



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Elisabete Alves Cappelli

**Avaliação da influência de OxyR na resposta ao estresse e na virulência de
*Corynebacterium diphtheriae***

Rio de Janeiro

2018

Elisabete Alves Cappelli

**Avaliação da influência de OxyR na resposta ao estresse e na virulência de
*Corynebacterium diphtheriae***

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ana Luíza de Mattos Guaraldi

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Alessandra Mattos Saliba

Rio de Janeiro

2018

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CBA

C238 Cappelli, Elisabete Alves.

Avaliação da influência de OxyR na resposta ao estresse e na virulência de *Corynebacterium diphtheriae* / Elisabete Alves Cappelli. – 2018.
127 f.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ana Luíza de Mattos Guaraldi.
Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Alessandra Mattos Saliba.

Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas.

1. *Corynebacterium diphtheriae* - Teses. 2. Estresse oxidativo – Teses. 3. Virulência – Teses. 4. Biofilme - Teses. 5. Transtorno de estresse por calor. I. Guaraldi, Ana Luíza de Mattos. II. Saliba, Alessandra Mattos. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 576.8

Bibliotecária: Thais Ferreira Vieira CRB/7 5302

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

Assinatura

Data

Elisabete Alves Cappelli

**Avaliação da influência de OxyR na resposta ao estresse e na virulência de
*Corynebacterium diphtheriae***

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Aprovada em 16 de agosto de 2018.

Coorientadora: Prof.^a Dra. Alessandra Mattos Saliba
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Banca Examinadora:

Professora Dr^a. Ana Luíza de Mattos-Guaraldi (Orientadora)
Faculdade de Ciências Médicas-UERJ

Professora Dr^a. Ana Cláudia de Paula Rosa
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Professor Dr. Raphael do Carmo Valente
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Professora Dra . Débora Leandro Rama Gomes
Instituto Federal do Rio de Janeiro

Professora Dr^a. Verônica Viana Vieira
Fundação Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

2018

DEDICATÓRIA

Dedico essa tese aos meus pais, meu marido Carlos, meus filhos, Karina, Felipe e Rafael. Aos meus irmãos e sobrinhos pelo imenso amor, carinho, incentivo e compreensão. Vocês são minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida.

Aos meus pais Adelino e Helena, por todo amor, carinho e dedicação. Por serem minha referência, por serem pessoas tão maravilhosas e por estarem, incondicionalmente, ao meu lado.

Ao meu marido Carlos, por ser o maior incentivador desta conquista, não me deixando desistir, pelo companheirismo, amor e cuidado.

Aos meus amados filhos Karina, Felipe e Rafael os quais enchem meu coração e minha vida de alegria. Pela compreensão nos momentos de exaustão. Por após dias cansativos de trabalho, me abraçarem e transferirem paz, calma e amor.

Aos meus queridos irmãos e sobrinhos pelo amor, carinho e generosidade de sempre. Por estarem prontos a me ajudar em qualquer circunstância.

À minha tão querida orientadora e Professora Dra. Ana Luíza de Mattos-Guaraldi por ter me trazido de volta a vida acadêmica, pelo grande carinho, pela confiança, pelo incentivo e amizade.

À minha tão querida orientadora e Professora Dra. Alessandra Mattos Saliba, pela orientação, amizade, carinho, pela disponibilidade de sempre e pelo grande e total apoio.

Ao querido Professor Dr. Raphael Hirata Junior pela presteza, carinho, incentivo e por me ajudar a encontrar soluções nos momentos mais difíceis.

Aos meus queridos amigos Louisy Sant'anna, Lincoln Sant'anna, Andrezza Cucineli e Cintia Santos pela bela amizade que construímos desde que cheguei ao laboratório, pela recíproca afinidade, pela paciência, pelas inúmeras demonstrações de carinho e ajuda inestimável durante esse período.

Às amigas Liliane Simpson, Vanilda Viana, Cecília Ferreira, Mônica Cristina sempre muito companheiras, pelo incentivo, carinho e pela grande amizade que foi surgindo no decorrer desses anos. À querida amiga Camila Azevedo, que mesmo distante geograficamente, esteve sempre pronta a me ajudar em todos os momentos.

Aos queridos amigos do LDCIC, Maria Canellas, Dryelle Rodrigues, Cassius Souza, Yuri Faria, Felipe Ingenosus, Sabrina Colodete, Guilherme Goulart, Débora Freires, Eliane Cristine, cada um com sua peculiaridade, pelo carinho, pelo apoio, pela torcida, pelos

momentos de descontração e alegria dentro, fora do laboratório e por tornar os dias de trabalho ainda mais agradáveis.

Aos queridos colegas recém chegados ao LDCIC e aqueles com quem tive menos contato durante esse período, Igor, Giorgio, Bruna, Camila, Juliana, Paula, Barbara, Bruna, Géisica, Renata Peixoto, Renata Stravakrakis, Ricardo Carvalho, pelo carinho que sempre tiveram por mim e pelo apoio.

Aos queridos amigos do laboratório 4 que me abriram as portas com tanto carinho, Alexandre Monteiro, Miriam Ferreira, Dr. Rafael Valente, Sabrina Alves e às queridas amigas do lab. 6, Bianca e Carolina, pelos bons momentos e pelo grande prazer da convivência com vocês.

Aos meus amigos de longa data, Sônia Maria, Gabriela, Cassiana, Claudio Rocha, Felipe Piedade, Lilian Moreira, Helvécio, Letícia, Raquel, Sílvia Helena, Esther Helena e Fábriçe pela amizade de tantos anos da qual me orgulho muito e por todo incentivo e apoio.

A todos os colegas dos demais laboratórios do departamento pelo carinho de sempre.

A todos os professores, sem exceção, por terem me recebido com tanto carinho, pela torcida e por contribuírem com seus conhecimentos e experiências para minha vida acadêmico-científica.

Aos técnicos e secretárias do departamento Marcia, Angélica, Emanoela Araújo Rosileude, Vinícius Duarte da Silva, Glória Beatriz, Denilson, Adriana, Maria de Lourdes, Wagner Brito, Carla Freitas e Tereza pelo grande carinho, cuidado e apoio de sempre.

Agradeço as instituições FAPERJ, CNPq, CAPES, e SR2-UERJ, pelo apoio financeiro oferecido para o desenvolvimento deste trabalho, e a todos que de forma direta ou indireta, colaboraram para realização desse trabalho.

Há uma força motriz mais poderosa que o vapor,
a eletricidade e a energia atômica:
a vontade.

Albert Einstein

RESUMO

CAPPELLI, Elisabete Alves. **Avaliação da influência de OxyR na resposta ao estresse e na virulência de *Corynebacterium diphtheriae***. 2018. 127 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Corynebacterium diphtheriae, principal agente etiológico da difteria, vem sendo relacionado com quadros de infecções invasivas, independentemente da produção da toxina diftérica. Além disso, quadros de difteria clássica têm sido reportados mesmo em pacientes imunizados. Estes fatos sugerem que outros mecanismos de virulência, além da toxina, estejam envolvidos na patogenicidade deste microrganismo. Diversos mecanismos de sobrevivência e disseminação dos microrganismos, no hospedeiro e no ambiente, contribuem para a patogênese das infecções bacterianas. Dentre estes, aqueles envolvidos na resposta a situações de estresse ainda permanecem incompreendidos em *C. diphtheriae*. Diante disso, este estudo teve como objetivo investigar o papel do regulador transcricional OxyR, já descrito como importante regulador envolvido na resistência e virulência de outras espécies bacterianas, na patogênese de *C. diphtheriae*. Neste sentido, a cepa parental CDC-E8392 e a cepa mutante (LDCIC-L2), incapaz de produzir OxyR, foram comparadas quanto à expressão gênica e a capacidade de sobrevivência em condições de estresse. Além disso, foram comparadas quanto ao seu potencial patogênico, a partir de ensaios de interação celular, de formação de biofilme, de interação com proteínas plasmáticas e de matriz extracelular, e de infecção em modelos *in vivo* em nematódeo *C. elegans* e em camundongos. Os resultados indicaram que OxyR regula negativamente a expressão de catalase e a resposta ao H₂O₂, e parece estar envolvido também na expressão de *cspA* e na resistência ao estresse oxidativo gerado pelo ozônio. A cepa mutante apresentou uma redução significativa na capacidade de ligação à fibronectina, ao colágeno e ao fibrinogênio. A influência do OxyR nas propriedades de virulência de *C. diphtheriae* também foi evidenciada pela maior capacidade desse mutante em sobreviver no compartimento intracitoplasmático de células epiteliais humanas e macrófago e por, aparentemente, levar a um processo inflamatório mais evidente em articulação de membro posterior em camundongos. Ademais, apesar da infecção por ambas as cepas de *C. diphtheriae*, levar a uma produção aumentada de ERO e ERN pelas células epiteliais respiratórias, aquelas infectadas pela cepa mutante produziram significativamente mais NO do que as infectadas pela selvagem. No entanto, a interrupção do OxyR não induziu diferença significativa na formação de biofilme em superfícies abióticas hidrofílicas (vidro) e hidrofóbicas (poliestireno), em presença e ausência de ferro, e nos perfis de susceptibilidade a doze agentes antimicrobianos testados. Além disso, o OxyR parece não influenciar na patogenicidade em *C. elegans*, uma vez que não houve diferença significativa nos ensaios de colonização e morte do nematodo pelas cepas de *C. diphtheriae* analisadas, embora, tenha sido observado uma maior formação do efeito *bagging* em vermes infectados pela cepa mutante. Infere-se, portanto, que os efeitos do sistema OxyR sobre a virulência de *C. diphtheriae* parecem, não estar exclusivamente relacionados com a regulação de genes de resistência ao estresse, mas também a outros processos clinicamente relevantes que permitem a este patógeno permanecer nos tecidos do hospedeiro, independentemente das respostas inflamatória e celular do sistema imune.

Palavras - chave: *C. diphtheriae*. OxyR. Estresse oxidativo. Estresse térmico. Virulência. Biofilme.

ABSTRACT

CAPPELLI, Elisabete Alves. **Influence of OxyR in stress response and virulence of *Corynebacterium diphtheriae***. 2018. 127 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Corynebacterium diphtheriae, the major etiological agent of diphtheria, has been associated to invasive infections, regardless of diphtheria toxin production. This fact suggests that others virulence factors, besides to the diphtheria toxin production, are involved in the pathogenicity of this microorganism. Several mechanisms of survival and dissemination of the microorganism, both in the host and in the environment, contribute to the bacterial infections pathogenesis. Amongst the pathogenic mechanisms, the response of *C. diphtheriae* to different stress responses still remain misunderstood. The aim of this study was to investigate the role of the OxyR, already described as an important regulator involved in the resistance and virulence of other bacterial species, in the *C. diphtheriae* pathogenesis. Therefore, the parental strains CDC-E8392 and the mutant (LDCIC-L2), unable to produce OxyR, were compared for gene expression and survival ability under stress conditions. In addition, both strains were compared for their pathogenic potential, through interaction with epithelial cells and macrophages, biofilm formation, interaction with plasma and extracellular matrix proteins assays and *in vivo* infection to *C. elegans* nematodes and in Swiss Webster mice. The results indicated that OxyR regulates negatively the catalase expression and response to H₂O₂. The interruption of expression of OxyR also modulated the expression of *cspA* and the resistance to oxidative stress generated by ozone. The mutant strain showed a significant reduction in the capacity of binding to fibronectin, collagen and fibrinogen. The influence of OxyR on the virulence properties of *C. diphtheriae* was also evidenced by ability of the mutant strain to survive in the intracytoplasmic compartment of human epithelial cells and macrophage and to induce a more evident inflammatory process in knee joint in mice. In addition, despite the cellular infection of respiratory cells by *C. diphtheriae* strains lead to increased production of ROS and RNS, the OxyR⁻ mutant strain induced a significantly higher production of NO than the cells infected with the wild type strain. However, interruption of OxyR did not induce a significant difference in both biofilm formation on hydrophilic (glass) and hydrophobic (polystyrene) abiotic surfaces, in the presence or absence of iron, and in the susceptibility profiles to antimicrobial agents. Furthermore, OxyR seem not to influence the pathogenicity of *C. diphtheriae* in *C. elegans*, since there was no significant difference in the nematode colonization and death assays with the strains analyzed, although a greater formation of the bagging effect has been observed in worms infected by the mutant strain. In conclusion, OxyR effects on *C. diphtheriae* virulence seem not to be solely related to the regulation of both oxidative and cold shock stress response, but are also associated with other clinically relevant processes that allow this pathogen to persist in the host tissues, despite inflammatory and cellular responses.

Key Words: *C. diphtheriae*. OxyR. Oxidative stress. Stress. Virulence. Biofilm.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Cobertura da vacina tríplice bacteriana e número de casos de difteria reportados no período de 1980-2016	26
Figura 2 -	Representação esquemática da estrutura do envelope celular de corinebactérias	32
Figura 3 -	Ativação do sistema OxyR	44
Figura 4 -	Comparação entre as sequências oligonucleotídicas das cepas de <i>C. diphtheriae</i> com a sequência de <i>oxyR</i> de <i>C.diphtheriae</i> CDC-E8392.....	69
Figura 5 -	Domínios conservados da proteína OxyR de <i>C. diphtheriae</i>	70
Figura 6 -	Modelo tridimensional da proteína OxyR de <i>C. diphtheriae</i> CDC-E8392	71
Figura 7 -	Principais estruturas análogas a sequência da proteína OxyR de <i>C. diphtheriae</i> CDC-E8392	72
Figura 8 -	Sensibilidade das cepas selvagem e mutante de <i>C. diphtheriae</i> frente ao gás de ozônio	74
Figura 9 -	Expressão do gene <i>katA</i> pelas cepas selvagem e mutante de <i>C. diphtheriae</i>	76
Figura 10 -	Expressão de <i>cspA</i> pelas cepas selvagem e mutante de <i>C. diphtheriae</i> após o choque frio	77
Figura 11 -	Influência de OxyR e privação de ferro na produção de biofilme em poliestireno por <i>C. diphtheriae</i>	79
Figura 12 -	Influência do OxyR sobre a natureza química do biofilme formado por <i>C. diphtheriae</i> na presença e sob privação de ferro	80
Figura 13 -	Ligação de <i>C. diphtheriae</i> a proteínas plasmáticas e de matriz extracelular	81
Figura 14 -	Produção de NO, ERO e OONO- por células epiteliais respiratórias A549 infectadas com <i>C. diphtheriae</i>	84
Figura 15 -	Produção de NO por células epiteliais respiratórias HEp-2 infectadas com <i>C. diphtheriae</i>	85
Figura 16 -	Sobrevivência de <i>C. elegans</i> após interação com <i>C. diphtheriae</i>	86

Figura 17 -	Formação de <i>bagging</i> e <i>star</i> induzido pela infecção de <i>C. elegans</i> pela cepa mutante de <i>C. diphtheriae</i>	87
Figura 18 -	Colonização de <i>C. elegans</i> pela cepa de <i>C. diphtheriae</i> mutante para o gene <i>oxyR</i>	88
Figura 19 -	Micrografias histológicas de articulações de membros posteriores de camundongos infectados experimentalmente por vi a caudal com cepas de <i>C.diphtheriae</i> – Parte I - Membrana sinovial e tecido conjuntivo da membrana sinovial	90
Figura 20 -	Micrografias histológicas de articulações de membros posteriores de camundongos infectados experimentalmente por via caudal com cepas de <i>C.diphtheriae</i> – Parte II – Cartilagem	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características microbiológicas das cepas de <i>C. diphtheriae</i> utilizadas neste estudo	51
Tabela 2 - Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de amplificação	56
Tabela 3 - Confirmação das cepas em estudo através do sistema APICoryne, através do APICoryne e por MALDI-TOF	68
Tabela 4 - Influência da interrupção do gene <i>oxyR</i> na susceptibilidade a espécies reativas de oxigênio	73
Tabela 5 - Influência da interrupção do gene <i>oxyR</i> na capacidade de <i>C. diphtheriae</i> de aderir a superfícies abióticas	78
Tabela 6 - Contagem de bactérias viáveis (UFC/mL) durante a interação das cepas mutante e selvagem de <i>C. diphtheriae</i> com células epiteliais respiratórias (HEP-2 e A-549) e macrófagos humanos U-937	82

LISTA DE ABREVIACÕES

A549	Célula de carcinoma de pulmão humano
AA	Aderência Agregativa
AD	Aderência Difusa
ADP-R	Adenosina difosfato-Ribose
AL	Aderencia Localizada
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CDC	<i>Center for Disease Control</i>
cdiLAM	Lipomanana ou Lipoarabinomanana de <i>Corynebacterium diphtheriae</i>
cDNA	DNA complementar
CIM	Concentrao Inibitria Mínima
Cip	<i>Cold Induced Protein</i>
CLSI	<i>Clinical e Laboratory Standards Institute</i>
CMNR	<i>Corynebacterium, Mycobacterium, Nocardiae Rodococcus</i>
CSP	<i>Cold Shock Protein</i>
Ct	<i>Cycle threshold</i>
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMEM	<i>Dulbecco Modified Essential Medium</i>
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i>
DTP	<i>Diphtheria-tetanus-pertussis</i>
DtxR	<i>Diphtheria toxin repressor</i>
DO	Densidade ptica
ECDC	<i>European Center for Disease Prevention and Control</i>
EDTA	Etilenodiamina tetra-acético
EF-2	Fator de Elongamento 2
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO	Espécies Reativas de Oxignio
FA	Fragmento A
FB	Fragmento B
Fbg	Fibrinognio
Fn	Fibronectina

HEP-2	Células Epiteliais de Carcinoma de Laringe Humano
HG-EGF	Receptor de Heparina na célula eucariótica
IPTG	Isopropil- β -D-galactosídeo
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LAM	Lipoarabnomanana
LB	Luria Bertani
LDCIC	Laboratório de Difteria e Corinebactérias de Importância Clínica
LM	Lipomanana
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight</i>
MEM	<i>Modified Essencial Médium</i>
MHB	<i>Muller Hinton Broth</i>
MS	Ministério da Saúde
NAD	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i>
NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NO	<i>Nitric Oxide</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAI	Ilhas de Patogenicidade
PBS	Tampão salina fosfato
PBST	PBS- Tween
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
RT	Transcriptase Reversa
RT-qPCR	PCR quantitativo
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
SAD	Soro Anti-diftérico
SFB	Soro Fetal Bovino
SOD	Superóxido dismutase
Spa	Sortase-mediated <i>pilus</i> assembly
TD	Toxina Diftérica
Te ^R	Resistência ao telurito
TDCM	Dicorinomicolatotrealose
TMCM	Monocorinomicolatotrealose
TSA	<i>Trypticase Soy Agar</i>

TSB	<i>TrypticaseSoyBroth</i>
UNICEF	Fundo das Nações Unidas para a Infância
U937	Macrófagos humanos

LISTA DE UNIDADES

ng	Nanograma
Kg	Kilograma
Da	Dalton
μL	Microlitros
min	Minutos
rpm	rotação por minuto
$^{\circ}\text{C}$	graus Celsius
mM	Milimolar
U	Unidade
V	Volt
mA	Miliamper
mL	Mililitros
g	Gravidade
μM	Micromolar
nM	Nanomolar
μg	Micrograma
p/v	peso por volume
h	Hora
M	Molar
pH	potencial de hidrogênio
mg	Miligrama

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	20
1	REVISÃO DA LITERATURA	22
1.1	Difteria	22
1.1.1	<u>Aspectos Microbiológicos</u>	22
1.1.2	<u>Aspectos Clínicos</u>	23
1.1.3	<u>Tratamento e Prevenção</u>	24
1.1.4	<u>Aspectos epidemiológicos</u>	25
1.1.5	<u>Diagnóstico Laboratorial</u>	28
1.2	Mecanismos de Virulência de <i>C. diphtheriae</i>	29
1.2.1	<u>Toxina diftérica</u>	30
1.2.2	<u>Componentes do envelope celular</u>	31
1.2.2.1	Lipomanana (LM) e lipoarabinomanana (LAM).....	32
1.2.2.2	Ácidos Micólicos.....	33
1.2.2.3	Sialidasas.....	33
1.2.2.4	Carboidratos de superfície.....	34
1.2.2.5	Hidrofobinas.....	34
1.2.2.6	Adesinas fimbriais.....	35
1.2.2.7	Adesinas não-fimbriais.....	36
1.2.3	<u>Resistência ao telurito</u>	36
1.2.4	<u>Sobrevivência intracelular</u>	37
1.2.5	<u>Captação de ferro</u>	37
1.3	Estresse bacteriano	38
1.3.1	<u>Estresse oxidativo</u>	38
1.3.1.1	Danos moleculares causados pelas ERO.....	40
1.3.1.2	Proteção contra as ERO.....	40
1.3.1.2.1	Sistema SOS.....	41
1.3.1.2.2	Sistema SoxRS.....	42
1.3.1.2.3	Sistema OxyR.....	42
1.3.1.3	Agentes oxidantes.....	45
1.3.1.3.1	Paraquate.....	45
1.3.1.3.2	Ozônio.....	45

1.3.2	<u>Estresse Térmico</u>	46
2	JUSTIFICATIVA	48
3	Objetivos Gerais	49
3.1	Objetivos Específicos	49
4	MATERIAIS E MÉTODOS	50
4.1	Origem das cepas bacterianas e condições de cultivo	50
4.2	Construção da cepa de <i>C. diphtheriae</i> mutante LDCIC-L2 fluorescente ..	51
4.3	Análise da estrutura tridimensional e de domínios conservados da proteína OxyR por bioinformática	52
4.4	Investigação do envolvimento de OxyR na resposta a agentes oxidantes e antimicrobianos	52
4.4.1	<u>Ensaio de susceptibilidade a ERO</u>	52
4.4.2	<u>Ensaio de susceptibilidade a antimicrobianos</u>	53
4.4.3	<u>Ensaio de susceptibilidade ao gás de ozônio</u>	53
4.5	Avaliação da expressão gênica	54
4.5.1	<u>Confecção dos oligonucleotídeos iniciadores</u>	54
4.5.2	<u>Extração e tratamento do RNA bacteriano</u>	54
4.5.3	<u>Síntese do DNA complementar (cDNA)</u>	55
4.5.4	<u>PCR quantitativo (qPCR)</u>	56
4.5.4.1	Determinação da eficiência dos iniciadores.....	57
4.5.4.2	Reações para quantificação relativa e análise de expressão diferencial dos genes analisados.....	57
4.5.5	<u>Determinação da ausência de DNA genômico</u>	58
4.5.6	<u>Determinação da curva de dissociação</u>	58
4.6	Análise da influência de OxyR na formação do biofilme em superfícies bióticas	59
4.6.1	<u>Avaliação da formação de biofilme em superfície de vidro</u>	59
4.6.2	<u>Avaliação da formação de biofilme em superfície de poliestireno</u>	60
4.6.3	<u>Avaliação da formação de biofilme em poliestireno sob condições limitantes de ferro</u>	60
4.6.4	<u>Análise da composição do biofilme formado sobre superfícies de poliestireno através de colorações específicas</u>	61

