583.
- Stiernagle. (2006). Maintenance of *C. elegans*. *WormBook*. 11, 1-11
- Stietz, M.S., Lopez, C., Osifo, O., Tolmasky, M.E. e Cardona, S.T. (2017). Evaluation of the electron transfer flavoprotein as an antibacterial target in *Burkholderia cenocepacia*. *Can. J. Microbiol.* 63, 857–863.
- Sumby, P., Tart, A.H. e Musser, J.M. (2008). A non-human primate model of acute group A *Streptococcus* pharyngitis. *Bact. Pathog.* 431, 255–267.
- Suvorova, M. A., Kramskaya, T. A., Suvorov, A. N., e Kiseleva, E. P. (2018). Inactivation of M111 Protein Gene Modifies *Streptococcus pyogenes* Interactions with Mouse Macrophages *in vitro*. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 164(3), 347–350.
- Suzuki, H., Thiele, T.R., Faumont, S., Ezcurra, M., Lockery, S.R., e Schafer, W.R. (2008). Functional asymmetry in *C. elegans* taste neurons and its computational role in chemotaxis. *Nature.* 23, 1–7.
- Tan, M.-W, e Ausubel, F.M. (2000). *Caenorhabditis elegans*: a model genetic host to study *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Curr. Opin. Microbiol.* 3, 29–34.
- Tsou, C.C., Chiang-Ni, C., Lin, Y.S., Chuang, W.J., Lin, M.T., Liu, C.C., e Wu, J.J. (2008). An iron-binding protein, Dpr, decreases hydrogen peroxide stress and protects *Streptococcus pyogenes* against multiple stresses. *Infect. Immun.* 76, 4038–4045.
- Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T., e Tada, K. (1980). Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer.* 1980; 26:171–176. *Int. J. Cancer* 176, 171–176.
- Vandamme, T.F. (2014). Use of rodents as models of human diseases. *J. Pharm. Bioallied Sci.* 6, 2.
- Walker, M.J., Barnett, T.C., McArthur, J.D., Cole, J.N., Gillen, C.M., Henningham, A., Sriprakash, K.S., Sanderson-Smith, M.L. e Nizet, V. (2014). Disease manifestations and pathogenic mechanisms of group A *Streptococcus*. *Clin. Microbiol. Rev.* 27, 264–301.
- Watanabe, S., Takemoto, N., Ogura, K. e Miyoshi-Akiyama, T. (2016). Severe invasive streptococcal infection by *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*. *Microbiol. Immunol.* 60, 1–9.
- Watkins, D.A., Johnson, C., Colquhoun, S., Karthikeyan, G., Beaton, A., Bukhman, G., Forouzanfar, M., Longenecker, C., Mayosi, B., Mensah, G., Nascimento, B., Ribeiro, A., Sable, C., Steer, A., Naghavi, M., Mokdad, A., Murray, C., Vos, T., Carapetis, J. e Roth, G. (2017). Global, regional, and national burden of rheumatic heart disease, 1990–2015. *N. Engl. J. Med.* 377, 713–722.
- Watson, R.F., Rothbard, S. e Swift, H.F. (1946). Type-specific protection and immunity following intranasal inoculation of monkeys with group a hemolytic streptococci. *J. Exp. Med.* 84, 127-142.
- Wilmaerts, D., Windels, E.M., Verstraeten, N. e Michiels, J. (2019). General mechanisms leading to persister formation and awakening. *Trends Genet.* 35, 401–411.
- Wu, Y., Vulić, M., Keren, I., e Lewis, K. (2012). Role of oxidative stress in persister tolerance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 4922–4926.
- Xu, K.D., Franklin, M.J., Park, C.H., McFeters, G.A., e Stewart, P.S. (2001). Gene expression and protein levels of the stationary phase sigma factor, RpoS, in continuously-fed *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *FEMS*
- Yee, R., Yuan, Y., Shi, W., Brayton, C., Tarff, A., Feng, J., Wang, J., Behrens, A., e Zhang, Y. (2019). Infection with *persister* forms of *Staphylococcus aureus* causes a persistent skin infection with more severe lesions in mice: failure to clear the infection by the current standard of care treatment. *Discov Med.* 151, 7-16.
- Yinduo, J.I., McLandsborough, L., Kondagunta, A. e Cleary, P.P. (1996). C5a peptidase alters clearance and trafficking of group A streptococci by infected mice. *Infect. Immun.* 64, 503–510.
- Yoshino, M., Murayama, S.Y., Sunaoshi, K., Wajima, T., Takahashi, M., Masaki, J., Kurokawa, I. e Ubukata, K. (2010). Nonhemolytic *Streptococcus pyogenes* isolates that lack large regions of the *sag* operon mediating streptolysin S production. *J. Clin. Microbiol.* 48, 635–638.
- Zhang, Y., Yew, W.W., e Barer, M.R. (2012). Targeting *persisters* for tuberculosis control. *Antimicrob. Agents*

Chemother. 56, 2223–2230.

Zhu, G., Yin, F., Wang, L., Wei, W., Jiang, L. e Qin, J. (2016). Modeling type 2 diabetes-like hyperglycemia in *C. elegans* on a microdevice. *Integr. Biol. (United Kingdom)* 8, 30–38.