4.7	Análise do envolvimento de OxyR na interação de <i>C. diphtheriae</i> com proteínas plasmáticas e de matriz extracelular de origem humana.....	61
4.8	Investigação da participação de OxyR nos processos de interação com células humanas epiteliais respiratórias A549 e HEP-2 e macrófagos humanos U937.....	62
4.8.1	<u>Preparo das linhagens celulares.....</u>	62
4.8.2	<u>Ensaio quantitativo de aderência e invasão bacteriana.....</u>	63
4.8.3	<u>Determinação do padrão de aderência.....</u>	63
4.9	Deteção e quantificação da produção de ERO e ERN pelas células eucarióticas humanas.....	64
4.10	Avaliação da participação de OxyR na infecção do nematódeo <i>C. elegans</i> por <i>C. diphtheriae</i>.....	64
4.10.1	<u>Ensaio de morte e colonização de <i>C. elegans</i> por <i>C. diphtheriae</i>.....</u>	64
4.10.2	<u>Ensaio da formação de <i>star</i> por <i>C. elegans</i> induzido por <i>C. diphtheriae</i>.....</u>	65
4.11	Análise da influência de OxyR no potencial artritogênico de <i>C. diphtheriae</i> em camundongos.....	65
4.11.1	<u>Infecção dos camundongos.....</u>	65
4.11.2	<u>Análises Histopatológicas.....</u>	66
4.12	Análises Estatísticas.....	67
5	RESULTADOS.....	68
5.1	Confirmação da identificação das cepas bacterianas em estudo.....	68
5.2	Análises de Bioinformática.....	69
5.2.1	<u>Identificação de domínios conservados.....</u>	69
5.2.2	<u>Análise do modelo tridimensional.....</u>	70
5.3	Influência de OxyR na susceptibilidade de <i>C. diphtheriae</i> a agentes antimicrobianos e ERO.....	73
5.4	Influência de OxyR na susceptibilidade de <i>C. diphtheriae</i> ao gás ozônio ..	74
5.5	Influência da proteína OxyR na expressão de genes de relacionados ao estresse por <i>C. diphtheriae</i>.....	75
5.5.1	<u>Expressão do gene <i>katA</i> pelas cepas de <i>C. diphtheriae</i>.....</u>	75
5.5.2	<u>Expressão do gene <i>cspA</i> pelas cepas de <i>C. diphtheriae</i>.....</u>	76
5.6	Influência de OxyR na capacidade de <i>C. diphtheriae</i> aderir a superfícies abióticas.....	77

5.7	Avaliação da influência do ferro na formação de biofilme em poliestireno por <i>C. diphtheriae</i>	78
5.8	Influência de OxyR sobre a natureza química do biofilme formado por <i>C. diphtheriae</i> na presença e sob provação de ferro	79
5.9	Influência de OxyR na capacidade de interação de <i>C. diphtheriae</i> com proteínas de matriz extracelular e plasmática	81
5.10	Influência de OxyR nos processos de interação de <i>C. diphtheriae</i> com células eucarióticas	81
5.11	Influência de OxyR na produção de ERO e ERN por células epiteliais respiratórias das linhagens A549 e HEp-2	83
5.12	Influência de OxyR na sobrevivência de nematódeos <i>C. elegans</i> infectados com cepas mutante e selvagem de <i>C. diphtheriae</i>	85
5.12.1	<u>Sobrevivência de <i>C. elegans</i> após interação com <i>C. diphtheriae</i></u>	85
5.12.2	<u>Colonização de <i>C. elegans</i> pela cepa LDCIC-L2 pXMJ19mCherry</u>	87
5.13	Papel da proteína OxyR no potencial artritogênico de <i>C. diphtheriae</i>	88
6	DISCUSSÃO	92
	CONCLUSÃO	104
	REFERÊNCIAS	106
	ANEXO	127

INTRODUÇÃO

Corynebacterium diphtheriae é o principal agente etiológico da difteria, uma doença toxêmica que acomete o trato respiratório e a pele (GALAZKA, 2000; HADFIELD et al., 2000; OTT et al., 2013). Apesar da implantação de programas de imunização em diversos países e da diminuição considerável no número de casos, a difteria ainda hoje permanece um grave problema de Saúde Pública mundial. Segundo os dados de 2014 da Organização Mundial de Saúde (OMS) e do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), surtos de difteria continuam ocorrendo em diversos países em desenvolvimento e industrializados, além de a doença permanecer endêmica em diversas partes do mundo. No Brasil, casos de difteria ainda ocorrem em diferentes Estados (SANTOS et al., 2014).

Mesmo em pacientes imunizados, cepas de *C. diphtheriae*, sobretudo não produtoras de toxina (TD), são capazes de causar, além da difteria clássica, infecções invasivas, tais como, osteomielite, endocardite, bacteremias, pneumonias, abscesso esplênico e artrite séptica. Além disso, quadros de difteria atípica, ou seja, sem os sinais patognomônicos da doença, incluindo a formação de pseudomembrana, têm sido relatados (CLINTON et al., 2013; FARFOUR et al., 2012; HIRATA Jr et al., 2008; PULITI et al., 2006).

Considerando o fato de que tanto as cepas produtoras de TD quanto as não produtoras possuem a capacidade de causar infecções sistêmicas, inclusive levando a óbito, torna-se evidente que outros mecanismos de virulência estão envolvidos na patogenicidade de *C. diphtheriae*. Dentre estes, já foi descrita a capacidade de aderência e sobrevivência do microrganismo no interior de células do hospedeiro, incluindo células epiteliais respiratórias e macrófagos, bem como a capacidade de aderir a diferentes superfícies com a formação de biofilmes. Assim, a bactéria pode permanecer viável na superfície de material inerte no ambiente hospitalar ou domiciliar, o que contribui para a transmissão da doença e para a manutenção do processo infeccioso (GOMES et al., 2009; MATTOS-GUARALDI; FORMIGA, 1991).

O estresse oxidativo é a condição estressante mais comum enfrentada pelas bactérias. Os organismos vivos desenvolveram ao longo dos anos, diversos sistemas antioxidantes para se protegerem contra os efeitos nocivos de espécies reativas de oxigênio (ERO), como superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que são inevitavelmente gerados como subprodutos durante a respiração aeróbica (CALDÉRON et al., 2006; STORZ; IMLAY, 1999).

Além disso, células bacterianas, de levedura e de mamíferos desenvolvem respostas adaptativas a níveis elevados de estresse oxidativo, indicando que essas células detectam um aumento nos níveis de ERO, o que leva à transdução de sinais para aumentar a expressão de genes envolvidos na resposta ao estresse (STORZ; IMLAY, 1999). Este aumento pode ocorrer em função da indução de sistemas de ativação transcricional, que regulam diversos genes envolvidos na resposta ao estresse oxidativo, dentre estes o sistema OxyR (ASAD et al., 1998). Análises moleculares em *C. diphtheriae* revelaram a presença de genes de resistência a agentes estressantes, como as ERO. Dentre os genes envolvidos diretamente na resposta às ERO, foram identificados os codificadores das enzimas catalase (*dip0281*), superóxido dismutases (*dip2261* e *dip2319*) e glutatona peroxidase (*dip1925*), e dos reguladores transcricionais OxyR (*dip1421*) e SoxRS (*dip1205* e *dip1207*) (TROST et al., 2012).

Além das atividades de proteção contra as ERO, estudos têm demonstrado que o regulador OxyR também exerce um papel na virulência bacteriana, como por exemplo, na regulação da interação de bactérias com células hospedeiras, na formação de biofilme, na produção de toxinas, na resistência a antimicrobianos e na colonização e disseminação tecidual (HONMA et al., 2009; SHANKS et al., 2007; SRINIVASAN et al., 2013).

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Difteria

A difteria é uma doença bacteriana, toxêmica, de evolução aguda que acomete principalmente o trato respiratório superior e pele. O principal agente etiológico é *C. diphtheriae*. Na sua forma clássica, a doença apresenta tanto manifestações locais (como a formação de uma pseudomembrana acinzentada), em função da produção da toxina diftérica (TD), multiplicação do microrganismo e da resposta imune do hospedeiro, quanto sistêmicas, em virtude da circulação da toxina. A TD é uma exotoxina potente de natureza proteica com tropismo pelo miocárdio, sistema nervoso e glândulas supra-renais (CERDEÑO-TÁRRAGA et al., 2003; HADFIELD et al., 2000; HOLMES, 2000; MATTOS-GUARALDI et al., 2003).

1.1.1 Aspectos Microbiológicos

A espécie *C. diphtheriae* compreende bacilos Gram-positivos, pleomórficos, não formadores de esporos e que tendem a formar arranjos em paliçada e/ou letras chinesas. Bioquimicamente são caracterizados como microrganismos catalase-positivos, pirazinamidase-negativos, urease-negativos, CAMP-negativos e DNase-positivos; possuem a capacidade de reduzir nitrato e telurito, além de fermentar carboidratos diversos, especialmente a glicose e a maltose, podendo fermentar ou não a sacarose (CERDEÑO-TÁRRAGA et al., 2003; FUNKE; BERNARD, 2007; MATTOS-GUARALDI; FORMIGA, 1991; PIMENTA et al., 2008).

A espécie é subdividida em quatro biovars: *gravis*, *intermedius*, *mitis* e *belfanti* cuja caracterização é feita com base nas características morfológicas e bioquímicas. As cepas do biovar *intermedius* podem ser facilmente distintas pela morfologia das colônias, que são pequenas de cor cinza ou translúcidas em ágar sangue, o que não ocorre com os outros biovars que apresentam morfologias semelhantes. Bioquimicamente, a capacidade de redução de nitrato e a lipofilia permitem a diferenciação. Os biovars *gravis*, *intermedius* e

mitis apresentam a capacidade de reduzir o nitrato, diferentemente do biovar *belfanti*; apenas o biovar *intermedius* apresenta colônias lipofílicas (FUNKE; BERNARD, 2007).

Embora classicamente considerado um patógeno estritamente humano, *C. diphtheriae* também é capaz de infectar animais como gatos e cavalos (HALL et al., 2010). Além da espécie *C. diphtheriae*, outras duas espécies também são capazes de produzir toxina diftérica: *C. ulcerans* e *C. pseudotuberculosis*, ambos de importância veterinária que podem causar infecções em humanos (MATTOS-GUARALDI et al., 2011).

1.1.2 Aspectos Clínicos

A difteria é transmitida pelo contato direto do indivíduo doente ou portador assintomático com pessoas susceptíveis, através de gotículas de secreção respiratória, eliminadas por tosse, espirro ou ao falar. Em casos raros, pode ocorrer a contaminação por fômites. Infecções de pele podem ser mais contagiosas do que as do trato respiratório. O período de incubação da difteria é, em geral, de 1 a 6 dias, podendo ser mais longo. Já o período de transmissibilidade dura, em média, até 2 semanas após o início dos sintomas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018; QUICK et al., 2000).

Após um período de 2 a 6 dias de incubação os sintomas iniciais da doença são geralmente inespecíficos, de evolução subaguda, que se assemelham aos quadros de viroses respiratórias altas. Os sítios mais comuns de infecção são as amígdalas e faringe e, menos frequentemente, a laringe. Infecções nestes locais geralmente estão associadas à absorção sistêmica da toxina. Os sintomas incluem febre baixa, fraqueza, dor de garganta, e anorexia. A pseudomembrana (placa branco-acinzentada fortemente aderida ao tecido) aparece em torno de 30% dos casos e pode ser formada como pequenas placas nas tonsilas ou estender-se a maior parte do palato mole. A formação extensa da pseudomembrana pode resultar em obstrução respiratória. Pacientes com doença severa podem desenvolver edema nas áreas submandibular e anterior do pescoço com linfadenopatia, o que dá a aparência de “pescoço de touro”, sinal patognomônico da doença, juntamente com a pseudomembrana (CDC, 2015).

O estado geral do paciente agrava-se com a evolução da doença, não apenas pela progressão da pseudomembrana, mas pela absorção cada vez maior de toxina, responsável pelos efeitos sistêmicos (GILBERT, 1997). A ação da toxina diftérica no miocárdio pode resultar em insuficiência cardíaca aguda, frequentemente fatal. As manifestações neurológicas

estão associadas com a gravidade de sintomas respiratórios. A paralisia se inicia pelo palato mole e faringe, até que a neuropatia atinge o crânio e músculos da face, além da laringe, o que contribui para o risco de bronco-aspiração. Pneumonia secundária e falha respiratória resultam da paralisia do diafragma. A análise microscópica demonstra ação mielotóxica que leva à desmielinização da fibra nervosa (LOZHNIKOVA et al., 1997). Outras complicações incluem otite média e insuficiência respiratória devido à obstrução aérea, principalmente em crianças (CDC, 2015).

A difteria também pode apresentar-se na forma cutânea com aparecimento de erupções ou úlceras. Há formação de uma pseudomembrana com bordas bem demarcadas, que ao se desprender deixa uma lesão serosa e hemorrágica. As lesões são dolorosas com duração de 1 a 2 semanas (HÖFLER, 1991). Ao provocarem lesões cutâneas, as cepas ainda são capazes de produzir toxina, devendo, portanto, ser identificadas e analisadas quanto à produção da mesma (WAGNER et al., 2010). Qualquer lesão de pele crônica pode albergar o bacilo diftérico. A severidade da difteria cutânea com cepas de *C. diphtheriae* toxinogênicas aparentemente é menor do que a dos outros sítios de infecção (CDC, 2015).

Cepas de *C. diphtheriae* não produtoras de TD também são capazes de causar infecções tais como faringite e tonsilite severas, além de infecções invasivas, tais como endocardite, artrite séptica, abscessos esplênicos e osteomielite (FARFOUR et al., 2012; GOLAZ et al., 2000; GOMES et al., 2009; HIRATA Jr et al., 2008; MATTOS-GUARALDI et al., 2001; POILANE et al., 1995). É importante ressaltar que quadros clínicos atípicos, com ausência de formação de pseudomembrana, podem ocorrer em indivíduos parcialmente imunizados e infectados por cepas toxinogênicas de *C. diphtheriae*, independentemente de sua capacidade de produção de toxina (CDC, 2015; MATTOS-GUARALDI et al., 2001).

1.1.3 Tratamento e Prevenção

O tratamento mais eficaz para difteria é a administração do soro antidiftérico (SAD), uma antitoxina produzida em cavalo, associada à terapia antimicrobiana adequada para eliminar o microrganismo do sítio de infecção e interromper a produção da toxina. O SAD não neutraliza toxina ligada aos tecidos, apenas a circulante e deve ser administrado o mais cedo possível após o diagnóstico clínico presuntivo (CDC, 2015; FUNKE et al., 1997). Estudos prévios demonstraram que a administração do SAD pode não ser eficaz se

administrado após o segundo dia de sintomas de difteria em pacientes com polineuropatia (LOGINA; DONAGHY, 1999). Penicilina e eritromicina têm sido utilizadas como drogas de escolha para erradicação de *C. diphtheriae*. Contudo, resistência a esses e outros antimicrobianos já foi relatada. A terapia antimicrobiana para *C. diphtheriae* é recomendada para prevenção dos contatos. O SAD não deve ser utilizado para esta finalidade (CDC, 2015; PATEY et al., 1997; PEREIRA et al., 2008).

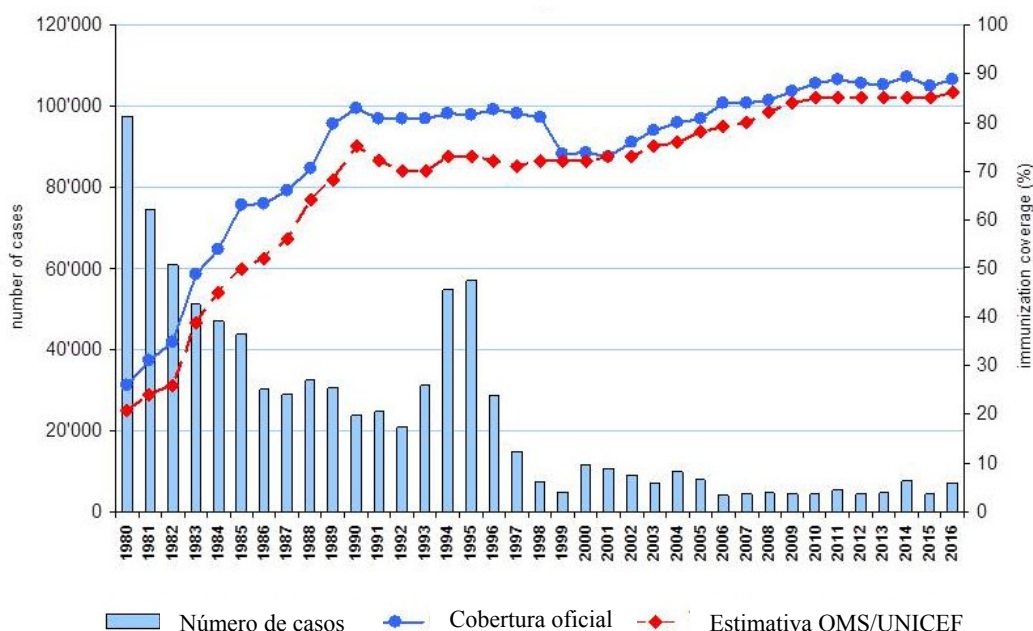
A prevenção da difteria é realizada através da vacina contendo a TD inativada (toxóide). O esquema básico de imunização na infância é feito com três doses da vacina DTP (difteria, tétano e coqueluche) aos dois, quatro e seis meses de vida. O primeiro reforço é feito com a DTP aos 15 meses e o outro entre quatro e seis anos de idade. Em função da diminuição dos títulos de anticorpos protetores com o decorrer do tempo, é recomendado o reforço a cada 10 anos em adultos (CDC, 2017; OMS, 2017).

1.1.4 Aspectos epidemiológicos

A difteria, ao longo da história foi considerada uma das principais causas de morbidade e mortalidade, tendo causado epidemias devastadoras principalmente em crianças, em todo mundo. No século XIX, a letalidade da difteria respiratória chegava a 50% em algumas regiões. As epidemias de difteria devastaram a Europa durante a Segunda Guerra Mundial, causando cerca de 1 milhão de casos e 50.000 mortes em 1943. No final de década de 1940, vacinas baseadas no toxoide diftérico tornaram-se disponíveis na Europa e América do Norte levando a redução do número de casos da doença (GALAZKA, 2000; MATTOS-GUARALDI et al., 2003; OMS, 2017).

Após o estabelecimento do Programa Ampliado em Imunização, na década de 1970, a incidência da difteria diminuiu drasticamente em todo o mundo (Figura 1). Contudo, na década de 1990, um novo surto de difteria reapareceu na Federação Russa e países da antiga República Soviética com mais de 157 mil casos e 5 mil mortes. Aproximadamente 70% dos casos ocorreram em indivíduos adultos e em adolescentes maiores de 15 anos de idade. Adultos da faixa etária entre 40 e 49 corresponderam a quase metade do número de casos fatais em alguns países (GALAZKA, 2000; OMS, 2017).

Figura 1 - Cobertura da vacina tríplice bacteriana e número de casos de difteria reportados no período de 1980-2016



Legenda: Colunas -número de casos reportados de difteria no respectivo ano.; tracejado azul – cobertura vacinal oficial; tracejado vermelho - Estimativa da UNICEF (Fundo das Nações Unidas para a Infância) e OMS.

Fonte: OMS, 2017

A difteria continua sendo um problema de saúde pública em países sem uma boa cobertura vacinal de rotina. O número anual de casos notificados (laboratorial ou clinicamente confirmado ou epidemiologicamente relacionado) permaneceu relativamente inalterado nos últimos 11 anos. De acordo com a estimativa mais recente, 86% das crianças em todo o mundo recebem as 3 doses recomendadas da vacina contra difteria no calendário infantil, deixando 14 % sem vacinação ou com vacinação incompleta. No período de 2011 a 2015, a Índia teve o maior número de casos notificados por ano, com um total de 18.350 casos em 5 anos, seguidos pela Indonésia e Madagascar, com 3203 e 1633 casos relatados, respectivamente. A região Sudeste da Ásia foi a fonte de 55-99% de todos os casos relatados a cada ano durante esse período. A análise mostrou ainda uma subnotificação significativa dos casos para a OMS, particularmente dos países africanos e do mediterrâneo. Provavelmente, o número de casos de difteria por ano é bem maior do que o relatado (OMS, 2017).

Segundo os dados da OMS (2017) surtos de difteria ainda ocorrem em diversos países em desenvolvimento e industrializados, além de permanecer endêmica em diversas partes do mundo, particularmente em países em desenvolvimento, como Índia, Vietnã e países do Oriente Médio, América Central e Latina, incluindo o Brasil. Segundo o *European Center for Disease Prevention and Control* - ECDC (2016), casos isolados de difteria estão sendo reportados em países desenvolvidos, como Espanha, Bélgica, Alemanha, Dinamarca devido à resistência de um segmento da população a se submeter à vacinação. Um grande fluxo migratório para a Europa atingiu níveis críticos ao longo de 2015, com aumento exponencial, de centenas de milhares de pessoas. Pouco se sabe sobre a cobertura vacinal contra a difteria nos países de origem dos refugiados. Ainda segundo o ECDC, não há indicação de que estes casos representem um surto significativo de difteria entre os refugiados na Europa. No entanto, os sistemas de saúde podem não ser capazes de detectar surtos de difteria cutânea entre os refugiados devido ao acesso limitado dos mesmos aos serviços de saúde. A difteria cutânea é endêmica em países tropicais, mas é raro na Europa. A vacinação é a única proteção eficaz contra a difteria toxigênica, e indivíduos não vacinados estão em risco potencial de desenvolver infecção fatal com *C. diphtheriae* toxigênico.

No Brasil, desde a década de 1990, a cobertura vacinal para difteria manteve-se em taxas progressivamente satisfatórias, tendo alcançado 99% da população infantil. Contudo, a difteria ainda permanece incidindo de forma endêmica, além de ocorrerem surtos epidêmicos em algumas regiões. Os quadros de difteria clássica têm sido relacionados predominantemente com cepas de *C. diphtheriae* biovar *mitis* pertencentes aos tipos fermentador e não fermentador de sacarose, apesar de também serem observados casos de difteria por cepas de *C. diphtheriae* biovar *gravis* e *C. diphtheriae* biovar *intermedius* (MATTOS-GUARALDI et al., 2011).

No Estado do Maranhão, foram confirmados 27 casos de difteria, no ano de 2010. A maior parte em crianças parcialmente (n=16) ou completamente imunizadas (n=10). Três pacientes evoluíram para óbito, dois destes com esquema de vacinação completo (SANTOS et al., 2014).

Estudos realizados no Rio de Janeiro demonstraram a possibilidade de ocorrer difteria clássica em indivíduos vacinados. A espécie *C. diphtheriae* permanece circulando em nosso ambiente causando, além da difteria clássica, infecções sistêmicas e/ou atípicas (MATTOS-GUARALDI; FORMIGA, 1998; MATTOS-GUARALDI et al., 2001).

1.1.5 Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico da difteria geralmente é feito com base na apresentação clínica, uma vez que é imperativo iniciar rapidamente a terapia presuntiva pois o atraso pode resultar em morte. No entanto, às vezes é difícil diagnosticar a difteria clinicamente, particularmente nos países onde a doença é raramente observada. A difteria é frequentemente confundida com outras condições, como dor de garganta severa por estreptococos, angina de Vincent ou febre glandular. Portanto, o diagnóstico microbiológico preciso é crucial e é sempre considerado. O laboratório também pode ajudar o clínico, eliminando casos suspeitos ou contatos de investigação clínica adicional, evitando tratamento desnecessário ou medidas de controle, como o isolamento (CDC, 2015; EFSTRATIOU et al., 2000).

A cultura da lesão é feita para confirmar o diagnóstico. É fundamental coletar amostra da área da faringe, especialmente as áreas descoloridas, ulcerações e criptas tonsilares, sem remoção da pseudomembrana. A OMS recomenda a cultura em Agar Sangue e meio seletivo de telurito para o primário isolamento de *Corynebacterium spp.* (EFSTRATIOU et al., 2000; SEKAR et al., 2017). O meio de cultura contendo telurito proporciona uma vantagem seletiva para o crescimento deste organismo (CDC, 2015). Após o isolamento, devem ser realizados os testes bioquímicos, de susceptibilidade antimicrobiana, biotipagem e de toxigenicidade (EFSTRATIOU, 2000; EFSTRATIOU; GEORGE, 1999; SEKAR, et al., 2017).

Os ensaios fenotípicos convencionais incluem a produção de catalase, motilidade, redução de nitrato, hidrólise de uréia e esculina, reação de CAMP e produção de Dnase, além da fermentação de carboidratos como glicose, maltose e sacarose (BESA et al., 2014; CERDEÑO-TÁRRAGA et al., 2003; HIRATA Jr et al., 2011; MATTOS-GUARALDI; FORMIGA; ANDRADE, 1999; PIMENTA et al., 2008). Além dos testes convencionais, são disponibilizados comercialmente sistemas compactos de identificação, como o sistema API[®]Coryne (APIbioMerieux, Inc., La Balme les Grottes, France) que consiste numa combinação 20 provas bioquímicas, e sistemas automatizados de identificação. Além das técnicas de cultura e bioquímica, as técnicas de MALDI TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight*), PCR (*Polymerase Chain Reaction*), PCR em tempo real e ensaios de genotipagem têm sido utilizadas para a identificação de diferentes espécies de *Corynebacterium* (CDC, 2017; KONRAD, 2010).

O diagnóstico precoce e preciso de um paciente com difteria sintomática exige um método rápido e eficiente para detectar e diferenciar as espécies de corinebactérias e analisar a

diferença entre cepas toxigênicas e atoxigênicas. A PCR é particularmente útil na identificação de microrganismos inviáveis em amostras clínicas de pacientes submetidos à antibioticoterapia. Ensaios de PCR convencional e multiplex foram desenvolvidos para identificação de *C. diphtheriae* e detecção de toxinas específicas. Torres e colaboradores (2013) desenvolveram a PCR-multiplex que inclui a detecção de múltiplos genes (*toxA* e *toxB*, *dtxR*, *rpoB*, *16S rRNA* e *pld*) para a identificação de *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* e *C. pseudotuberculosis* potencialmente patogênicos. A identificação por PCR da presença da TD em *C. diphtheriae* não serve como um teste definitivo, uma vez que cepas que albergam o gen *tox*, nem sempre expressam a toxina. Dessa forma, testes *in vivo* ou *in vitro* como Elek (ELEK, 1948) ou cultura de células Vero podem ser utilizados em conjunto (BURKOVSKI, 2013; SEKAR et al., 2017).

A técnica de MALDI-TOF, baseada na composição de proteínas da bactéria, vem sendo utilizada e trouxe importantes vantagens na identificação de *Corynebacterium* spp., como a identificação utilizando uma única colônia em apenas quinze minutos (KONRAD et al., 2010).

1.2 Mecanismos de Virulência de *C. diphtheriae*

As manifestações locais e sistêmicas da difteria são principalmente relacionadas à ação da TD, o fator de virulência mais bem estudado desta espécie (WANG, 2009; PAPPENHEIMER, 1993). Contudo, a ocorrência de infecções causadas por *C. diphtheriae* em indivíduos imunizados e o crescente número de infecções invasivas causadas por cepas atoxinogênicas sugerem que outros fatores, além da TD, são importantes para o aparecimento e manutenção do processo infeccioso (MATTOS-GUARALDI; FORMIGA; PEREIRA, 2000).

Os estudos realizados nas últimas décadas sugerem que a capacidade adesiva de *C. diphtheriae* deve ser considerada, uma vez que as cepas, independente da expressão da toxigenicidade, podem aderir com intensidades variadas a diferentes substratos, sejam de natureza biótica ou abiótica, podendo inclusive formar estruturas altamente complexas, os biofilmes (GOMES *et al.*, 2009; MATTOS-GUARALDI; FORMIGA; PEREIRA, 2000), os quais possuem grande importância nos meios científico e clínico em virtude do seu papel em muitas doenças infecciosas, dentre as quais endocardite, periodontite e otite média, e na

contaminação de dispositivos hospitalares, sobretudo devido à sua alta resistência a agentes antimicrobianos (COSTERTON et al., 1999; DONLAN; COSTERTON, 2002; SHARMA;YADAV, 2008).

Além da adesividade, ganha destaque a capacidade de *C. diphtheriae* sobreviver no interior de células de linhagens epitelial e fagocítica humanas, induzindo apoptose e necrose, independentemente da expressão de TD (BERTUCCINI, BALDASSARRI; HIRATA JR et al., 2002; 2004; SANTOS et al., 2010; von HUNOLSTEIN, 2004). A sobrevivência do bacilo diftérico em células fagocíticas, em particular, sugere a presença de determinantes gênicos de resistência a substâncias oxidantes e hidrolíticas produzidas por estas células.

Em 2003, o genoma de *C. diphtheriae* biovar *gravis* foi sequenciado por Cerdeño-Tarraga e colaboradores, evidenciando que a transferência lateral de fatores de patogenicidade vai além da toxina em si, e inclui sistemas de captação de ferro, adesinas, dentre outros fatores. A partir dele, foram identificadas novas proteínas responsáveis pela sintomatologia da doença, codificadas por genes localizados dentro das ilhas de patogenicidade (PAIs) - regiões cromossômicas adquiridas pelo organismo por transferência horizontal de genes que codificam fatores de virulência de bactérias patogênicas (ANTUNES et al., 2015; D'AFONSECA et al., 2011; SANTOS et al., 2015; TROST et al., 2012).

1.2.1 Toxina Diftérica

A TD é um polipeptídeo de 535 aminoácidos com peso molecular de aproximadamente 62.000 Daltons. É composto por três domínios: fragmento aminoterminal A (FA), que corresponde ao domínio catalítico; fragmento B (FB), domínio de ligação ao receptor de heparina (HB-EGF precursor) nas células eucarióticas; e o de translocação (ou transmembranar), que permite a translocação do domínio FA do endossomo para o citosol (VAROL et al., 2014). Apenas uma molécula de TD, introduzida diretamente no citoplasma, é suficiente para matar a célula eucariótica (YAMAIZUMI, 1978).

A interação da TD com o HB-EGF favorece a endocitose com participação de clatrin. Posteriormente, complexos toxina-receptor sofrem degradação lisossomal e as moléculas que escapam da ação enzimática tornam-se as principais responsáveis pelo processo de intoxicação celular. Condições ácidas, que induzem mudança conformacional da TD, permitem sua inserção na membrana e formação de canal, pelo qual ocorre a

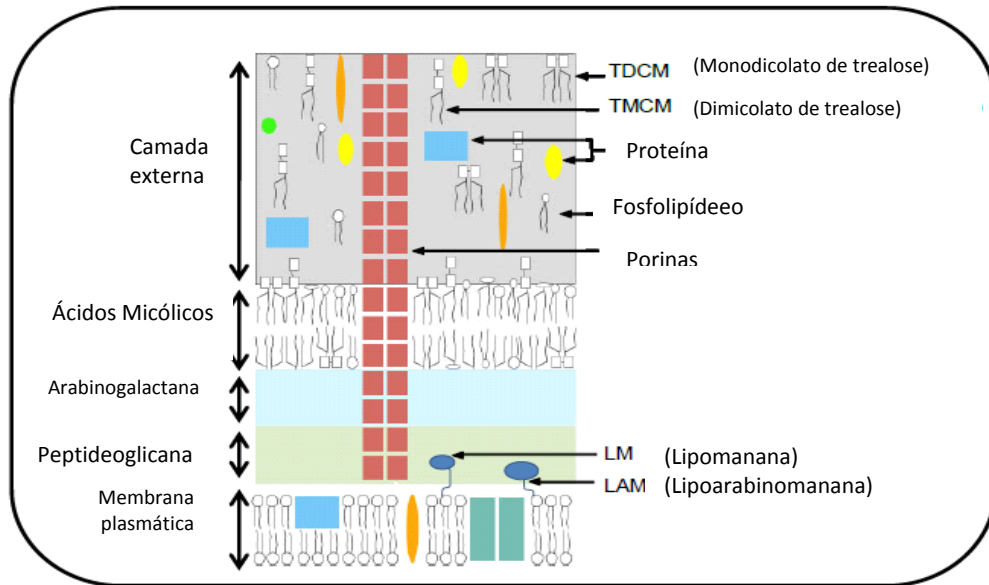
translocação do FA. O FA atua cataliticamente transferindo uma molécula de adenosina difosfato-ribose (ADP-R) do NAD para o fator de alongação (EF-2) inibindo a síntese protéica (DRAPER; SIMON, 1980; LEMICHEZ et al., 1997; MORRIS et al., 1985; MOSKAUG; SANDVIG; OLSNES, 1988).

A TD pode ser produzida apenas por cepas que possuem o gene codificador (gene *tox*), carregado por fagos lisogênicos (corinefagos) do tipo β ou β - relacionados, integrado ao seu cromossomo. A transcrição do gene *tox* é negativamente regulada por íons de ferro e uma proteína repressora DtxR (*diphtheria toxin repressor*), que também atua como um regulador global do metabolismo da espécie. Em presença de altas concentrações de ferro, o DtxR reprime a transcrição do gene *tox*, a síntese de sideróforos do microrganismo bem como de outros componentes do sistema de captura de ferro (SCHMITT, 1997; SCHMITT; TALLEY; HOLMES, 1997).

1.2.2 Componentes do envelope celular

A parede celular das espécies do gênero *Corynebacterium* é composta basicamente por mureína, ácidos graxos e ácidos micólicos (responsáveis pelo arranjo celular em forma de paliçada), estando às espécies deste grupo bioquimicamente relacionada às espécies dos gêneros *Mycobacterium* e *Nocardia* (Figura 2) (BURKOVSKI, 2013; CLARRIDGE; SPRIGEL, 1995).

Figura 2 - Representação esquemática da estrutura do envelope celular de corinebactérias



Fonte: PUECH e colaboradores (2001).

Além da função estrutural, muitos dos componentes deste envelope apresentam também papel importante na virulência de *C. diphtheriae*. Dentre eles, destacam-se:

1.2.2.1 Lipomanana (LM) e lipoarabinomanana (LAM)

Todas as espécies do gênero *Corynebacterium* apresentam arabinogalactana como polímero de parede celular (TAKEUCHI; YOKOTA, 1989). Também foi relatada a presença na superfície do *C. diphtheriae* de uma Lipomanana (LM) e Lipoarabinomanana (LAM), denominada CdiLAM (FUKUDA et al., 2013). A LAM é a principal lipoglicana presente no envelope das micobactérias e atua como importante fator de virulência, favorecendo processos de aderência, internalização, sobrevivência e persistência do microrganismo no interior da célula hospedeira, principalmente em macrófagos e células dendríticas, principais células alvo do *M. tuberculosis* (TAILLEUX et al., 2003). Em *C. diphtheriae* atua como fator de virulência facilitando a ligação às células epiteliais (MOREIRA et al., 2008).

1.2.2.2 Ácidos Micólicos

Os ácidos micólicos são os principais lipídeos constituintes do grupo CMNR (*Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus*) e possuem papel essencial na manutenção da integridade do envelope bacteriano. A monocamada de resíduos micólicos está covalentemente ligada ao arabinogalactano da parede celular e inclui diversos lipídios importantes, como, por exemplo, monocorinomicolatotrealose (TMCM) e dicorinomicolatotrealose (TDCM), que provavelmente estão dispostos de modo a formar uma bicamada (Figura 2) (DE SOUSA-D'AURIA et al., 2003).

A camada externa de ácidos micólicos das espécies de corinebactérias e micobactérias é funcionalmente equivalente a da membrana de bactérias Gram-negativas, não só em relação ao seu papel fisiológico como barreira de permeabilidade, mas também como componente importante da interação do patógeno-hospedeiro. Os constituintes da camada de ácido micólico podem ser imunoestimulantes e afetar a função dos macrófagos. Estes efeitos são melhor investigados em *M. tuberculosis*, na qual o dimicolato de trealose, também designado por cordão, inibe eventos de fusão dentro do macrófago hospedeiro e ao mesmo tempo contribui para a ativação de macrófagos (BURKOVSKI, 2013).

1.2.2.3 Sialidasas

As sialidasas, também designadas por neuraminidasas, são glicosil hidrolases que catalisam a remoção de resíduos terminais de ácido siálico de uma gama de glicoconjugados da superfície hospedeira. Através de suas atividades de trans-sialidase, as sialidasas permitem também a aquisição do ácido siálico, permitindo ao micro-organismo expo-lo na sua superfície externa. Mais do que isso, elas ainda podem funcionar diretamente como adesinas. Recentemente, uma provável exosialidase, NanH (DIP0543), foi identificada em *C. diphtheriae* e revelou possuir uma atividade de trans-sialidase, mas seu papel na exposição do ácido siálico não ficou clara (BURKOVSKI, 2013; KIM et al., 2010; MATTOS-GUARALDI; FORMIGA, 1998).

1.2.2.4 Carboidratos de superfície

O papel dos carboidratos de superfície na virulência do bacilo diftérico ainda não foi bem caracterizado. Acredita-se que os resíduos de açúcar estejam envolvidos na aderência a superfícies inertes, uma vez que cepas fermentadoras de sacarose aderem com maior intensidade à superfície do vidro. Também é possível que estes resíduos participem da interação com células hospedeiras, já que o tratamento com ácido nítrico, para remoção de resíduos de carboidratos da superfície bacteriana, aumentou em aproximadamente 80% a atividade hemaglutinante das cepas fermentadoras de sacarose. Por fim, a presença de ácido siálico, devido à sua carga negativa, pode contribuir para a evasão do sistema imune além favorecer o estabelecimento e a manutenção do patógeno nas superfícies cutâneo-mucosas do hospedeiro (MATTOS-GUARALDI; FORMIGA; ANDRADE, 1999; MATTOS-GUARALDI; FORMIGA; PEREIRA, 2000).

1.2.2.5 Hidrofobinas

A hidrofobicidade já foi descrita como envolvida na patogênese de outras espécies bacterianas, contribuindo para a evasão da fagocitose, para aderência a superfícies bióticas e abióticas, e para a sobrevivência em ambientes com variações de pH, eletrólitos e nutrientes, e na presença de substâncias tóxicas ou hidrolíticas (LJUNGH et al., 1985; MATTOS-GUARALDI; FORMIGA; ANDRADE, 1999). As cepas de *C. diphtheriae* são consideradas hidrofóbicas, porém em diferentes graus. Acredita-se que moléculas hidrofóbicas e hidrofílicas coexistam na parede celular do bacilo diftérico e que a quantidade e distribuição das mesmas justifiquem as diferenças observadas (MATTOS-GUARALDI; FORMIGA; ANDRADE, 1999; MATTOS-GUARALDI; FORMIGA; PEREIRA, 2000).

1.2.2.6 Adesinas fimbriais

Pili e fimbrias são protuberâncias proteicas que desempenham um papel importante para a fixação das bactérias às superfícies abióticas e bióticas. Yanagawa e Honda (1976) relataram pela primeira vez a presença dessa estrutura na superfície celular de *Corynebacterium renale* e sugeriram sua participação na aderência a eritrócitos (hemaglutinação). Desde então, as pilinas têm sido a estrutura de superfície celular bacteriana mais bem estudada em *C. diphtheriae*, no que diz respeito a participação na interação hospedeiro - patógeno (REARDON-ROBINSON; TON-THAT, 2014). Estes estudos revelaram que *C. diphtheriae* pode apresentar três estruturas fimbriais distintas, identificadas com Spa (*sortase-mediated pilus assembly*): *pilus* SpaA, *pilus* SpaD e *pilus* SpaH, sendo cada *pilus* formado por três subunidades menores: *pilus* SpaA (SpaABC), *pilus* SpaD (SpaDEF), *pilus* SpaH (SpaGHI). Ainda segundo eles, estas estruturas são polimerizadas e conectadas à superfície celular com a participação de diferentes sortases (BROADWAY et al., 2013; GASPAR; TON-THAT, 2006; MANDLIK et al., 2007; MANDLIK et al., 2008; TON-THAT; SCHNEEWIND, 2003).

Análises moleculares mostraram que os genes codificadores das pilinas e das sortases estão localizados em ilhas de patogenicidade, estando parcial ou completamente ausentes em algumas cepas (IWAKI et al., 2010; TROST et al., 2012). O *pilus* SpaA mostrou-se o mais frequente entre as cepas estudadas e, por causa disto, tem sido o principal alvo de estudos sobre a participação das pilinas na virulência de *C. diphtheriae*. Até o momento, já foi descrito o seu envolvimento na aderência às células epiteliais da faringe e no processo patogênico desencadeado no nematódeo *Caenorhabditis elegans*, utilizado como modelo experimental *in vivo* para estudos de virulência (BROADWAY et al., 2013. MANDLIK et al., 2007).

A presença de fimbrias foi observada em cepas de diversas espécies de corinebactérias, incluindo *C. diphtheriae*, que apresentou elevado grau de fimbriação. Tais fimbrias foram de aspecto semelhante, apresentando-se sem rigidez e com tendência à formação de feixes (YANAGAWA; HONDA, 1976).

1.2.2.7 Adesinas não-fimbriais

Além dos *pili*, os patógenos lançam mão de adesinas/invasinas de superfície para a realização de interações específicas com receptores da célula hospedeira (NIEMANN et al., 2004). Cepas de *C. diphtheriae* são capazes de expressar proteínas de superfície celular de natureza não-fimbrial capazes de reconhecer e ligar-se a receptores específicos de células eucarióticas. Uma dessas proteínas já foi bem caracterizada e é conhecida como proteína 67-72p (DIP0733) descrita como uma adesina/hemaglutinina. Essa descrição foi confirmada pela capacidade desta proteína de interagir *in vitro* com membranas de eritrócitos humanos (COLOMBO et al., 2001) e células epiteliais respiratórias HEp-2 (HIRATA Jr et al., 2004). Recentemente, foi também descrito seu papel na invasão e na indução de apoptose das células HEp-2 (SABBADINI et al., 2012).

Além da proteína DIP0733, a proteína DIP1281, anotada como invasina, tem sido estudada no processo de interação com células de linhagem epitelial de faringe. A proteína DIP1281 é um membro da superfamília NlpC/P60, que inclui proteases e proteínas associadas à invasão, encontradas em bacteriófagos, vírus de RNA, bactérias e eucariontes (ANANTHARAMAN; ARAVIND, 2003). Além da DIP1281, outros membros da família NlpC/P60 foram descritos em *C. diphtheriae* (DIP0640, DIP1621 e DIP1622), compartilhando funções similares na organização da superfície celular (AMON et al., 2008; OTT et al., 2010).

1.2.3 Resistência ao telurito

O Telurito (TeO_3^{2-}) é um composto tóxico para a maioria dos microrganismos. A presença de determinantes de resistência ao telurito (Te^R), em bactérias patogênicas, pode proporcionar vantagens seletivas no ambiente natural (SANTOS et al., 2015). Os genes Te^R também têm sido relacionados com a adesão em células epiteliais (PEI et al., 2013; SANTOS et al., 2015; YIN et al., 2009) e a susceptibilidade a agentes oxidantes (FRANKS et al., 2014). Recentemente, foi verificada uma correlação direta entre a presença do gene Te^R e a capacidade de *C. diphtheriae* aderir e sobreviver dentro dos compartimentos

intracitoplasmáticos de células epiteliais, bem como, de afetar a sobrevivência do nematódeo *C. elegans* (SANTOS et al., 2015).

1.2.4 Sobrevivência intracelular

Além da capacidade adesiva, que contribui para a manutenção e proliferação do microrganismo no ambiente e no hospedeiro, a habilidade de penetrar e sobreviver no compartimento intracelular de células humanas também justifica a permanência do patógeno nas vias aéreas e sua disseminação no hospedeiro, causando infecções invasivas (HIRATA JR et al., 2002). Até o momento, foi relatada a sobrevivência de *C. diphtheriae* em células humanas epiteliais respiratórias (BERTUCCINI; BALDASSARRI; von HUNOLSTEIN, 2004; HIRATA JR et al., 2002;), endoteliais (PEIXOTO et al., 2014) e de linhagem monocítica (SANTOS et al., 2010). A sobrevivência do bacilo diftérico em células fagocíticas, em particular, sugere a presença de determinantes gênicos de resistência a substâncias oxidantes e hidrolíticas produzidas por estas células. Contudo, até o momento pouco é conhecido sobre estas atividades.

1.2.5 Captação de ferro

Assim como a habilidade de colonizar e proliferar nas superfícies cutaneomucosas, a capacidade de captação de nutrientes vitais, como ferro, é uma etapa indispensável para o estabelecimento e progressão do processo infeccioso. Assim como outras bactérias patogênicas, além da produção de sideróforos, o bacilo diftérico modifica a expressão de fatores de virulência, como toxinas, enzimas e adesinas, quando submetidas a ambientes com baixas concentrações deste íon (MOREIRA et al., 2003).

1.3 Estresse bacteriano

O estresse bacteriano é definido como qualquer desvio nas condições ótimas de crescimento que resultam em uma redução na taxa de crescimento. Dentre condições estressantes, podemos citar a limitação de nutrientes essenciais, como o ferro, as mudanças na osmolaridade do ambiente externo, as variações de pH e temperatura e a presença de agentes oxidantes (HEDGE et al., 2008).

A capacidade de multiplicar ou de sobreviver sob uma ampla variedade de condições ambientais contribui para o potencial patogênico e a transmissão de microrganismos por diferentes rotas de infecção (KAZMIERCZAC et al., 2005). Na maioria dos casos, a resposta bacteriana leva à ativação transitória de genes cujos produtos respondem a um dado estresse físico-químico (ROHDE et al., 2007).

1.3.1 Estresse oxidativo

Dentre as condições de estresse mais comuns enfrentadas pelas bactérias encontra-se o estresse oxidativo. As bactérias desenvolveram métodos para prevenir o desequilíbrio redox, bem como minimizar suas consequências deletérias através da expressão de enzimas de detoxificação, antioxidantes e sistemas para reparar ou degradar proteínas danificadas e DNA. A regulação desses processos em resposta a mudanças redox requer estratégias de vigilância sofisticadas, variando de quelação de metais a sensoriamento direto de espécies reativas de oxigênio. O estresse que ameaça interromper a homeostase redox pode derivar de fontes endógenas (produzidas pela bactéria) ou fontes exógenas (produzidas pelo hospedeiro) (RENIERE, 2018).

A expressão basal de antioxidantes e sistemas de eliminação são necessários para a sobrevivência de microrganismos a estressores redox endógenos enquanto que a capacidade de induzir sistemas de detoxificação é essencial para combater fontes exógenas à medida que surgem. Genes codificadores de enzimas antioxidantes são induzidos a fim de protegerem os organismos contra as espécies reativas de oxigênio (ERO) (VERNEUIL et al., 2004). ERO é um termo utilizado para designar um grupo de compostos que inclui os radicais livres - átomos ou moléculas que apresentam elétrons desemparelhados, sendo altamente instáveis,

muito reativos e com meia-vida curta, como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e o radical hidroxil ($OH\cdot$) e alguns derivados do O_2 que não contém elétrons desemparelhados, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio singlete (1O_2) (HALLIWELL; CROSS, 1994; RENIERE, 2018).

As ERO são produzidas continuamente em organismos aeróbios como subproduto do metabolismo. Durante a respiração aeróbica, cerca de 95 % das moléculas de O_2 é reduzida à H_2O . Contudo, o restante sofre redução parcial em etapas monoelétrônicas, gerando sucessivamente, $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 e $OH\cdot$ (BOVERIS; CHANCE, 1973; MERKAMM; GUYONVARCH, 2001). Além da produção durante a respiração celular, as ERO são geradas em várias situações. Dentre elas, podemos citar a produção durante a resposta inflamatória, na presença de agentes químicos, como paraquate e menadiona, e de íons metálicos (RENIERE, 2018).

Durante a resposta inflamatória, as ERO são produzidas como mecanismo de defesa contra patógenos por macrófagos e outras células do sistema imune, juntamente com a produção de espécies reativas de nitrogênio (ERN) e de enzimas hidrolíticas. Esse *burst* oxidativo é um aspecto fundamental da resposta imune inata e os mecanismos adaptativos que permitem aos patógenos sobreviverem e se multiplicarem no interior de células fagocíticas representam um fator importante na disseminação e permanência do processo infeccioso (CRAIG; SLAUCH, 2009).

Além das células fagocíticas, as ERO são também produzidas em diversos tecidos pela ação da NADPH oxidase, embora, em quantidade inferior a um terço das produzidas por aqueles. Dentre outros tipos celulares produtores de ERO, estão incluídos os fibroblastos, células do endotélio, células da tireóide, células musculares e células cardíacas (GRIENDLING *et al.*, 2000). Nestas células, as ERO participam de cascatas de sinalização em importantes mecanismos fisiológicos, tais como: regulação do tônus vascular, controle da ventilação pulmonar, produção de eritropoetina, pressão sanguínea, produção de hormônios (DRÖGE, 2002). É importante ressaltar que a produção de ERO pode ter consequências deletérias ao organismo, já que podem ocasionar diversas alterações mutagênicas, frequentemente cancerígenas (SPLETTSTOESSER; SCHUFF-WERNER, 2002).

As ERO podem também ser originadas pela exposição dos microrganismos a íons metálicos, como Fe^{2+} ou Fe^{3+} , Cu^{2+} (ASAD; LEITÃO, 1991; ASAD *et al.*, 1998), Sn^{2+} (MATTOS *et al.*, 2000) e Co^{2+} (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999), que ao participarem da reação de Fenton e de reações similares conhecidas como *Fenton-like* levam à produção de ERO.

1.3.1.1 Danos moleculares causados pelas ERO

O estresse oxidativo pode resultar em danos a macromoléculas, dentre elas DNA, proteínas, carboidratos e lipídios, sendo potencialmente prejudicial tanto às células procarióticas quanto às eucarióticas. A morte ou injúria celular decorrente dos danos causados a estes diferentes alvos moleculares depende da natureza, do grau e do tempo de exposição ao agente oxidante (HALLIWELL; CROSS, 1994).

Todas as ERO podem levar aos danos citados acima, no entanto, algumas espécies são muito mais reativas. O $\text{OH}\cdot$, por exemplo, é muito mais reativo que o $\text{O}_2\cdot^-$ e que o H_2O_2 , causando lesões diretas no DNA, atacando muitos resíduos de aminoácidos, e iniciando a peroxidação de lipídios. O H_2O_2 , que é considerado um fraco oxidante, pode inativar algumas enzimas diretamente, por meio da oxidação de grupos tióis essenciais dos sítios ativos de cisteínas, mas não é capaz de causar lesões diretas ao DNA. Entretanto, o H_2O_2 pode atravessar facilmente a membrana plasmática e reagir com o ferro intracelular ligado ao DNA através da reação de Fenton, produzindo o $\text{OH}\cdot$. Da mesma forma, o $\text{O}_2\cdot^-$ é dito um fraco oxidante, reagindo e inativando algumas enzimas, como catalase, aconitase e glutathione peroxidase. Este ânion pode levar à geração de H_2O_2 , que por sua vez, poderá formar o $\text{OH}\cdot$. Além disso, o $\text{O}_2\cdot^-$ pode reagir com íons H^+ , formando o radical hidroxiperoxil ($\text{HO}_2\cdot$), muito mais reativo. Por fim, o $\text{O}_2\cdot^-$ pode aumentar a disponibilidade de Fe^{2+} intracelular para participar da reação de Fenton, uma vez que interage com enzimas que contêm este íon como grupo prostético (HALLIWELL; CROSS, 1994; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

1.3.1.2 Proteção contra as ERO

A prevenção e a correção de danos nas macromoléculas dos organismos aeróbios envolvem a expressão de sistemas de reparo e detoxicação (CALDERÓN *et al.*, 2006; STORZ; IMLAY, 1999). A primeira linha de defesa contra as ERO é provida pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), que catalisa a dismutação do $\text{O}_2\cdot^-$ em H_2O_2 , catalase e peroxidases, que convertem o H_2O_2 em H_2O e O_2 (REVEILLAUD *et al.*, 1991), além da glutathione peroxidase, responsável pela redução do H_2O_2 a H_2O (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

Todas estas enzimas são expressas de forma constitutiva pelas células, mas sob estresse oxidativo podem ter seus níveis aumentados em decorrência do aumento na transcrição dos genes responsáveis pelas suas codificações. Este aumento deriva da ativação de sistemas que regulam diversos genes envolvidos na resposta ao estresse oxidativo. Várias famílias de fatores de transcrição, que fazem parte dos chamados sistemas indutíveis, detectam diretamente alterações no ambiente e ajustam adequadamente a resposta bacteriana (ASAD et al., 1998; RENIERE, 2018). Eles incluem os sistemas SoxRS e OxyR. Além disso, as lesões causadas pelas ERO no DNA podem levar à ativação do sistema SOS.

Os sistemas acionados pelas ERO podem levar também a outras respostas celulares, tais como aumento da capacidade da célula reparar seu genoma (JANION, 2001), resistência a antibióticos (KOHANSKI et al., 2007), filamentação celular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999), controle da expressão de adesinas (SCHEMBRI; KLEMM, 2001), modificações na hidrofobicidade (HEDGE et al., 2008), indução da formação de biofilme (SHANKS et al., 2007), diminuição da produção de hemolisinas (HEDGE et al., 2008) e secreção de toxinas (MELSTROM et al., 2007).

1.3.1.2.1 Sistema SOS

O genoma de procariotos e eucariotos está continuamente sendo exposto a danos que podem levar à inibição da replicação do DNA feita pelas polimerases. Estes danos podem ser induzidos tanto por fatores endógenos, como subprodutos do metabolismo e problemas na recombinação, quanto por fatores exógenos, como radiação ultravioleta, compostos químicos ou oxidativos, antimicrobianos e agentes mutagênicos. No entanto, as células contêm inúmeras proteínas e sistemas de reparo que auxiliam a manter a estrutura correta do DNA. Dentre estes sistemas está o SOS, presente em várias espécies bacterianas, incluindo *Salmonella thyphimurium*, *Caulobacter crescentus*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Escherichia coli* (JANION, 2008; NEELEY et al., 2007; ZGUR-BERTOK, 2013).

O sistema SOS depende da existência de dois genes: *recA* e *lexA*. A proteína LexA é repressora de diversos genes, dentre os quais o próprio *lexA* e *recA*, permitindo a expressão dos mesmos a níveis basais. O aumento nos níveis intracelulares de DNA em fita simples constitui um sinal indutor que é reconhecido pela proteína RecA, fazendo com que esta se torne ativada e capaz de induzir a autoclivagem da proteína LexA. Consequentemente, há um

aumento dos níveis intracelulares de LexA, RecA e de outros produtos, cujos genes codificadores estavam reprimidos. Dentre estes produtos, há fatores envolvidos no reparo de lesões, na respiração celular, na filamentação bacteriana, na inibição da duplicação, na indução de profagos em bactérias lisogênicas, na mutagênese bacteriana, na transferência e na recombinação gênica, e na formação de biofilme. Assim, além de permitir o reparo das lesões, este sistema contribui para a diversidade genética, para adaptação ao estresse e para a virulência bacteriana (FRIEDBERG et al., 2006; ZGUR-BERTOK, 2013).

1.3.1.2.2 Sistema SoxRS

O Sistema SoxRS é formado por dois reguladores transcricionais, o SoxR e o SoxS. A indução deste sistema depende da oxidação ou nitrosilação dos grupamentos [2Fe-2S] da proteína SoxR. Vários compostos podem levar a esta ativação, dentre os quais estão os geradores de O_2^- , paraquate e menadiona, o H_2O_2 e doadores de óxido nítrico. Em *E. coli*, após a ativação, SoxR estimula a transcrição da proteína SoxS, que, por sua vez, modifica a expressão de vários genes, dentre eles: *sodA* (superóxido dismutase Mn-dependente), *nfo* (endonuclease IV), *zwf* (glicose-6-fosfato desidrogenase), *fpr* (ferredoxina/flavodoxina NADP⁺ redutase), *fumC* (fumarase C), *acnA* (aconitase), *fur* (repressor do transportador de íons ferro), *acrA* e *acrB* (bomba de efluxo multidrogas), entre outros. Desta forma, este sistema confere maior proteção contra os danos causados pelo estresse oxidativo, resistência a antibióticos, solventes orgânicos e metais pesados (FARR; KOGOMA, 1991; MANCHADO et al., 2000; ZHENG; STORZ, 2000; POMPOSIELLO; DEMPLE, 2001; VASIL'EVA et al., 2001).

1.3.1.2.3 Sistema OxyR

O OxyR é o mais conhecido fator transcricional que coordena a resposta bacteriana ao H_2O_2 , mas que também desempenha papel importante na resposta celular à depleção de tióis (ASLUND et al., 1999; ANTELMANN; HELMANN, 2011). Originalmente identificado em *E. coli* e *S. typhimurium* (FARR; KOGOMA, 1991), e desde então, tem sido encontrado

amplamente conservado em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, como por exemplo, *Klebsiella pneumoniae* (HENNEQUIN; FORESTIER, 2009), *Pseudomonas aeruginosa* (OCHSNER et al., 2000), *Corynebacterium glutamicum* (KIM; HOLMES, 2012; TERAMOTO et al., 2013) e *C. diphtheriae* (KIM; HOLMES, 2012).

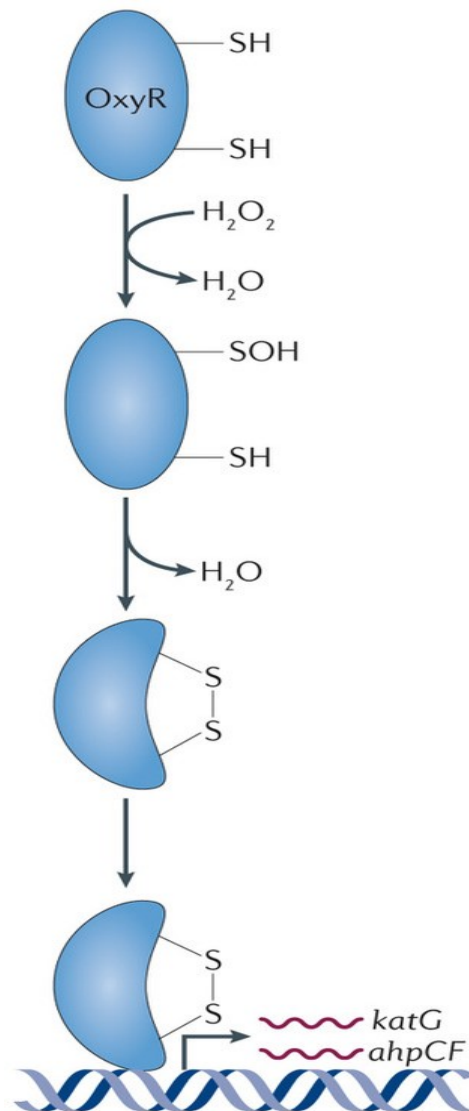
Dois modelos de mecanismos de ativação de OxyR são propostos na literatura. O modelo tradicional sugere que o H₂O₂ oxida dois resíduos conservados de cisteína, presentes em diferentes monômeros do OxyR, levando à formação de ligações dissulfeto intramoleculares entre estes, causando, assim, modificações nos domínios de interação com o DNA e com a RNA polimerase (Figura 3). O segundo modelo sugere que a oxidação em apenas um dos resíduos (C199) é suficiente para ativar o OxyR. Nesse caso, uma resposta regulatória mais específica é induzida (KIM; HOLMES, 2012). Em *E. coli*, evidências sugerem que os dois mecanismos ocorram e promovam respostas diferenciadas (DUBBS; MONGKOLSUKA, 2012).

O *regulon* OxyR de *E. coli* compreende genes envolvidos no (a): detoxificação do H₂O₂, como os genes de catalases e peroxidases (*katE*, *katG* e *ahpCF*); biossíntese de heme (*hemH*); manutenção do estado reduzido (*grxA*, *gorA*, *trxC*); reparo dos grupamentos de Fe-S (*sufA-E*, *sufS*); e na repressão do transporte de ferro (*fur*). Além disso, OxyR também regula positivamente o OxyS, um pequeno RNA regulador que integra a resposta ao peróxido, e negativamente a sua própria expressão (DUBBS; MONGKOLSUKA, 2012).

Em outras espécies bacterianas são observadas diferenças no mecanismo de ativação induzido pelo H₂O₂ e/ou no tipo de regulação gênica (HEO et al., 2010; IEVA et al., 2008; KIM; HOLMES, 2012; LEBLANC et al., 2008; TERAMOTO et al., 2013). Em *C. glutamicum* e *C. diphtheriae*, por exemplo, OxyR controla negativamente a expressão de catalase por um mecanismo não dependente de H₂O₂ (KIM; HOLMES, 2012; TERAMOTO et al., 2013). Em *Neisseria gonorrhoeae*, OxyR reprime a expressão de catalase na ausência de H₂O₂, mas induz a sua transcrição em níveis intracelulares aumentados deste agente (IEVA et al., 2008)

O envolvimento do OxyR na virulência bacteriana tem sido alvo de estudos nos últimos anos. Seu papel na formação de biofilme (SHANKS et al., 2007; HONMA et al., 2009), na produção de toxinas (MELSTROM et al., 2007) na resistência a antimicrobianos (SRINIVASAN et al., 2013) e na colonização e disseminação tecidual (JOHNSON et al., 2006) já foram estabelecidos. Em *Francisella tularensis*, a interrupção do gene *oxyR* levou à redução da virulência deste microrganismo (MA et al., 2016; RENIERE, 2018).

Figura 3 - Ativação do sistema OxyR



Legenda: Ativação do Sistema OxyR através da oxidação de dois resíduos de cisteína pelo H_2O_2 , formando uma ponte de sulfeto. A mudança conformacional do OxyR permite que ele funcione como regulador transcricional positivo para os genes de seu *regulon*, como gene *katG* (catalase) e *ahpCF* (alquilhidroperoxidoredutase).

Fonte: IMLAY. 2013.

1.3.1.3 Agentes oxidantes

1.3.1.3.1 Paraquate

O paraquate é um herbicida de contato não seletivo utilizado em mais de 100 países desde 1962. Sua denominação pela *International Union of Pure and Applied Chemistry* – IUPAC é 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridinil bicloreto. É também um composto amplamente utilizado em ensaios envolvendo estresse oxidativo. Seu mecanismo de ação é a geração de ERO em um ciclo repetitivo que culmina com o colapso dos sistemas antioxidantes: superóxido-dismutase, catalase, peroxidase, glutathione redutase. Ao ser internalizado, o paraquate é reduzido a um radical livre instável pela ação da NADPH, sendo posteriormente reoxidado na presença do oxigênio. Como consequência, há produção do O_2^- e a regeneração do paraquate (HALLIWELL; GUTTERRIDGE, 1999; PETER et al., 1992).

O colapso dos sistemas antioxidantes, leva à formação de 1O_2 pela dismutação não enzimática do O_2^- . Esse ataca as membranas celulares dando origem a radicais livres lipídicos que reagem com outros ácidos graxos insaturados e resultam em uma reação em cadeia chamada peroxidação lipídica. A resistência ao paraquate está diretamente relacionada à expressão de enzimas antioxidantes, como a superóxido desmutase, cujas transcrições são reguladas pelo sistema SoxRS (HALLIWELL; GUTTERRIDGE, 1999; PETER et al., 1992).

1.3.1.3.2 Ozônio

O ozônio é um potente agente oxidante que ocorre naturalmente na atmosfera em baixas concentrações (< 50 ppb), mas que pode atingir níveis tão altos quanto 200 - 300 ppb na poluição. Nesses níveis, o ozônio se torna um risco significativo à saúde associado à irritação respiratória. Em níveis ainda mais elevados, seu potencial de oxidação pode ser fatal, mas também serve como um agente de desinfecção útil com aplicações na indústria de alimentos (PASCUAL et al., 2007), manutenção da qualidade da água (GRAY et al., 2013) e na indústria de cuidados com a saúde (SHARMA; HUDSON, 2008). A eficácia do ozônio como agente desinfetante varia com base na concentração, tempo de exposição, presença de

materiais orgânicos e tipo de microrganismo exposto, com uma redução de até quatro log nas contagens de patógenos. Uma ampla variedade de patógenos reage de maneira diferente à desinfecção com ozônio, levantando a questão de que a sensibilidade ao ozônio seja em função das defesas microbianas específicas, como catalase, superóxido dismutase ou outros sistemas antioxidantes como OxyR (ONDARZA, 2017).

1.3.2 Estresse térmico

Ao longo dos anos, os microrganismos desenvolveram vários mecanismos para lidar com o estresse térmico e se adaptar às mudanças ambientais. Algumas bactérias respondem a rápida queda de temperatura (choque frio) pela indução transitória de proteínas induzidas pelo frio (Cip – *Cold Induced Protein*), e essa produção aumenta com a severidade do choque (GRAUMANN; MARAHIEL, 1996; HÉBRAUD; POTIER, 1999; PHADTARE, 2004).

Dentre as Cip, está a família de proteínas de choque frio (*Csp- Cold shock proteins*) (YAMANAKA et al., 1998). As Csp são pequenas proteínas ligadoras de ácido nucléico, variando de 65 a 75 aminoácidos (CZAPSKI; TRUN, 2014; GRAUMANN; MARAHIEL, 1996) e já foram encontradas em bactérias psicrófilas, mesófilas, termófilas e hipertermófilas (JIN et al., 2014; PHADTARE, 2004). Essas proteínas neutralizam alguns efeitos nocivos da redução de temperatura e, assim, ajudam as células a se adaptarem (PHADTARE, 2004).

Durante o choque frio, a fluidez da membrana celular e a atividade enzimática diminuem, e a eficiência da transcrição e da tradução é reduzida devido à estabilização das estruturas secundárias do ácido nucléico. Além disso, o dobramento das proteínas é ineficiente e a função ribossômica é dificultada. Acredita-se que as Csp neutralizem esses efeitos prejudiciais servindo como chaperonas de ácido nucléico impedindo a formação de estruturas secundárias no mRNA, em baixa temperatura, facilitando, assim, o início da tradução (KETO-TIMONEN, 2016; PHADTARE; SEVERINOV, 2010).

As Csp foram descritas originalmente em *E. coli* (família composta por nove proteínas: CspA – CspI) (GOLDSTEIN et al., 1990). Nesta espécie bacteriana o mRNA de CspA é capaz de detectar alterações de temperatura e adaptar-se a essas mudanças adotando diferentes estruturas funcionais. Giuliadori e colaboradores (2010) mostraram que em baixas temperaturas o mRNA para CspA de *E. coli* sofre uma mudança estrutural resultando em uma tradução mais eficiente, tornando-se, portanto, menos propenso à degradação do que a

estrutura encontrada a 37 ° C. No entanto, algumas Csp não são induzidas pelo frio, e parecem estar envolvidas em vários processos celulares para promover respostas normais de crescimento e adaptação ao estresse. Estudos têm demonstrado que as Csp contribuem para a tolerância ao estresse osmótico, oxidativo, limitação de nutrientes, pH e etanol, bem como para a invasão de células hospedeira, sugerindo que estas proteínas tenham um papel mais amplo na tolerância ao estresse das bactérias do que se supunha anteriormente (DERMAN et al., 2015; DURVAL et al., 2010; KETO-TIMONEM et al., 2016; LOEPFEB et al., 2010; MICHAUX et al., 2012; SCHÄRER et al., 2013; SCHMID et al., 2009; WANG et al., 2014). O sequenciamento total de *C. diphtheriae* revelou a presença de duas proteínas Csp (CspA e CspB) no seu genoma. Porém, pouco se sabe a respeito do funcionamento dessas proteínas nesta espécie e sua relação frente ao estresse oxidativo (TROST et al., 2012).

2 JUSTIFICATIVA

Infecções causadas por *C. diphtheriae* ainda representam um desafio médico global, sobretudo devido ao aumento significativo do percentual de indivíduos parcialmente imunes à toxina diftérica, em especial indivíduos adultos (DAMASCO et al., 2005; PIMENTA et al., 2006). Além disso, doenças invasivas causadas por cepas não-toxigênicas de *C. diphtheriae* em indivíduos imunocompetentes vêm sendo descritas em maior frequência e adicionam novos aspectos aos processos infecciosos causados pelo bacilo diftérico, caracterizando-o como um patógeno reemergente (BELMARES et al., 2007; MENON et al., 2010; MUTTAIYAH et al., 2011; ROMNEY et al., 2006; VIGUETTI et al., 2011; ZASADA et al., 2005).

C. diphtheriae é capaz de penetrar e sobreviver no compartimento intracelular de células respiratórias humanas HEp-2, o que pode favorecer a manutenção do patógeno nas vias aéreas, facilitando a permanência do estado de portador após antibioticoterapia, soroterapia e cura da difteria (HIRATA JR et al., 2002). Aliado a isso, o bacilo diftérico demonstra capacidade de permanecer viável no compartimento intracelular de macrófagos humanos (linhagem U-937), após fagocitose, independente de opsoninas e da produção da toxina (SANTOS et al., 2010). Mecanismos que permitam a sobrevivência e a multiplicação de patógenos no interior de células fagocíticas representam um fator importante na disseminação.

A capacidade de multiplicar ou de sobreviver sob uma ampla variedade de condições ambientais contribui para o potencial patogênico e a transmissão de microrganismos por diferentes rotas de infecção (KAZMIERCZAC et al., 2005). Na maioria dos casos, a resposta bacteriana leva à ativação transitória de genes cujos produtos respondem a um dado estresse físico-químico (ROHDE et al., 2007).

Diversos estudos demonstraram que a existência de múltiplos mecanismos de sobrevivência e disseminação de microrganismo no hospedeiro e no ambiente pode contribuir para os processos infecciosos. Dentre tais mecanismos, aqueles envolvidos na resposta a situações de estresse, como o oxidativo e o nitrosativo, ainda permanecem incompreendidos em *C. diphtheriae*. Dessa forma, a investigação de genes que regulam a adaptação às condições ambientais e a virulência desta espécie pode contribuir para a compreensão da patogênese das infecções por *C. diphtheriae* e a identificação de novos alvos terapêuticos.

3 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo geral investigar a influência do regulador transcricional OxyR na adaptação de *C. diphtheriae* a situações de estresse e o seu papel sobre atributos de virulência e patogenicidade deste microrganismo.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Prever a estrutura tridimensional da proteína CDCE8392_1399 (OxyR) de *C. diphtheriae*;
- b) Avaliar a contribuição de OxyR na resistência de *C. diphtheriae* a diferentes condições de estresse;
- c) Determinar o papel de OxyR na expressão de genes envolvidos na resposta ao estresse: catalase (*katA*), *cspA* (*cspA*);
- d) Avaliar qualitativa e quantitativamente a influência de OxyR na formação de biofilme em superfícies abióticas (vidro e poliestireno), e as alterações induzidas pela limitação de ferro;
- e) Verificar a influência de OxyR sobre a composição do biofilme formado por *C. diphtheriae*;
- f) Avaliar a influência de OxyR na capacidade de interação de *C. diphtheriae* com proteínas de matriz extracelular e plasmática;
- g) Analisar a importância de OxyR na sobrevivência de *C. diphtheriae* em células epiteliais respiratórias e células monocíticas;
- h) Investigar a importância de OxyR na produção de ERO e ERN pelas células humanas;
- i) Avaliar o efeito da interrupção do gene *oxyR* na colonização e morte do nematódeo *C. elegans* por *C. diphtheriae*;
- j) Avaliar a influência de OxyR no potencial artritogênico de *C. diphtheriae*, através de modelo *in vivo*, utilizando camundongos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Origem das cepas bacterianas e condições de cultivo

Foram selecionadas, para este estudo, as cepas de *C. diphtheriae* CDC-E8392, produtora de toxina diftérica e a mutante CDCE-8392::*oxyR* (LDCIC-L2) pertencentes à Bacterioteca do Laboratório de Difteria e Corinebactérias de Importância Clínica (LDCIC) da Disciplina de Microbiologia e Imunologia – FCM/UERJ, bem como a cepa LDCIC-L2/pXMJ19mCherry, que foi construída durante este projeto (Tabela 1). A cepa *Escherichia coli* OP50 foi utilizada como controle dos experimentos com o nematódeo *C.elegans*.

As cepas de *C. diphtheriae* foram cultivadas a 37 °C por 24-48 h, em *Trypticase Soy Broth* (TSB, *Difco Laboratories*, Detroit, MI – USA) ou *Trypticase Soy Agar* (TSA, *Difco Laboratories*, Detroit, MI – USA). Para as linhagens mutantes, os meios de cultura foram acrescidos do antibiótico canamicina (Sigma) a 25 µg/mL. Nos ensaios realizados com linhagem LDCIC-L2/pXMJ19mCherry, os meios foram acrescidos dos antibióticos canamicina (Sigma) a 25 µg/mL e cloranfenicol (Sigma) a 10 µg/mL, além de IPTG (isopropil-β-D-galactosídeo) a 1 mM para a indução da expressão da fluorescência vermelha do mCherry. A cepa de *E. coli* OP50 foi cultivada em Luria Bertani (LB, *Difco Laboratories*, Detroit, MI – USA) a 37 °C. O armazenamento da cepa selvagem de *C. diphtheriae* foi realizado em meio TSB acrescido de 20 % de glicerol à temperatura de -20 °C, e para o armazenamento das cepas mutantes, foi acrescentado ao meio canamicina na concentração final de 25 µg/mL.

As cepas de *C. diphtheriae* utilizadas neste trabalho foram, periodicamente, investigadas quanto à pureza e às características fenotípicas pelo sistema miniaturizado API®Coryne e pela técnica de espectrometria de massa MALDI-TOF (ALATOOM et al., 2012; FORMIGA, 1985; KONRAD et al., 2010; MATTOS GUARALDI; FORMIGA, 1998).

Tabela 1 - Características microbiológicas das cepas de *C. diphtheriae* utilizadas neste estudo

Cepa	Origem	Biovar/sac/tox	oxyR	Referência
CDC-8392	CDC / Difteria (Orofaringe)	mitis / -/+	+	-
LDCIC-L2	CDC-8392; pCR 2.1- TOPO'CDC-E8392-1399"	mitis / - / +	interrompido	SANTOS, 2015
LDCIC-L2 /pXMJ19mCherry	CDC-8392; pCR 2.1- TOPO'CDC-E8392-1399"	mitis / - / +	interrompido	Presente estudo

Legenda: CDC - *Centers for Disease Control and Prevention*; sac- fermentação de sacarose, tox, presença do gene tox; oxyR – presença do gene oxyR.

4.2 Construção da cepa de *C. diphtheriae* mutante LDCIC-L2 fluorescente

Para o experimento de microscopia de fluorescência, a cepa mutante *C. diphtheriae* LDCIC - L2 eletrocompetente foi transformada com o plasmídeo pXMJ19mCherry (OTT *et al.*, 2012), utilizando o eletroporador *Gene Pulser II* (Bio-Rad, Munique). A eletroporação foi realizada sob as seguintes condições: 2500 volts, capacitância de 25 μ F e resistência de 200 Ω (DORELLA *et al.*, 2006). As células eletroporadas foram adicionadas com 1 mL de TSB e incubadas a 37 °C por 4 h. O volume da cultura foi plaqueado em placas de TSA contendo os antibióticos canamicina e cloranfenicol, e mantidas a 37 °C por 48 h.

Para a realização dos ensaios, a cepa LDCIC - L2/pXMJ19mCherry foi cultivada em caldo TSB a 37 °C por 24 h, contendo canamicina (25 μ g/mL) e cloranfenicol (12,5 μ g/mL), além de IPTG 1 mM para a indução do plasmídeo e consequente expressão da proteína mCherry. Esta proteína emite fluorescência vermelha em comprimento de onda de 610 nm.

4.3 Análise da estrutura tridimensional e de domínios conservados da proteína OxyR por bioinformática

A estrutura tridimensional da proteína estudada foi modelada usando o servidor *online* I-TASSER. As sequências de aminoácidos da proteína codificada pelo gene *oxyR* foram submetidas em formato FASTA. Os resultados geraram cinco principais modelos, dentre os quais o modelo com a maior pontuação de confiança (*c-score*) foi selecionado como representante para este estudo (KELLEY et al., 2015).

A busca por domínios conservados foi realizada utilizando os bancos de dados Pfam (FINN et al., 2016) e NCBI (MARCHLER-BAUER et al., 2015). O servidor *Phyre²* foi usado para prever a estrutura tridimensional destes domínios (KELLEY; STEMBERG, 2009). Dois parâmetros foram considerados para selecionar o melhor modelo: confiança e cobertura. Em casos de confiança > 90 %, considerou-se que a proteína foi modelada com alta precisão.

4.4 Investigação do envolvimento de OxyR na resposta a agentes oxidantes e antimicrobianos

4.4.1 Ensaio de susceptibilidade a ERO

A fim de investigar o papel de OxyR na resposta a ERO, a cepa mutante foi testada em comparação à cepa selvagem quanto à sensibilidade a diferentes agentes oxidantes (Sigma-Aldrich Co.): H₂O₂ e paraquate (gerador de O₂⁻). Para isto, foram determinadas as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) dos agentes, segundo protocolo estabelecido pelo *Clinical e Laboratory Standards Institute* (CLSI) para agentes antimicrobianos (2017). Resumidamente, os microrganismos foram cultivados em meio TSB e suspensos na concentração equivalente a 10⁷ unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL) em solução salina fisiológica. Posteriormente, as suspensões bacterianas foram diluídas 1:1000 em meio *Muller Hinton Broth* (MHB) contendo agentes oxidantes em diferentes concentrações (0,015 mM à 20 mM). O crescimento bacteriano foi verificado após 24-48 h de incubação a 37 °C e considerado positivo quando observada turvação do meio de cultura.

Adicionalmente, a resposta das cepas aos agentes oxidantes foi verificada através da técnica de difusão em disco, utilizando discos de papel impregnados com as agentes nas seguintes concentrações: H₂O₂ (40 mM, 20 mM e 1 M) e Paraquate (1 M).

4.4.2 Ensaio de susceptibilidade a antimicrobianos

A influência do gene *oxyR* na susceptibilidade de *C. diphtheriae* a diversos agentes antimicrobianos disponíveis comercialmente (Oxoid, Hampshire, *United Kingdom*), também foi investigada através da técnica de difusão em disco (MARTINEZ-MARTINEZ et al, 1995; PEREIRA et al, 2008).

Os seguintes antimicrobianos foram utilizados (Oxoid): penicilina (10 µg), eritromicina (15 µg), ampicilina (10 µg), gentamicina (10 µg), cefotaxima (30 µg), imipenen (10 µg), ciprofloxacina (5 µg), clindamicina (2 µg), rifampicina (30 µg), tetraciclina (30µg), linezolida (30 µg) e vancomicina (5 µg). Os pontos de corte para cepas sensíveis foram utilizados como sugerido pelo CLSI (2017) para *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*.

4.4.3 Ensaio de susceptibilidade ao gás de ozônio

As bactérias foram cultivadas em TSA a 37 °C por 48 h e a concentração da suspensão ajustada para DO 0,2 em 580 nm. As suspensões foram expostas a 40 mg/mL de ozônio, gerado pelo aparelho Ozon Life – 33 versão 3.0 (MS). Os tempos de exposição variaram de 1 a 3 minutos. Antes e imediatamente após o tratamento, as suspensões foram diluídas em salina e plaqueadas em TSA para determinação das UFC/mL.

4.5 Avaliação da expressão gênica

A expressão de transcritos dos genes *cat*, *cspA* e *tox*, que codificam as proteínas catalase, proteína do choque frio e a TD, respectivamente, foi avaliada através da técnica de RT-qPCR (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction quantitative PCR*), usando o método de quantificação relativa. Esse método permite quantificar diferenças nos níveis de expressão de um gene alvo entre diferentes amostras usando uma amostra calibradora e um controle endógeno para normalizar a reação.

4.5.1 Confecção dos oligonucleotídeos iniciadores

O desenho de oligonucleotídeos iniciadores foi baseado nas sequências de DNA do gene *dtxR*, utilizado como normalizador da reação de RT-qPCR, e dos genes alvo: *cat*, *cspA* e *tox*. Para a construção foi utilizado o *software online Primer BLAST*. Foram consideradas satisfatórias temperaturas de anelamento em torno de 60 °C, tamanho variável entre 90 pb e 120 pb, conteúdo GC maior que 50%, bem como baixas probabilidades de formação de grampos, homodímeros e heterodímeros, estruturas que podem prejudicar a eficiência de amplificação durante as reações de PCR quantitativo.

4.5.2 Extração e tratamento do RNA bacteriano

As cepas de *C. diphtheriae* foram cultivadas em 6 mL de meio TSB, *overnight*. Para os ensaios de expressão de *cspA*, duas alíquotas de 3 mL, retiradas a partir do mesmo tubo, foram submetidas à incubação a 4 °C e 37 °C, por 2 h. O RNA bacteriano foi extraído através de uma adaptação da técnica do fenol ácido-clorofórmio proposta por Atshan e colaboradores (2012). As suspensões foram centrifugadas a 12000 g, por 10 minutos a 37 °C. Nos ensaios de expressão de *cspA*, as suspensões foram centrifugadas a 4 °C ou a 37 °C. O sedimento foi resuspenso em 150 µL de água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) e agitado em vortex por 3 minutos. Em seguida, foram adicionados 75 µL de clorofórmio saturado em água DEPC

e 75 µL de fenol ácido (*Phenol solution* – P4682 Sigma-Aldrich, Brasil), seguido de agitação por 1 minuto. Os tubos foram submetidos à incubação a 70 °C, por 30 minutos, com agitações periódicas a cada 5 minutos. As fases foram separadas por centrifugação a 12000 g, por 10 minutos e aproximadamente 150 µL da fase aquosa foram transferidos para um novo tubo de reação. Em seguida, foram acrescentados aos tubos 300 µL de álcool isopropílico seguidos de agitação por 3 minutos e centrifugação a 12000 g, por 10 minutos. O precipitado foi lavado três vezes com etanol a 70 %, preparado em água DEPC. Após a última lavagem, os tubos contendo RNA foram invertidos por 3 minutos para secagem das gotículas e o material foi suspenso em 25 µL de água contendo DEPC. Para a remoção do DNA residual, o RNA extraído foi submetido ao tratamento com a enzima DNase I, utilizando o kit da *turbo-DNase* (*turbo-DNA free*™, Ambion), de acordo com as instruções do fabricante. As quantidades de RNA total obtidas foram avaliadas em equipamento *Nanovue* (GE Healthcare), e armazenadas em freezer -80 °C até sua utilização (adaptado de ATSHAN et al., 2012).

4.5.3 Síntese do DNA complementar (cDNA)

As amostras de RNA total extraídas foram submetidas à reação de transcrição reversa com o uso do kit SuperScript® IV *First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen) de acordo com as especificações do fabricante. O anelamento ao RNA molde foi realizado através da combinação de 1,0 µL de oligonucleotídeos de seqüências aleatórias (50 µM), 1,0 µL de dNTP mix (10 mM cada) e do volume necessário de RNA molde - na concentração de 1000 ng - para completar 11 µL de reação. Os tubos de reação foram incubados à 65° C por 5 minutos seguido de incubação em gelo por 1 minuto. A mistura de reação, contendo a transcriptase reversa (RT), foi obtida pela adição de 4 µL de tampão 5X SSIV, 1 µL de DTT (100 nM), 1,0 µL de RNaseOUT™ *Recombinant RNase Inhibitor* e 1,0 µL de SuperScript IV *Reverse Transcriptase* (SRT-IV – 200U/ µL). Esta mistura foi adicionada ao RNA anelado, para um volume final de reação de 20 µL. Após incubações a 23 ° C por 10 minutos, 50 °C por 10 minutos e 80 °C por 10 minutos, o RNA residual foi removido pela adição de 1,0 µL de RNase H de *E. coli* e incubação por 20 minutos a 37 °C. Tubos contendo *pool* de RNA extraído, na presença e ausência de SRT-IV, foram utilizados na determinação da eficiência dos iniciadores e no controle da ausência de DNA genômico, respectivamente. As amostras contendo o cDNA gerado foram mantidas em freezer – 20 °C até sua utilização.

4.5.4 PCR quantitativo (qPCR)

As amostras de cDNA, foram submetidas à amplificação por qPCR, com o uso dos pares de iniciadores listados na Tabela 2. O monitoramento das amplificações foi realizado com base na fluorescência verde, resultante da excitação do intercalante de DNA fita-dupla SYBR® *Green I*, utilizando o kit GoTaq® qPCR Master Mix (Promega), e a amplificação em tempo real foi conduzida em termociclador 7500 *Real-Time PCR* (ABI 7500 *System*, *Applied Biosystem*).

Tabela 2 - Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de amplificação

Iniciadores	Sequência (5'→3')	T _m	GC%	Produto (pb)
<i>katA F</i>	CAAGACGGCAACTACGACAT	58,80	50,00	94
<i>katA R</i>	GCTTTTGGGAGTGGATGAAG	59,67	50,00	
<i>cspA F</i>	GGTTTCGGCTTCATCGCTC	59,28	57,89	97
<i>cspA R</i>	GGTTCTCTTCGAGGGTACG	56,99	57,89	
<i>dtxR F</i>	TAGCCAAACCGTTGCCATA	59,67	50,00	109
<i>dtxR R</i>	ACGCATAACTGCAGTCGCTA	59,83	50,00	

Legenda: *dtxR* (F e R) - oligonucleotídeos utilizados para amplificação do gene normalizador da reação (*dtxR*); *katA* (F e R), *cspA* (F e R): oligonucleotídeos utilizados para a amplificação do genes alvo *cat* e *cspA*, respectivamente.

Fonte: A AUTORA.

4.5.4.1 Determinação da eficiência dos iniciadores

A eficiência da amplificação foi avaliada a partir de cinco diluições seriadas de cDNA (1:25; 1:50; 1:100; 1:200; 1:400), em triplicata. Para tal, utilizou-se um *pool* com os cDNA das cepas analisadas. A partir dos *cycle threshold* (Cts) obtidos foi possível gerar a curva padrão de cada par de iniciadores testados bem como a eficiência de amplificação dos mesmos. O valor da eficiência (E) foi estimado com o auxílio da qPCR *efficiency calculator* Thermo Scientific (*Life Science Research*) que utiliza a equação $E = 10^{-1/slope}$ (RASMUSSEN, 2001), onde o *slope* corresponde à inclinação da reta obtida da regressão entre os valores de Ct dos transcritos e os valores do logaritmo das diferentes diluições de cDNA. A faixa de valores de eficiência recomendada para a validação dos ensaios de qPCR e estimativa dos níveis transcricionais pelo emprego do método de Ct comparativo é de 0,9 a 1,1, o que corresponde a uma eficiência da reação entre 90 - 110 % (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001; RASMUSSEN, 2001).

4.5.4.2 Reações para quantificação relativa e análise de expressão diferencial dos genes analisados

O cDNA foi submetido a reações, em triplicata, de qPCR correspondentes a cada par de iniciador utilizado. Os ensaios foram realizados em placas 96 poços. As reações foram preparadas utilizando 0,6 μ L de cada iniciador (400 nM), 7,5 μ L de Go Taq qPCR Master Mix e o volume final ajustado para 11 μ L com água livre de nucleases. Após a distribuição do mix em cada poço foram acrescentado 4 μ L da amostra do cDNA diluída a 1:50. A placa foi vedada, centrifugada a 2.500 xg por 1 minuto a 4 °C e incubadas no termociclador 7500 *Real-Time* PCR, seguindo as condições de reação: 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos e 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos (desnaturação) e 60 °C por 1 minuto (extensão). Seguiu-se a etapa da curva de dissociação (*melting curve*) de acordo com o protocolo padrão do equipamento: 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 1 minuto, 95 °C por 30 segundos e 60 °C por 15 segundos.

As curvas de amplificação (ΔRn versus Ciclo), plotadas em tempo real pelo *software* v2.0.1. (Applied Biosystems TM) durante o processamento das reações no termociclador

7500 *Real-Time PCR System*, foram utilizadas como parâmetros para a definição do limiar (*threshold*) de detecção dos produtos amplificados. O *threshold* foi configurado para cruzar a fase exponencial logarítmica das curvas de amplificação, etapa em que a fluorescência detectada é resultado do acúmulo de produtos amplificados, acima dos níveis de fluorescência de fundo. Os resultados brutos obtidos foram expressos em valores de Ct, os quais refletem o número de ciclos de amplificação necessários para que o sinal fluorescente emitido atinja o limiar de detecção. Da média dos Cts obtidos para o gene - alvo relativa à cepa selvagem, foi subtraída a média calculada para os Cts do gene *dtxR*, referente à mesma condição de tratamento. O valor gerado, denominado ΔCt , representa a normalização das amplificações do gene - alvo em relação às amplificações do gene de controle endógeno selecionado. A diferença entre o valor de ΔCt para a cepa mutante e o valor de ΔCt para a condição controle (chamada $\Delta\Delta Ct$) foi calculada e utilizada para a determinação da potência $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Este valor representa o quanto a transcrição do gene de interesse foi alterada pela interrupção do gene *oxyR*.

4.5.5 Determinação da ausência de DNA genômico

Para determinação da ausência de DNA genômico nas amostras de cDNA, reações foram realizadas utilizando o *pool* controle sem a presença de SRT-IV, conforme descrito anteriormente. A confirmação da ausência do DNA foi estabelecida pela ausência de ciclos de amplificação nos poços da microplaca correspondentes.

4.5.6 Determinação da curva de dissociação

O termociclador foi configurado para elevar, após as etapas de amplificação de cDNA, a temperatura das amostras até 95 °C. Durante este processo, as variações na emissão de fluorescência, em decorrência da liberação de *Sybr Green I* das cadeias duplas de DNA amplificado, foram detectadas e analisadas pelo *software* SDS v2.0.1 (*Applied Biosystems* TM). Os dados gerados permitiram avaliar a temperatura média de desnaturação das

moléculas de DNA (T_m), parâmetro utilizado para a constatação da presença de fragmentos específicos.

4.6 Análise da influência de OxyR na formação de biofilme em superfícies abióticas

4.6.1 Avaliação da formação de biofilme em superfície de vidro

Com o objetivo de avaliar a influência de OxyR na capacidade das cepas de *C. diphtheriae* aderir ao vidro, a formação do biofilme foi avaliada através da deposição de uma camada bacteriana na face interna de um tubo de ensaio estéril, novo e com dimensões aproximadas de 13 x 100 mm (MATTOS-GUARALDI; FORMIGA, 1991). Para essa finalidade, suspensões bacterianas foram inoculadas em 4 mL de caldo TSB até a DO 0.2 em 580 nm, e incubadas por 48 h a 37 °C, sem agitação e em condições de aerobiose. Após este período, o meio de cultura foi removido e, cuidadosamente, foram adicionados mais 4 mL de TSB aos tubos, voltando a incubá-los por 48 h à 37 °C. A troca do meio de cultivo foi realizada três vezes. O biofilme formado foi corado com cristal violeta a 2 % por 5 minutos e os tubos foram lavados, sucessivamente, com água destilada. As cepas de *C. diphtheriae* 241 e CDCE-8392 foram utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente, conforme descrito por Gomes e colaboradores (2009). Após secagem, foram avaliados quanto à formação do biofilme seguindo os padrões de aderência bacteriana em vidro definidos por Mattos-Guaraldi e Formiga (1991): I – presença de microrganismos aderidos nas laterais dos tubos de vidro, incluindo a formação de anel na interface entre o meio de cultura e o ar; II – presença de microrganismos aderidos somente nas laterais dos tubos de vidro; III – presença de microrganismos formando anel na interface do meio de cultura com o ar; IV – ausência de microrganismos aderidos (GOMES *et al.*, 2009; MATTOS-GUARALDI; FORMIGA, 1991).

4.6.2 Avaliação da formação de biofilme em superfície de poliestireno

A capacidade das cepas selvagem e mutante de *C. diphtheriae* aderir ao substrato de poliestireno, formando biofilme, foi avaliada pelo método semiquantitativo, modificado por Gomes e colaboradores (2009), utilizando como controle negativo meio TSB estéril. Após incubação das suspensões bacterianas em meio TSB, a 37 °C por 24 h, em condições de aerobiose, a densidade óptica (DO) foi ajustada para 0.2 em 580 nm e alíquotas de 200 µl foram transferidas para microplaca de poliestireno (Kasvi), de 96 poços, fundo reto, e incubadas a 37 °C por 48 h. Em seguida, os poços foram lavados, três vezes, com PBS estéril 0,01 M; pH 7,2. Para fixação das bactérias aderidas ao poliestireno, 200 µL de metanol PA (ProQuimios) foi adicionado a cada poço com incubação de 15 minutos. Após esse período, o metanol foi retirado e a placa deixada em temperatura ambiente para secagem. Para revelação do biofilme formado, alíquotas de 200 µL do corante cristal violeta a 2 % foram adicionadas a cada poço e, após 5 minutos, a placa foi lavada, exaustivamente, com água destilada estéril. Para eluição do corante, 160 µL de ácido acético a 33 % foram adicionados aos poços. A absorbância (DO) de cada poço foi aferida, em comprimento de onda de 570 nm, em leitor de placas (BioRad, modelo 550). O *cut-off* foi determinado pela densidade óptica do controle negativo (DOc). Quanto aos valores de absorbância obtidos, as cepas foram classificadas como: (i) não-aderentes quando $0 < DO \leq DOc$, (ii) fracamente aderentes quando $DOc < DO \leq 2xDOc$, (iii) moderadamente aderentes quando $2xDOc < DO \leq 4xDOc$ e (iv) fortemente aderentes quando $DO > 4xDOc$ (GOMES et al., 2009; 2013 STEPANOVIC, 2000;).

4.6.3 Avaliação da formação de biofilme em poliestireno sob condições limitantes de ferro

Com objetivo de avaliar a influência de íons ferro na capacidade das cepas mutante e selvagem de *C. diphtheriae*, de formar biofilme em poliestireno, o procedimento foi realizado como descrito no item 4.6.2, porém, foi utilizado TSB acrescido do quelante de ferro 2,2'-dipiridil (Sigma) na concentração de 0,5 mM. Ao final do experimento, os tubos foram avaliados quanto a intensidade da formação do biofilme através da medição da absorbância em comprimento de onda de 570 nm, em leitor de placas (BioRad, modelo 550) (GOMES et al., 2009; MATTOS-GUARALDI; FORMIGA, 1991; MOREIRA et al., 2003).

4.6.4 Análise da composição do biofilme formado sobre superfícies de poliestireno através de colorações específicas

O biofilme foi formado sobre lamínulas de vidro em placa de 24 poços, em caldo TSB a 37 °C/ 48 h. Após incubação, a lamínula foi lavada duas vezes com 500 µl de PBS. O biofilme foi fixado com 500 µl de metanol por 5 minutos, corado com *Coomassie Blue* 0,02% por 15 minutos, seguido da coloração com safranina 0,1 % por 5 minutos. Após lavagem com PBS as lamínulas foram montadas sobre lâmina com Entellan™ (Merck). As lamínulas foram observadas pelo microscópio Axioplan2 (Zeiss Oberkochen, Ge) adaptado da metodologia descrita por Stepanovic (2007).

4.7 **Análise do envolvimento de OxyR na interação de *C. diphtheriae* com proteínas plasmáticas e de matriz extracelular de origem humana**

Placas de microtitulação de 96 poços (Corning, NY, USA) foram utilizadas nos testes de ligação bacteriana usando Fibrinogênio (Fbg), Fibronectina (Fn) e colágeno Tipo I biotinizados (Sigma Chemical Co). As culturas bacterianas crescidas em caldo TSB por 24 h a 37 °C foram lavadas 2x com tampão salina fosfato (PBS), e ressuspensas em 0,1 M NaHCO₃, pH 9,6 a uma suspensão de 3x10⁹ UFC/mL. Os poços foram sensibilizados com 100 µL de suspensão bacteriana por 1 h a 37 °C, e por uma noite a 8 °C. Uma curva padrão foi construída utilizando a diluição de soluções de proteínas biotinizadas em concentrações variando de 1 a 0,01 µg (1 h/37 °C). Após bloqueio com 2 % de soro albumina bovina (BSA tipo V, Sigma) em PBS acrescida com 0,05 % Tween-20 (PBST) por 1 h a 37 °C, os poços foram lavados 3x com PBST. As cepas bacterianas reagiram com 20 µg/mL de proteínas biotinizadas de ECM/plasma por 1 h a 37 °C. Depois de lavagem por 3x com PBST, Estreptavidina-Peroxidase (Sigma) 0,001 µg/mL preparada em PBST 1% BSA foi adicionada aos poços por 30 minutos a 37 °C. Após nova lavagem com PBST (3x), a reação foi verificada pela adição de 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB, Sigma) por 20 minutos e a reação bloqueada com 50 µL de HCl 1 M. A leitura da reação foi realizada a $\lambda = 450$ nm em leitor de placa de microtitulação e a intensidade da cor dos poços sensibilizados com os microrganismos comparada à curva padrão pelo GraphPad Prism versão 6.0. Os resultados foram expressos

em microrganismos aderidos às proteínas, com uma média \pm desvio padrão (SD) de três ensaios independentes realizados em triplicata. As médias das propriedades de ligação foram comparadas pelo teste *t* e Anova (SABBADINI et al., 2010, SIMPSON-LOURÊDO et al., 2014).

4.8 Investigação da participação de OxyR nos processos de interação com células humanas epiteliais respiratórias A549 e HEp-2 e macrófagos humanos U937

4.8.1 Preparo das linhagens celulares

As linhagens celulares utilizadas neste trabalho fazem parte da coleção de células da Disciplina de Microbiologia e Imunologia (DIMI-FCM/UERJ) da UERJ. A linhagem celular A549, originada de carcinoma de pulmão humano, foi cultivada em meio F-12 (Sigma – Aldrich Co.) suplementado com antimicrobianos com gentamicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), anfotericina B (2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), L-glutamina (0,5 % p/v) e 10 % de SFB. A linhagem celular HEp-2 (ATCC CCL23), originadas de carcinoma de laringe, foram cultivadas em Mínimo Essencial MEMTM (*Eagle's Minimal Essential Medium* - Invitrogen, Brasil) suplementado com gentamicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), anfotericina B (2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), L-glutamina (0,5 % p/v) e 5 % de soro fetal bovino (SFB) (Invitrogen, Brasil). Os macrófagos de linhagem *human macrophage - like* ATCC U-937 foram mantidos em Dulbecco *Modified* Essencial Médium (Sigma) contendo 100 UI/mL de penicilina e 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamicina e 10 % soro fetal bovino inativado (DMEM completo 10 % BFS). As células U-937 foram semeadas em microplacas de cultura de células na concentração de 5×10^5 células por poço em DMEM completo 10 % BFS (*Bovine Fetal Serum*, Gibco) adicionado de 250 ng/mL de PMA (*Phorbol Myristate Acetate*; Sigma) para induzir diferenciação e aderência. Após 48h, o meio de cultura contendo células não aderentes foi descartado e as células U-937 aderidas foram incubadas por 24 h em DMEM completo 10 % BFS sem PMA. Para a realização dos experimentos, os cultivos celulares foram realizados em placas de 96 poços contendo para a formação de monocamadas confluentes. As células foram mantidas a 37 °C em atmosfera de 5 % CO₂ (SANTOS et al., 2010).

4.8.2 Ensaio quantitativo de aderência e invasão bacteriana

As bactérias foram cultivadas em TSB, *overnight*, sob agitação, lavadas três vezes com tampão fosfato - salina (PBS - 0,01 M; pH 7,4), e suspensas nos respectivos meios de cultura de células. As monocamadas das linhagens celulares A549 e HEp - 2 foram infectadas, respectivamente, com 10^7 e 10^6 UFC/mL para obtenção de MOI (*Multiplicity of infection*) 100 e MOI 10, respectivamente. Após 3 h de incubação a 37 °C, alíquotas do sobrenadante foram diluídas e plaqueadas em TSA. Seguiram-se três lavagens com PBS e tratamento com 0,1 % Triton X-100 em PBS para lise celular. Alíquotas de diluições do lisado celular foram plaqueadas em TSA, para a determinação de bactérias viáveis associadas à monocamada. Para determinar o número de bactérias intracelulares, as células foram tratadas, por 1 h, com solução de gentamicina a 150 µg/mL, lavadas 6 vezes com PBS e lisadas, para diluição e plaqueamento em TSA. As culturas bacterianas foram incubadas a 37 °C, por 24-48 h, para determinação do número de Unidades Formadoras de Colônias por mL (UFC/mL) (adaptado de HIRATA Jr et al., 2002).

4.8.3 Determinação do padrão de aderência

O padrão de aderência foi analisado em células HEp - 2 e A549. Para tal, as células foram crescidas em lamínula de vidro circular de 13 mm de diâmetro. Após 3 h pós-infecção, as lamínulas foram coradas com Giemsa e analisadas em microscopia de campo claro e as cepas foram classificadas nos seguintes padrões: aderência localizada (AL) caracterizada pela formação de pequenos grupos que lembram microcolônias; aderência difusa (DA), caracterizadas por bactérias distribuídas randomicamente na superfície das células ou aderência agregativa (AA) caracterizadas por grumos de bactérias com aparência de “tijolos empilhados”. As cepas de *C. diphtheriae* 241 e HC01 foram utilizadas como controle dos padrões AL e AA (HIRATA JR, et al, 2004).

4.9 Detecção e quantificação da produção de ERO e ERN pelas células eucarióticas humanas

A produção de ERO e ERN pelas células humanas foi realizada como descrito previamente por Cunha e colaboradores (2015) com a utilização das sondas (Sigma – Aldrich Co.): HPF – hidroxifenilfluoresceína para OONO-, DAF-FM DA: 4-Amino-5-Metilamino - 2',7'- difluorofluoresceinadiacetato para NO, e CM-H2DCFDA (5-(e-6)-chlorometill-2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato, acetilester) para ERO. Placas de 96 poços com monocamadas confluentes de células A549 e HEp-2 foram incubadas por 1 h em solução de Hanks, sem vermelho de fenol e tratadas com as respectivas sondas a 5 µM, por 1h a 37 °C em atmosfera de 5 % CO₂. Posteriormente, foram infectadas com suspensões bacterianas (MOI 100), cultivadas em TSB a 37 °C, *overnight*. Aos poços controle foram adicionados os respectivos meios de cultura de células. Após 30 minutos, 1 h, 2 h, 3 h 4 h, 5 h e 6 h de incubação com as suspensões bacterianas a 37 °C em atmosfera de 5 % de CO₂, a fluorescência emitida por cada sonda foi quantificada no equipamento GloMax (Promega) (CUNHA et al., 2015).

4.10 Avaliação da participação de OxyR na infecção do nematódeo *C. elegans* por *C. diphtheriae*

4.10.1 Ensaio de morte e colonização de *C. elegans* por *C. diphtheriae*

Os nematódeos foram mantidos em placas contendo meio de crescimento para nematódeos (NGM) por aproximadamente 4 dias a 20 °C, utilizando a cepa *E. coli* OP50 como fonte de alimento. Para os ensaios de infecção, 20 µL de suspensão bacteriana (1 x 10⁹ UFC) a partir de uma cultura de 24 h em TSB foram semeados em placas de NGM contendo 12,5 µg/mL ácido nalidíxico (AN), que foram incubados a 37 °C / 48 h. Após o crescimento bacteriano, 20 vermes em estágio larval L4 foram transferidos para placas contendo as cepas teste, que foram observadas diariamente durante 5 dias, contando-se os vermes mortos/vivos/desaparecidos. Para cada cepa, foram realizadas ao menos 3 placas. Os números

de vermes mortos ou desaparecidos foram utilizados nas análises estatísticas (OTT et al., 2012). Paralelamente, alterações fisiológicas (indução de *worm bagging*) e/ou morfológicas foram avaliadas nos vermes adultos e larvas.

Adicionalmente, a cepa LDCIC-L2 contendo plasmídeo PXMJ19*mCherry* e induzidas com promotor de expressão IPTG foram semeadas em placas de NGM com AN para ensaios de infecção por microscopia de fluorescência em microscópio Axioplan 2 (Zeiss Oberkochen, Ge). Os nematódeos foram colocados em placa com o crescimento bacteriano. Após 24 h, os vermes foram transferidos para placa com OP50 por mais 24 h para permitir a limpeza de intestino, de *debris* celulares e do excesso de bactérias aderidas externamente. Os vermes foram então selecionados, montados em uma lâmina de vidro coberta por uma película de gel de agarose e uma gota de azida sódica (20 mM) para promover sua paralisia, recobertos com lamínula de vidro e observados em microscópio de fluorescência (OTT et al., 2012).

4.10.2 Ensaio da formação de *star* por *C. elegans* induzido por *C.diphtheriae*

Para investigar a formação de *star*, os nematódeos foram expostos às células bacterianas em tampão M9 conforme Hodgkin e colaboradores (2000). Resumidamente, os vermes adultos foram lavados 3 vezes em tampão M9 e alíquotas de 100 µL foram adicionados a 500 µL do mesmo tampão, em cada poço da microplaca de 24 poços. Alíquotas de 50 µL, 100µL, 150 µL e 200 µL das cepas bacterianas, cultivadas em 20 mL de TSB *overnight* foram adicionados em cada poço. A formação de *star* foi observada, inicialmente, após 48h de incubação a 20°C em lupa estereoscópica (Nikon SMZ 1500).

4.11 **Análise da influência de OxyR no potencial artritogênico de *C. diphtheriae* em camundongos**

4.11.1 Infecção dos camundongos

Foram utilizados neste ensaio camundongos convencionais da espécie Swiss Webster (SW), fêmeas, com 18 a 22 g, cedidos pela CECAL-FIOCRUZ (Rio de Janeiro, Brasil). O

estudo foi realizado em conformidade com as normas descritas nos Princípios Internacionais de Orientação para Pesquisa Biomédica Envolvendo Animais, conforme emitido pelo Conselho de Organizações Internacionais de Ciências Médicas e com as Diretrizes éticas do governo brasileiro para pesquisas envolvendo animais (Comitê de ética para experimentação animal IBRAG – CEUA/029/2015).

A possibilidade de desenvolver osteomielite foi analisada por métodos descritos anteriormente por Dias e colaboradores (2011) e adaptado por Stavracakis - Peixoto e colaboradores (2014). Camundongos foram infectados, com a cepa CDCE-8392 e pela cepa mutante LDCIC-L2, por via intravenosa através de uma veia caudal com 0,2 mL de suspensão bacteriana preparada em solução salina em turvação equivalente à DO 0.2 em 570 nm. Os camundongos controle receberam somente 0,2 mL de solução salina fisiológica estéril. Os experimentos foram realizados em triplicata e os camundongos foram examinados diariamente por 30 dias por observadores independentes para avaliar, macroscopicamente, a presença de inflamação das articulações e ulcerações. O número de articulações envolvidas, incidência e duração da artrite, ocorrência de anquiloses e destruição óssea foram observadas. A artrite foi definida como um eritema visível e/ou inchaço, de pelo menos uma articulação (DIAS et al., 2011; STAVRACAKIS-PEIXOTO et al., 2014).

4.11.2 Análises Histopatológicas

Os procedimentos histopatológicos para melhor avaliar as características do processo infeccioso foram baseados em métodos descritos por Dias e colaboradores (2011). Resumidamente, os camundongos foram inoculados por via intravenosa com as cepas selvagem e mutante de *C. diphtheriae* ou salina estéril como controle, sendo eutanasiados após 30 dias. O membro inferior foi removido assepticamente, fixado em 10 % v/v de formalina durante 24 h e, em seguida, descalcificadas usando etilenodiamina tetra-acético (EDTA) 10 % em PBS (0,1 M, pH 7,2), durante 7 dias. Posteriormente, os espécimes foram desidratados, embebidos em parafina, seccionados a 3-5 micrometros de espessura e corados com hematoxilina e eosina. As juntas foram examinadas quanto a presença de sinovite (definida como a espessura da membrana sinovial (região íntima) de mais de quatro camadas de células, a extensão do infiltrado (presença de células inflamatórias na região subíntima ou tecido perivascular), exsudado (presença de células inflamatórias na cavidade articular),

alterações na cartilagem articular e epifisária e alterações ósseas (DIAS et al., 2011; KRENN et al., 2006; MATSUKURA, et al., 2015; STAVRACAKIS-PEIXOTO et al., 2014). As imagens histológicas foram obtidas no microscópio de luz acoplado a uma câmera CCD- (Olympus-BX-53 com câmera Olympus DP72, Nagao, Chubu, Japan) na objetiva de 40x e avaliados em um sistema computadorizado de captura de imagens Image Pro Plus 7.0 (Media Cybernetics, Silver springs, Maryland, USA). Todas as análises histológicas foram analisadas pelo mesmo observador sem conhecimento prévio de qual grupo pertenciam os animais.

4.12 Análises estatísticas

Os experimentos foram realizados com no mínimo três ensaios independentes em triplicata. As diferenças estatísticas entre os grupos foram avaliados pelo programa Graphpad Prism (GraphPad, Inc., versão 6.0) utilizando o teste *t* de *Student* para variáveis independentes e não pareadas ou o teste para análises de variância (ANOVA), seguido pelo teste de *Tukey*, para as análises de comparação múltipla, sendo considerados os resultados significativamente diferentes quando $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Confirmação da identificação das cepas bacterianas em estudo

As cepas utilizadas neste trabalho foram identificadas como *Corynebacterium diphtheriae* através do sistema APICoryne e da espectrometria de massa (MALDI-TOF). Os códigos fornecidos pelo sistema APICoryne e os *scores* gerados pela espectrometria de massa podem ser observados no Tabela 3.

Tabela 3 - Confirmação das cepas em estudo através do sistema APICoryne, através do APICoryne e por MALDI-TOF

Cepas	APICoryne		MALDI-TOF	
	Espécie	Código	Espécie	Score
CDC-E8392	<i>C. diphtheriae</i>	1000212	<i>C. diphtheriae</i>	2154
LDCIC-L2	<i>C. diphtheriae</i>	1000212	<i>C. diphtheriae</i>	2294
LDCIC-L2/pXMJ19mCherry	<i>C. diphtheriae</i>	1000212	<i>C. diphtheriae</i>	2231

Legenda: Perfil 1000212 obtido pelo programa APIWeb e *Score* > 2.0 pelo MALDI-TOF correspondem à identificação excelente para espécie *C. diphtheriae*.

Fonte: A AUTORA, 2018.

5.2 Análises de Bioinformática

5.2.1- Identificação de domínios conservados

A comparação *in silico* da sequência oligonucleotídica do gene *oxyR* com os genomas disponíveis no banco de dados do NCBI *Chromosome Sequences*, permitiu identificar 18 alinhamentos significativos, todos correspondentes às cepas de *C. diphtheriae*, com alto grau de conservação, homologia superior a 99% e com *e-value* de 0.0 (Figura 4). A presença do gene *oxyR*, independe da presença do gene *tox*, uma vez que cepas produtoras e não produtoras de TD, apresentaram homologia para o gene *oxyR*.

Figura 4 - Comparação entre as sequências oligonucleotídicas das cepas de *C. diphtheriae* com a sequência de *oxyR* de *C.diphtheriae* CDCE 8392.

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 18

[Alignments](#) [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Corynebacterium diphtheriae CDCE 8392, complete genome	1735	1735	100%	0.0	100%	CP003211.1
<input checked="" type="checkbox"/> Corynebacterium diphtheriae HCO2, complete genome	1729	1729	100%	0.0	99%	CP003213.1
<input checked="" type="checkbox"/> Corynebacterium diphtheriae strain FDAARGOS_197 chromosome, complete genome	1724	1724	100%	0.0	99%	CP020410.2
<input checked="" type="checkbox"/> Corynebacterium diphtheriae VA01, complete genome	1724	1724	100%	0.0	99%	CP003217.1
<input checked="" type="checkbox"/> Corynebacterium diphtheriae HCO3, complete genome	1724	1724	100%	0.0	99%	CP003214.1
<input checked="" type="checkbox"/> Corynebacterium diphtheriae BH8, complete genome	1724	1724	100%	0.0	99%	CP003209.1
<input checked="" type="checkbox"/> Corynebacterium diphtheriae 31A, complete genome	1724	1724	100%	0.0	99%	CP003206.1
<input checked="" type="checkbox"/> Corynebacterium diphtheriae gravis NCTC13129, complete genome; segment 5/8	1724	1724	100%	0.0	99%	BX248358.1
<input checked="" type="checkbox"/> Corynebacterium diphtheriae strain BQ11 chromosome, complete genome	1718	1718	100%	0.0	99%	CP029644.1
<input checked="" type="checkbox"/> Corynebacterium diphtheriae strain B-D-16-78, complete genome	1718	1718	100%	0.0	99%	CP018331.1
<input checked="" type="checkbox"/> Corynebacterium diphtheriae HCO4, complete genome	1718	1718	100%	0.0	99%	CP003215.1
<input checked="" type="checkbox"/> Corynebacterium diphtheriae INCA 402, complete genome	1718	1718	100%	0.0	99%	CP003208.1
<input checked="" type="checkbox"/> Corynebacterium diphtheriae bv. mitis str. ISS 3319 chromosome, complete genome	1712	1712	100%	0.0	99%	CP025209.1
<input checked="" type="checkbox"/> Corynebacterium diphtheriae genome assembly NCTC11397, chromosome : 1	1712	1712	100%	0.0	99%	LN831026.1
<input checked="" type="checkbox"/> Corynebacterium diphtheriae PW8, complete genome	1712	1712	100%	0.0	99%	CP003216.1
<input checked="" type="checkbox"/> Corynebacterium diphtheriae C7 (beta), complete genome	1712	1712	100%	0.0	99%	CP003210.1
<input checked="" type="checkbox"/> Corynebacterium diphtheriae HCO1, complete genome	1685	1685	100%	0.0	99%	CP003212.1
<input checked="" type="checkbox"/> Corynebacterium diphtheriae 241, complete genome	1685	1685	100%	0.0	99%	CP003207.1

Fonte: Dados extraídos do aplicativo online Blast-n. Disponível no site: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, acesso em 01 de junho de 2018.

Ao analisar a sequência da proteína no banco de dados de proteínas (Pfam), foram identificados dois domínios conservados, um pertencente à família HTH (*helix – turn – helix*) e outro pertencente ao domínio LysR *substrate* (Figura 5). A primeira família compreende proteínas que regulam a expressão gênica, enquanto que a segunda, proteínas de ligação periplasmática.

Figura 5 - Domínios conservados da proteína OxyR de *C. diphtheriae*



Fonte: Dados extraídos do aplicativo *online* Pfam. Disponível no site: <http://pfam.xfam.org/family/PF00126.26>, acesso em 15 de junho de 2016.

5.2.2 Análise do modelo tridimensional

A predição da função da proteína OxyR (CDCE8392_1399) de *C. diphtheriae* CDC-E8392 foi realizada pelo servidor *Phyre*² o qual utiliza mecanismos de reconhecimento, homologia e analogia. O domínio conservado com melhor alinhamento está apresentado na Figura 6. Neste modelo, 300 resíduos da sequência foram alinhados com 100 % de confiança e 96 % de cobertura com um *operon* de regulação transcricional.

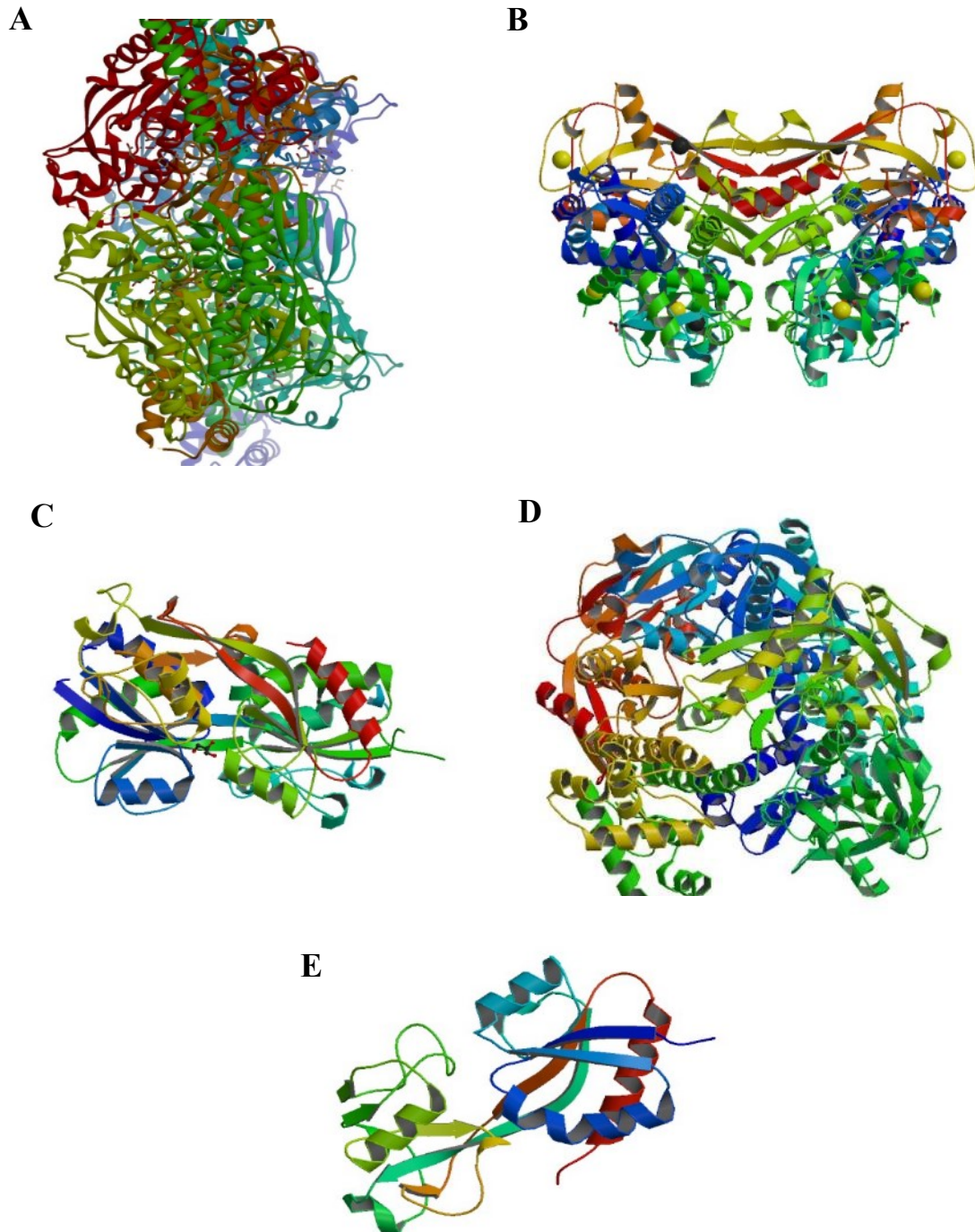
Figura 6 - Modelo tridimensional da proteína OxyR de *C. diphtheriae* CDC-E8392



Fonte: Dados fornecidos pelo servidor *Phyre*². Disponível em <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>, acesso em 15 de junho de 2016.

Adicionalmente, foi realizada a análise do modelo tridimensional da proteína OxyR pelo servidor *online* I-TASSER, que gerou cinco melhores modelos estruturais com valor de *c-scores* que variam de -5 a 0,99, sendo a estrutura selecionada aquela com maior valor (*c-score*= 0,92). Dentre os 5 principais análogos estruturais encontrados estão a OxyR de *Pseudomonasaeruginosa* cepa C199D, com *score* de 0,927 (Figura 7 A); a estrutura cristalina do regulador transcricional tipo LysR de *Comamonastestosteroni* com *score* de 0,710 (Figura 7 B); o domínio regulador do OxyR2 de *Vibriovulnificus* com *score* de 0,596 (Figura 7 C); o regulador transcricional da família LysR de *Cupriavidusnecator* com *score* 0,595 (Figura 7 D) e a estrutura do cristalina de OxyR oxidada de *Escherichia coli* com *score* de 0,594 (Figura 7 E), respectivamente.

Figura 7 - Principais estruturas análogas a sequência da proteína OxyR de *C. diphtheriae* CDC-E8392



Legenda: A - OxyR de *Pseudomonas aeruginosa* cepa C199D; B - Estrutura cristalina do regulador transcricional tipo LysR de *Comamonas testosteroni*; C - Domínio regulador do OxyR de *Vibrio vulnificus*; D - Regulador transcricional da família LysR de *Cupriavidus necator*; E - Estrutura cristalina de OxyR de *Escherichia coli*.

Fonte: Dados fornecidos pelo servidor *I-TASSER*. Disponível em <https://zhanglab.cmb.med.umich.edu/I-TASSER/>, acesso em 15 de junho de 2016.

5.3 Influência de OxyR na susceptibilidade de *C. diphtheriae* a agentes antimicrobianos e ERO

A interrupção do gene *oxyR* não influenciou na sensibilidade de *C. diphtheriae* aos antimicrobianos testados, uma vez que a cepa mutante (LDCIC-L2) permaneceu sensível a estes.

A influência de OxyR na susceptibilidade de *C. diphtheriae* a agentes oxidantes foi avaliada através da exposição das cepas mutante e selvagem a diferentes concentrações de H₂O₂ e paraquate (gerador de O₂⁻). A resistência de LDCIC-L2 (MIC=5 mM) ao H₂O₂ foi 4 vezes maior do que da cepa, CDC-E8392, selvagem (MIC=1.25 mM). O ensaio de disco difusão confirmou a maior resistência da cepa mutante, devido à ausência de halo de inibição enquanto que para a cepa selvagem foi observado um halo de inibição de 22 mm. Em relação à susceptibilidade ao paraquate, não foi observada diferença entre as cepas (MIC=10mM) (Tabela 4).

Tabela 4 - Influência da interrupção do gene *oxyR* na susceptibilidade a espécies reativas de oxigênio

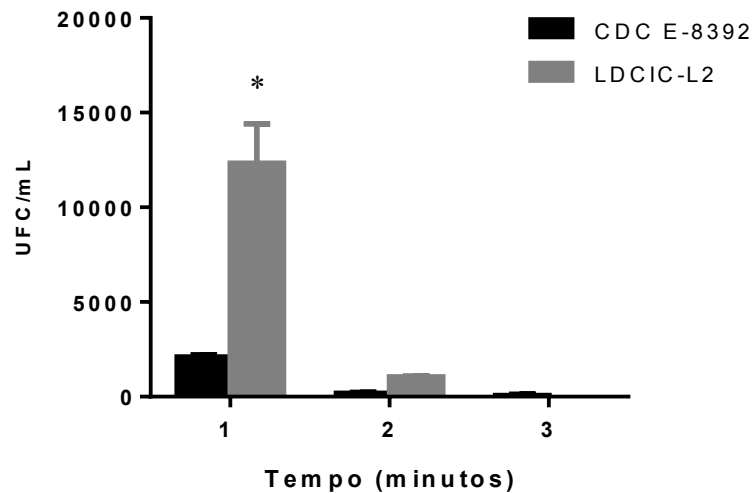
Cepa	Origem	<i>oxyR</i>	H ₂ O ₂ CIM (mM)	H ₂ O ₂ Halo de inibição (mm)	Paraquate CIM (mM)
LDCIC-L2	CDC-E8392 pCR.2.1-TOPO'CDC- E8392_1339''	Interrompido	5.00*	0*	10.00
CDC-E8392	Difteria/faringite	+	1.25	22	10.00

Legenda: CIM: Concentração Inibitória Mínima. * $P < 0,05$ em relação a cepa selvagem.
Fonte: A AUTORA, 2018.

5.4 Influência de OxyR na susceptibilidade de *C. diphtheriae* ao gás ozônio

A fim de investigar o papel de OxyR na susceptibilidade de *C. diphtheriae* ao estresse causado pelo ozônio, as cepas selvagem e mutante foram expostas a este agente estressor. Como pode ser observado na Figura 8, a exposição ao gás por 1 minuto causou redução de 4 e 5 log na contagem de bactérias viáveis para as cepas mutante e selvagem, respectivamente. Apesar de uma aparente maior viabilidade da cepa mutante, após 2 minutos de exposição, não houve diferença significativa em comparação com a selvagem. Uma drástica redução da viabilidade foi observada para ambas após 2 e 3 minutos de exposição.

Figura 8 - Sensibilidade das cepas selvagem e mutante de *C. diphtheriae* frente ao gás de ozônio



Legenda: Cepas de *C. diphtheriae* selvagem (CDCE-8392) e mutante (LDCIC-L2) expostas 40 mg/mL de oxônio por 1, 2 e 3 minutos, onde $*P > 0,001$ em relação a cepa selvagem.

Fonte: A AUTORA, 2018.

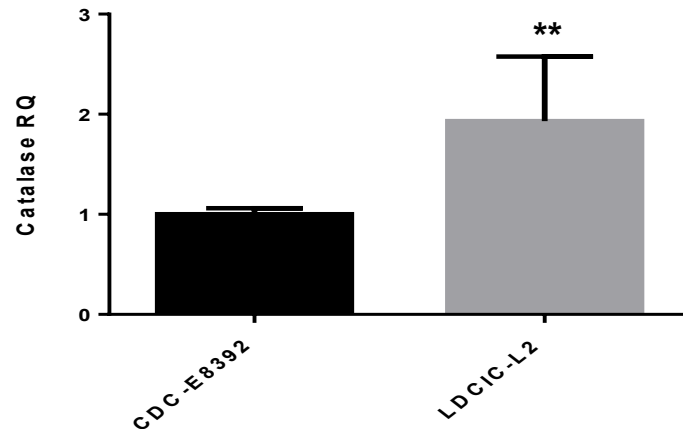
5.5 Influência da proteína OxyR na expressão de genes relacionados ao estresse por *C. diphtheriae*

Em função da maior resistência da cepa LDCIC-L2 ao H₂O₂, foi investigado o papel do OxyR na expressão do gene *katA* (codificador da enzima catalase). Além disso, avaliamos também a influência desta proteína na expressão do gene *cspA*, gene relacionado ao estresse induzido por choque frio, pelas cepas mutante e selvagem de *C. diphtheriae*. A expressão gênica foi avaliada através da quantificação relativa por RT-qPCR determinada pelo $2^{-\Delta\Delta CT}$, que corresponde a variação dos níveis transcricionais de cada gene. Foi observada eficiência de amplificação satisfatória para todos os iniciadores utilizados.

5.5.1 Expressão do gene *katA* pelas cepas de *C. diphtheriae*

A expressão do gene *katA* pelas cepas estudadas está apresentada na Figura 9. A interrupção do gene *oxyR* resultou em um aumento de 90 % da expressão do gene *katA* pela cepa LDCIC-L2, o que corrobora a maior resistência desta cepa ao H₂O₂ quando comparada à cepa selvagem.

Figura 9 - Expressão do gene *katA* pelas cepas selvagem e mutante de *C. diphtheriae*



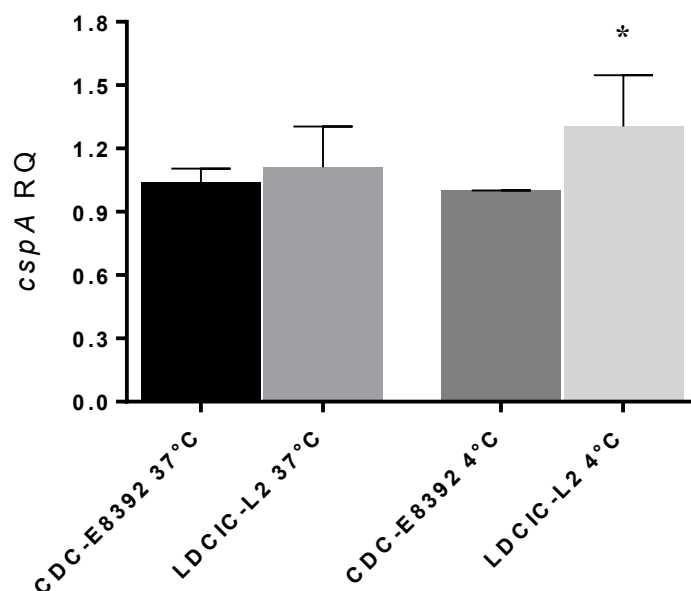
Legenda: Quantificação relativa da expressão de catalase (RQ catalase) por RT-qPCR. O gráfico apresenta a média ± DP da quantificação relativa da expressão da catalase de três experimentos independentes em triplicata, onde $**P > 0,005$ em relação a cepa selvagem

Fonte: A AUTORA, 2018.

5.5.2 Expressão do gene *cspA* pelas cepas de *C. diphtheriae*

Para avaliar o papel de OxyR na expressão de *cspA*, as cepas selvagem e mutante de *C. diphtheriae* foram cultivadas a 37 °C e, posteriormente, submetidas ao choque frio (4 °C por 2 h). A interrupção do gene *oxyR*, favoreceu a expressão de *cspA*, com níveis transcricionais significativamente maiores do que os apresentados pela cepa selvagem, quando submetidas a 4 °C. No entanto, em condições ótimas de temperatura (37 °C) ambas as cepas apresentaram níveis transcricionais de *cspA* similares (Figura 10).

Figura 10 - Expressão de *cspA* pelas cepas selvagem e mutante de *C. diphtheriae* após o choque frio



Legenda: Quantificação relativa de *cspA* pela cepas selvagem (CDC-E8392) e mutante (LDCIC-L2) de *C. diphtheriae* submetidas ao choque frio (4 °C / 2 h). O gráfico apresenta a média \pm DP de três experimentos independentes em triplicata, onde $*P < 0.05$ em relação a selvagem a 4°C.

Fonte: A AUTORA, 2018.

5.6 Influência de OxyR na capacidade de *C. diphtheriae* aderir a superfícies abióticas

O efeito de OxyR na capacidade de *C. diphtheriae* aderir a superfícies abióticas foi analisado por ensaios de aderência ao vidro e ao poliestireno. A interrupção do gene *oxyR* não influenciou na formação de biofilme pelo microrganismo, uma vez que tanto a cepa selvagem quanto a cepa mutante não foram capazes de aderir ao vidro. Entretanto, ambas as cepas foram capazes de aderir moderadamente à superfície de poliestireno (Tabela 5).

Tabela 5 - Influência da interrupção do gene *oxyR* na capacidade de *C. diphtheriae* de aderir a superfícies abióticas

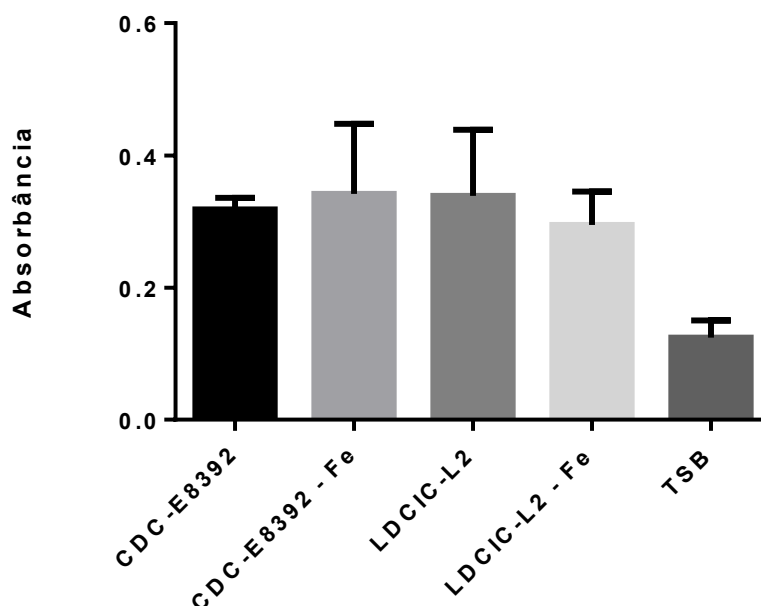
Cepas	Aderência ao poliestireno	Aderência ao vidro
CDC-E8392	(++)	(-)
LDCIC-L2	(++)	(-)

Legenda: (++) Aderência moderada; (-) Não aderente.
 Fonte: A AUTORA, 2018.

5.7 Avaliação da influência do ferro na formação de biofilme em poliestireno por *C. diphtheriae*

Para avaliar o efeito da quelação de ferro juntamente com o OxyR na capacidade de formação de biofilme por *C. diphtheriae* em superfície de poliestireno, as cepas selvagem e mutante foram cultivadas na presença e na ausência de dipiridil. A análise quantitativa revelou que não houve alteração significativa na formação de biofilme quando os microrganismos foram cultivados na presença do quelante (Figura 11).

Figura 11 - Influência de OxyR e privação de ferro na produção de biofilme em poliestireno por *C. diphtheriae*



Legenda: CDC-E8392 - Cepa selvagem; CDC-E8392-Fe - cepa selvagem cultivada na ausência de ferro; LDCIC-L2 - cepa mutante (*oxyR* interrompido); LDCIC-L2-Fe - cepa mutante cultivada na ausência de ferro; TSB - Controle negativo. O gráfico apresenta a média ± DP de três experimentos independentes em quadruplicata.

Fonte: A AUTORA, 2018.

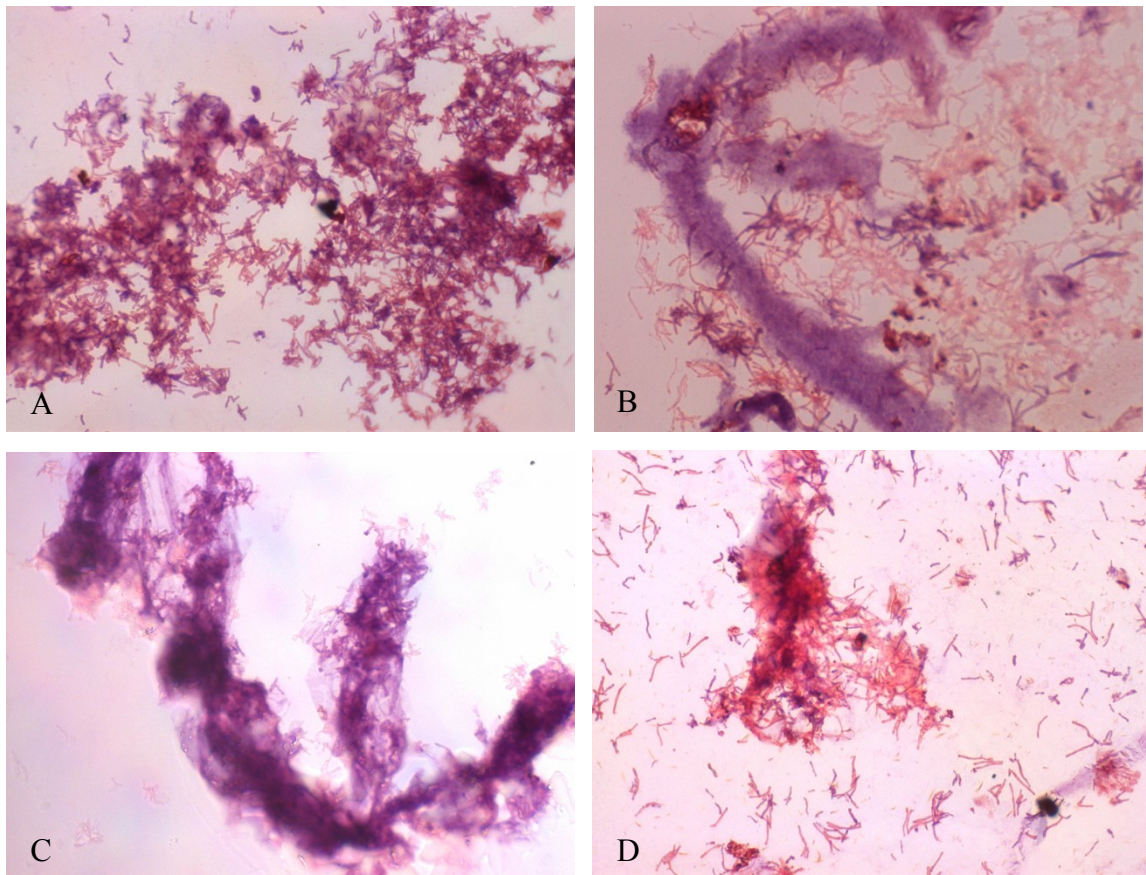
5.8 Influência de OxyR sobre a natureza química do biofilme formado por *C. diphtheriae* na presença e sob privação de ferro

As colorações com os corantes *comassie blue* e safranina revelaram a natureza, predominantemente, proteica (coloração azulada da matriz), dos biofilmes formados por ambas as cepas de *C. diphtheriae* em meio TSB. Entretanto, na presença do quelante de ferro, a cepa LDCIC-L2, aparentemente, apresentou uma discreta captação do corante *comassie blue* e uma coloração mais intensa pela safranina, sugerindo, uma maior participação de polissacarídeos na composição da matriz exopolimérica desta cepa (Figura 12).

Foi observado também que, sob privação de ferro, ambas as cepas tiveram sua morfologia alterada apresentando um aspecto filamentosos. A coloração pela safranina revelou

a participação de polissacarídeos aparentemente justapostos às células bacterianas para todas as cepas estudadas.

Figura 12 - Influência do OxyR sobre a natureza química do biofilme formado por *C. diphtheriae* na presença e sob privação de ferro



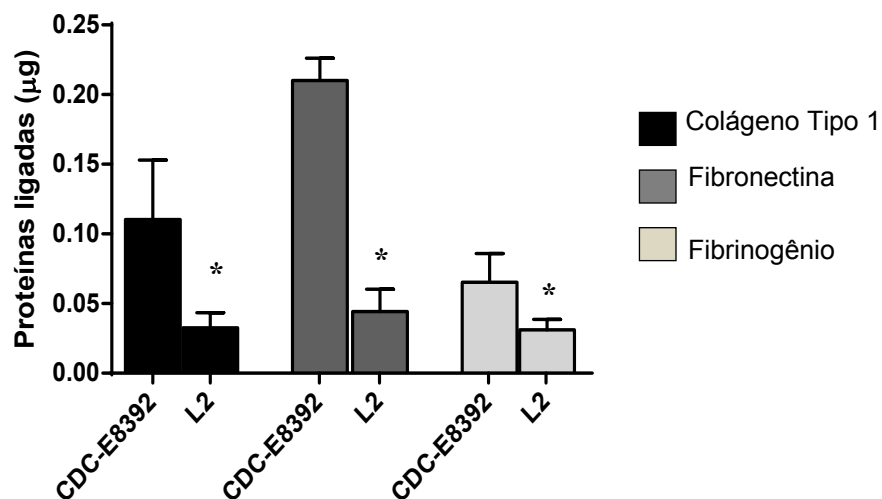
Legenda: Produção de biofilme por *C. diphtheriae* na superfície hidrofóbica de laminulas de Thermanox™ após 48 h de incubação. A - CDCE-8392/TSB; B - CDCE-8392 na presença de dipiridil; C - LDCIC-L2/TSB; D - LDCIC-L2 na presença de dipiridil.

Fonte: A AUTORA, 2018.

5.9 Influência de OxyR na capacidade de interação de *C. diphtheriae* com proteínas de matriz extracelular e plasmática

Os ensaios de interação de *C. diphtheriae* com proteínas de matriz extracelular e plasmática revelaram que o gene *oxyR*, aparentemente, está envolvido na ligação a proteínas do hospedeiro, uma vez que a interrupção deste gene reduziu a capacidade de ligação da cepa LDCIC-L2 a todas as proteínas testadas, quando comparada a cepa selvagem CDC-E8392 (Figura 13).

Figura 13 - Ligação de *C. diphtheriae* a proteínas plasmáticas e de matriz extracelular



Legenda: O gráfico apresenta a média \pm DP de três experimentos independentes em triplicata, onde $**P > 0.05$ em relação aos dados da cepa selvagem.

Fonte: A AUTORA, 2018.

5.10 Influência de OxyR nos processos de interação de *C. diphtheriae* com células eucarióticas

A influência de OxyR nos processos de interação de *C. diphtheriae* com células eucarióticas foi analisada utilizando células epiteliais respiratória (HEp-2 e A-549) e

macrófagos humanos (U-937). Todas as cepas foram capazes de aderir às células eucarióticas após 3 h de incubação, apresentando padrão de aderência difuso (AD). Para as três linhagens celulares não houve diferença significativa na contagem de bactérias aderidas. No entanto, foi observado que o número de bactérias internalizadas viáveis foi significativamente maior para a cepa LDCIC-L2 comparada à cepa selvagem, tanto em relação às células epiteliais respiratórias quanto aos macrófagos humanos, sugerindo que a interrupção do gene *oxyR* favoreça a sobrevivência de *C. diphtheriae* no interior de células eucarióticas (Tabela 6).

Tabela 6 - Contagem de bactérias viáveis (UFC/mL) durante a interação das cepas mutante e selvagem de *C. diphtheriae* com células epiteliais respiratórias (HEP-2 e A-549) e macrófagos humanos U-937

	Sobrenadante	UFC/mL Associação	Internalização	Padrão de Aderência
<i>Interação com células HEP-2</i>				
CDC-E8392	$11.3 \pm 1.11 \times 10^4$	$5.3 \pm 1.30 \times 10^4$	$1.00 \pm 0.57 \times 10^3$	Difuso
LDCIC-L2	$12.1 \pm 0.40 \times 10^4$	$5.8 \pm 0.76 \times 10^4$	$1.40 \pm 0.05 \times 10^3^*$	Difuso
<i>Interação com células A-549</i>				
CDC-E8392	$10.3 \pm 2.15 \times 10^4$	$3.0 \pm 0.28 \times 10^4$	$1,20 \pm 0.66 \times 10^3$	Difuso
LDCIC-L2	$11.1 \pm 1.20 \times 10^4$	$2.8 \pm 2.50 \times 10^4$	$1,35 \pm 0.39 \times 10^3^*$	Difuso
<i>Interação com células U-937</i>				
CDC-E8392	$3.3 \pm 2.03 \times 10^4$	$9.0 \pm 1.28 \times 10^4$	$2.20 \pm 0.2 \times 10^2$	Difuso
LDCIC-L2	$3.1 \pm 2.40 \times 10^4$	$9.8 \pm 0.70 \times 10^4$	$3.50 \pm 0.40 \times 10^2^*$	Difuso

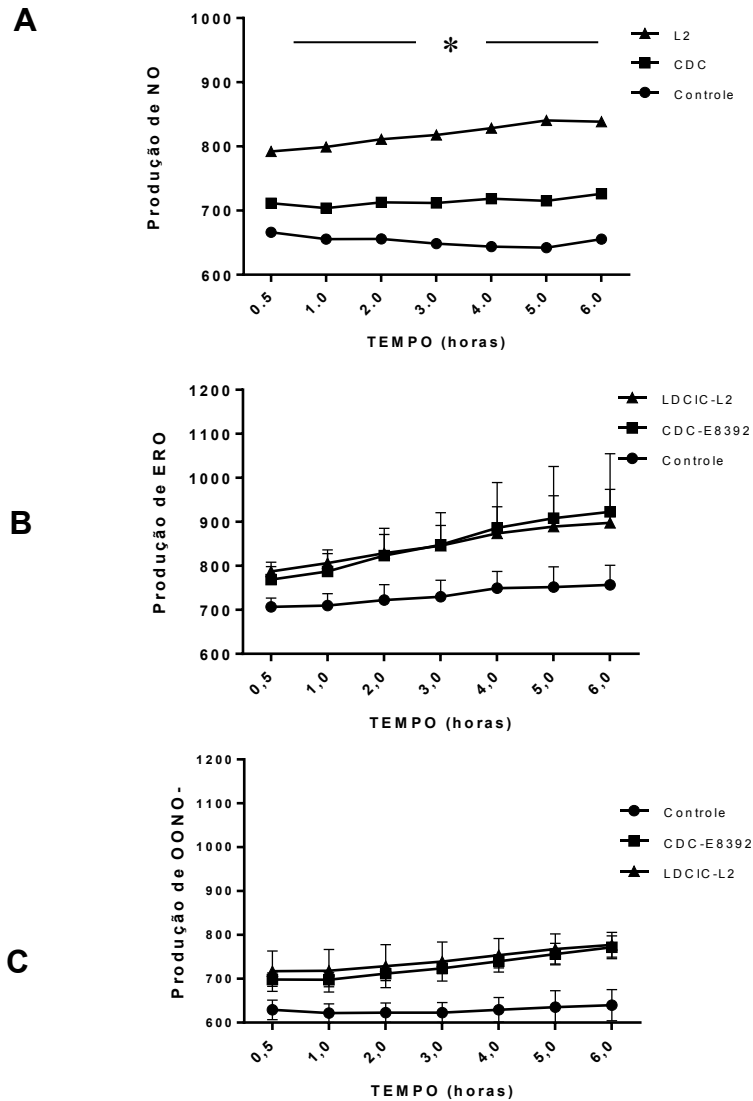
Legenda: Média \pm DP de três experimentos independentes em triplicata, onde * $P < 0.05$ em relação aos dados da cepa selvagem.

Fonte: A AUTORA, 2018.

5.11 Influência de OxyR na produção de ERO e ERN por células epiteliais respiratórias das linhagens A549 e HEp-2

O papel de OxyR na produção de ERO e ERN por células epiteliais respiratórias, em resposta à infecção por *C. diphtheriae*, foi investigado através da utilização de sondas fluorescentes específicas para óxido nítrico (NO), peroxinitrito (OONO⁻) e espécies reativas de oxigênio (ERO). A infecção das células epiteliais utilizadas neste trabalho (A-549 e HEp-2), pelas cepas selvagem e mutante (deficiente em *oxyR*), levou ao aumento da produção ERO e ERN quando comparadas às células controle (não infectadas), em todos os tempos analisados. A infecção pela cepa mutante levou a um aumento na produção de NO pelas células A-549 quando comparado a infecção destas pela cepa selvagem, em todos os tempos de infecção. Para a produção de ERO e OONO⁻, não houve diferença entre as cepas selvagem e mutante (Figura 14). Em relação às células HEp-2, os resultados obtidos foram similares aqueles produzidos pelos pneumócitos. Porém, a detecção do aumento de NO pelas células infectadas com a cepa mutante foi observada após 3 h de infecção (Figura 15). A produção de ERO e OONO⁻, não foi influenciada pela infecção destas células por ambas as cepas de *C. diphtheriae*.

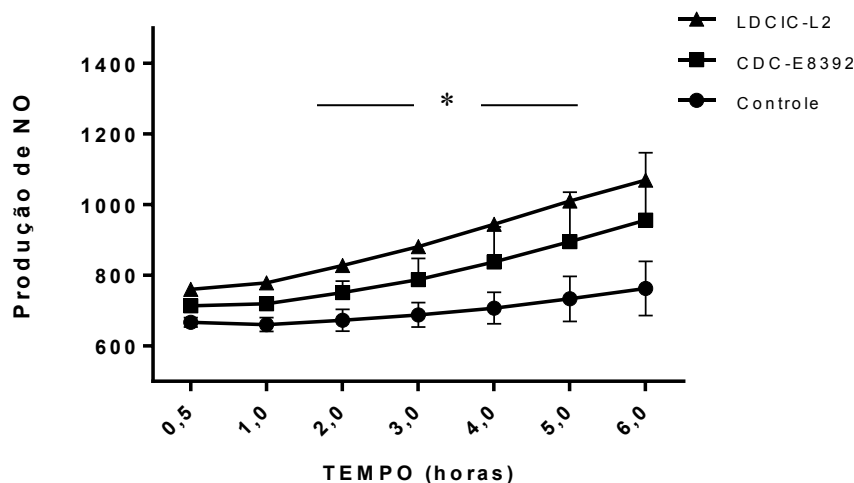
Figura 14 - Produção de NO, ERO e OONO- por células epiteliais respiratórias A549 infectadas com *C. diphtheriae*



Legenda: Produção de NO, ERO e OONO- por células epiteliais respiratórias A549 tratadas com 5 μ M das sondas DAF-FM DA (A1 e A2), CM-H2DCFDA (B) e HPF (C), respectivamente e infectadas pelas cepas CDC-E8392 (selvagem) e LDCIC-L2 (mutante) de *C. diphtheriae* e, por diferentes períodos de tempo. Células não infectadas foram utilizadas como controle negativo. Os gráficos mostram a média de cinco experimentos, realizados em quadruplicata, onde $*P < 0.05$ em relação aos resultados obtidos com a cepa selvagem.

Fonte: A AUTORA, 2018.

Figura 15 - Produção de NO por células epiteliais respiratórias HEP-2 infectadas com *C. diphtheriae*



Legenda: Produção de NO por células epiteliais respiratórias HEP-2 tratadas com 5 μ M das sondas DAF-FM DA e infectadas pelas cepas CDC-E8392 (selvagem) e LDCIC-L2 (mutante) de *C. diphtheriae*, por diferentes períodos de tempo. Células não infectadas foram utilizadas como controle negativo. Os gráficos mostram a média de cinco experimentos, realizados em quadruplicata, onde $*P < 0.05$ em relação aos resultados obtidos com a cepa selvagem.

Fonte: A AUTORA, 2018.

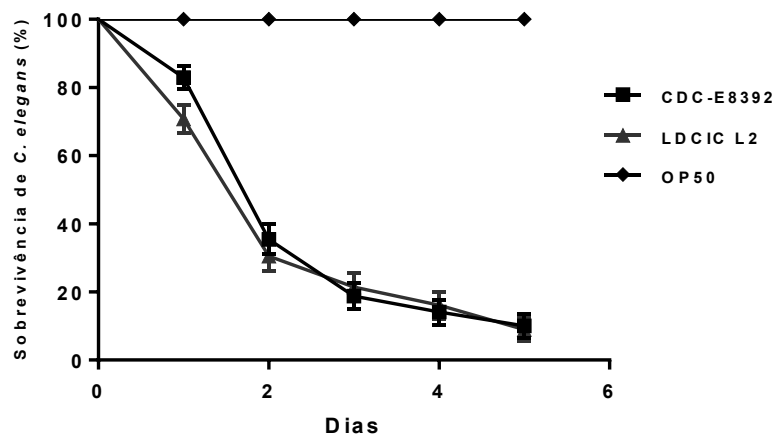
5.12 Influência de OxyR na sobrevivência de nematódeos *C. elegans* infectados com cepas mutante e selvagem de *C. diphtheriae*

5.12.1 Sobrevivência de *C. elegans* após interação com *C. diphtheriae*

O ensaio de interação *in vivo*, utilizando o modelo nematódeo, demonstrou que todas as cepas de *C. diphtheriae* estudadas foram capazes de promover a morte de *C. elegans*, com percentuais de letalidade diversos. Os vermes infectados com a cepa controle *E.coli* OP50 permaneceram viáveis (Figura 16). Após o primeiro dia de interação foi observado que a cepa a LDCIC-L2 foi capaz de matar 26 % dos vermes enquanto que a cepa CDC-E8392 matou 19 % dos nematodos. Do segundo dia em diante houve coincidência entre os valores de

sobrevivência expressos tanto para a cepa selvagem quanto para a cepa mutante LDCIC-L2, não havendo diferença significativa na curva de sobrevivência.

Figura 16 - Sobrevivência de *C. elegans* após interação com *C. diphtheriae*

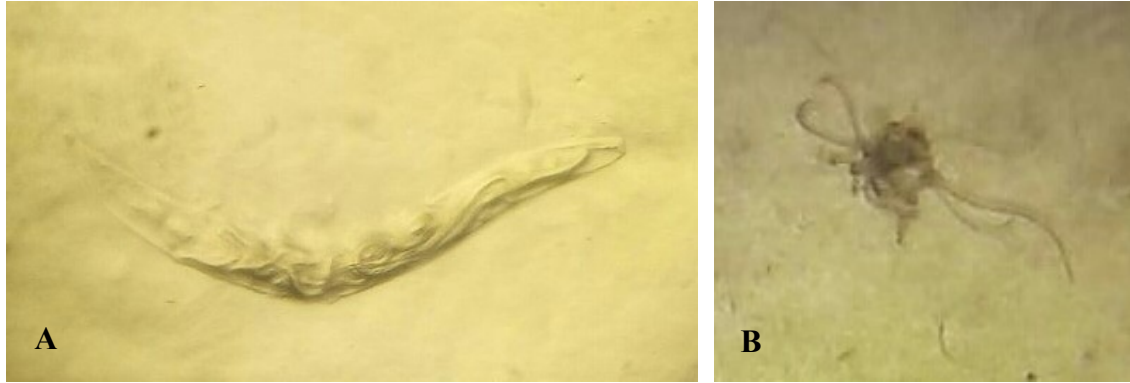


Legenda: Curva de sobrevivência após 5 dias de interação de *C. elegans* com as cepas selvagem e mutante de *C. diphtheriae*. A cepa de *E. coli* OP50 foi usada como controle. O gráfico apresenta média \pm DP dos resultados de dois experimentos independentes em triplicata .

Fonte: A AUTORA, 2018.

Os vermes mortos infectados por ambas as cepas foram capazes de induzir o efeito *bagging* (larvas vivas dentro do verme morto) e a formação de *star*, sendo estes efeitos mais evidentes nos nematodos infectados pela cepa mutante (Figura 17A e B). A formação de *star* foi observada principalmente no estágio larvar do nematodo, após 48 h-72 h de interação. A cepa não patogênica *E. coli* OP50 não foi capaz de induzir a formação de *star* e do efeito *bagging*.

Figura 17 - Formação de *bagging* e *star* induzido pela infecção de *C. elegans* pela cepa mutante de *C. diphtheriae*



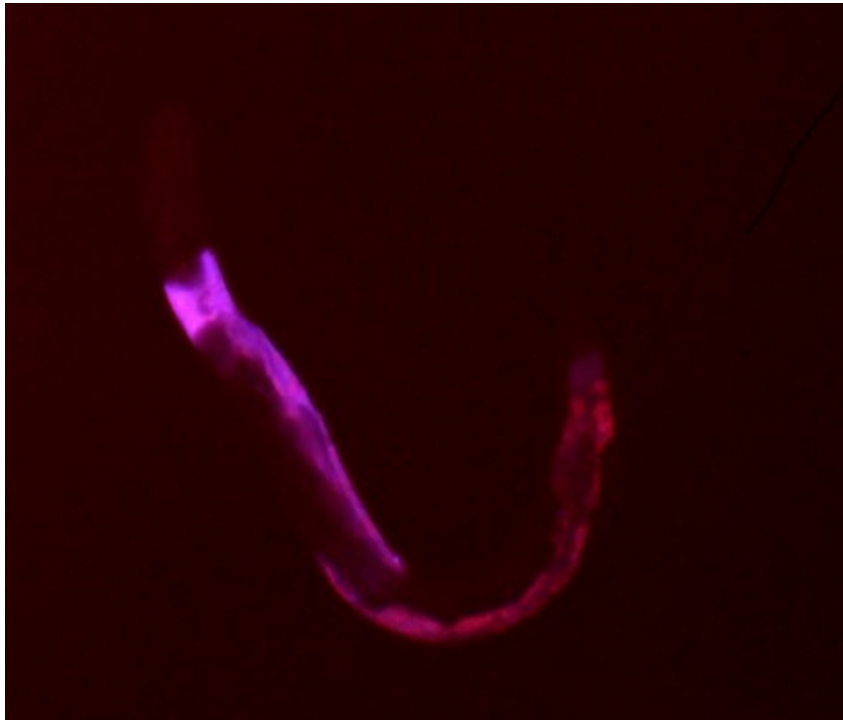
Legenda: *C. elegans* após interação com a cepa LDCIC-L2 de *C. diphtheriae* apresentando *bagging*, larvas vivas dentro do nematodo morto (A) e formação de *Star* (B).

Fonte: A AUTORA, 2018.

5.12.2 Colonização de *C. elegans* pela cepa LDCIC-L2 pXMJ19mCherry

Para avaliar a influência de OxyR na colonização e persistência do nematodo por *C. diphtheriae* foi utilizada a cepa LDCIC-L2 pXMJ19mCherry que emite fluorescência vermelha ao ser observada em microscopia de fluorescência. A imagem foi comparada com dados já obtidos com a cepa *C. diphtheriae* CDCE-8392 (ANTUNES *et al.*, 2015). Foi observado que a cepa LDCIC-L2 pXMJ19mCherry foi capaz de colonizar todo o intestino do verme, de forma similar ao observado anteriormente pela cepa selvagem (Figura 18).

Figura 18 - Colonização de *C. elegans* pela cepa de *C. diphtheriae* mutante para o gene *oxyR*



Legenda: Microscopia de fluorescência da colonização de *C. elegans* pela cepa de *C. diphtheriae* LDCIC-L2pXMJ19mCherry (gene *oxyR* interrompido).

Fonte: A AUTORA, 2018.

5.13 Papel da proteína OxyR no potencial artritogênico de *C. diphtheriae*

A influência do regulador transcricional OxyR sobre a capacidade de *C. diphtheriae* em causar infecção artritogênica foi observada por meio de modelo *in vivo*, utilizando camundongos SwissWebster, inoculados com as cepas CDC-E8392 e LDCIC-L2.

Não foram observadas diferenças nos sinais clínicos de artrite entre os camundongos infectados pelas diferentes cepas. Porém, micrografias histopatológicas das articulações de membro posterior após 30 dias de infecção, mostraram que camundongos infectados pela cepa mutante apresentaram processo inflamatório mais evidente do que pela cepa selvagem.

As Figuras 19 e 20 apresentam micrografias histológicas das articulações de membros posteriores de camundongos infectados pela via caudal com ambas as cepas. Os joelhos dos animais do grupo controle, permaneceram livres de alterações inflamatórias com membrana

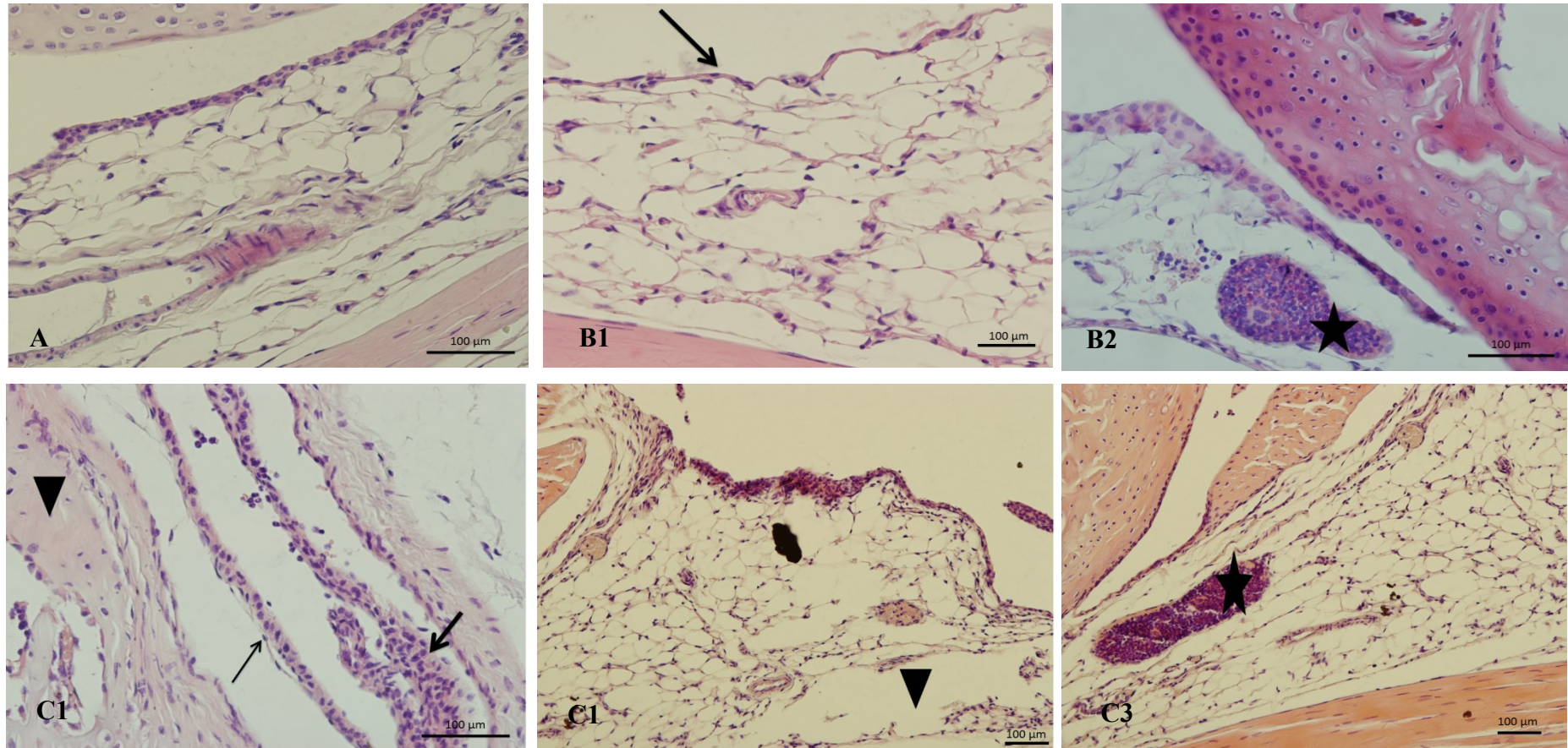
sinovial em mono ou dupla camada, sem hipertrofia, tecido conjuntivo normal com poucos fibroblastos e vasos sanguíneos, sem processo inflamatório (Figura 19 A). A cartilagem articular e o osso cortical sem alterações está representada na Figura 20A.

Em camundongos infectados com a cepa selvagem foi observado um discreto espessamento da membrana sinovial, sem sinais evidentes de inflamação no tecido conjuntivo, com alguns vasos congestos (Figura 19B) e células inflamatórias em menor quantidade do que observado na cepa mutante, com distribuição perivascular. Na cartilagem articular foram observadas algumas áreas com desorganização celular, visualizadas na zona profunda (Figura 20B).

Os achados histopatológicos do grupo infectado com a cepa mutante LDCIC-L2 apresentaram membrana sinovial espessada com hipertrofia e presença de poucas células necróticas. O tecido conjuntivo da membrana sinovial apresentou vasos congestos, aumento do número de células inflamatórias e fibroblastos com aparecimento de fibras colágenas organizadas (Figura 19C). Além disso, foram observadas na zona profunda da cartilagem articular condrócitos hipertróficos com núcleos picnóticos e calcificação da cartilagem. A cartilagem epifisária apresentou áreas onde não foi possível observar zonas bem definidas. Nessas áreas condrócitos e osteoblastos foram observados próximos, ativos na produção de tecido cartilaginoso e ósseo. Foram observados, ainda, espessamento do endóstio e perióstio com infiltrado de células inflamatórias difusas (Figura 20C).

De todos os grupos analisados, o grupo de animais infectados com a cepa LDCIC-L2 apresentou achados histopatológicos sugestivos de infecção artrítogênica leve com espessamento de membrana sinovial, infiltrado leve inflamatório e alterações na cartilagem articular. Porém, em nenhum dos grupos de camundongos analisados foi observado um quadro de osteoartrite característico.

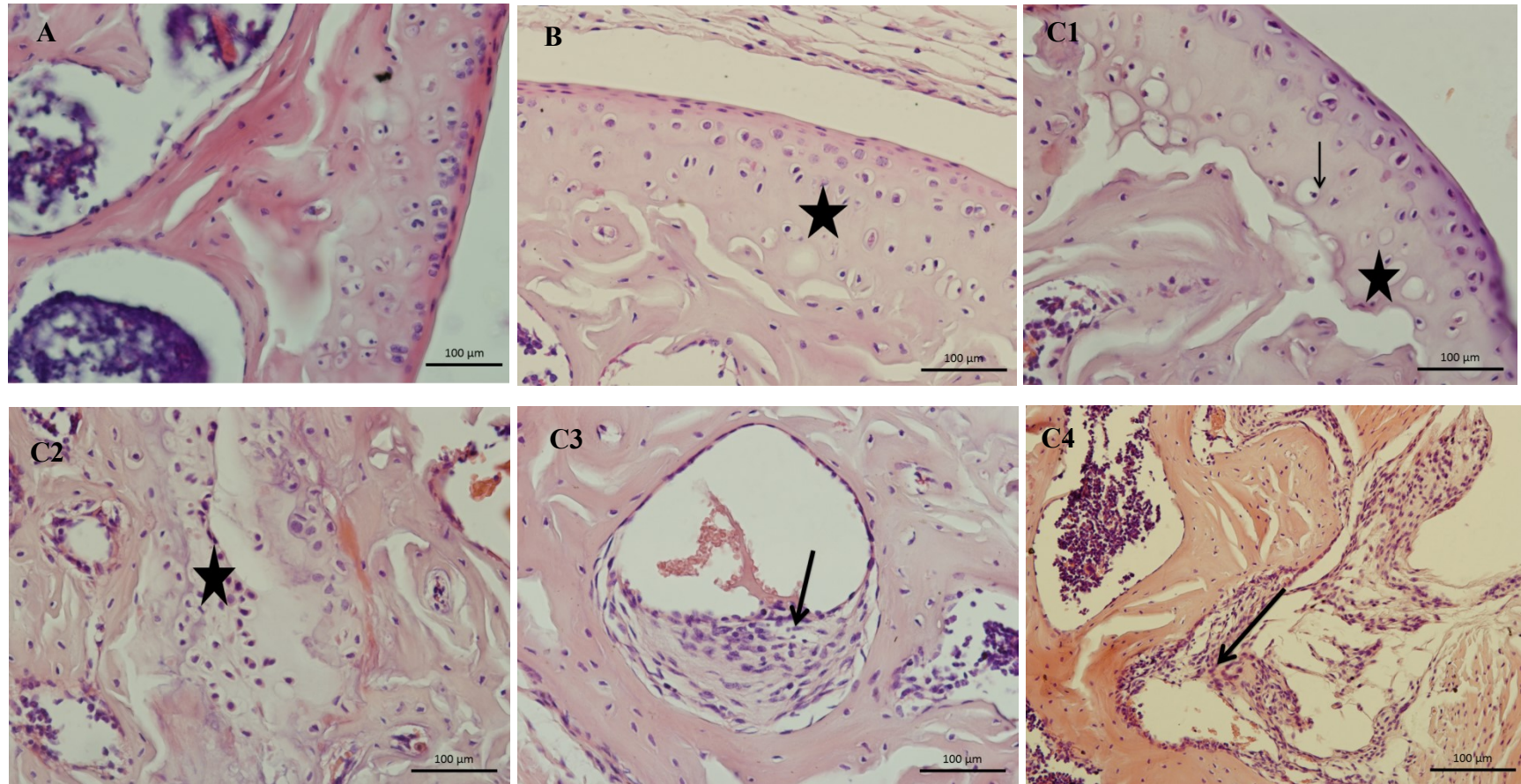
Figura 19 - Micrografias histológicas de articulações de membros posteriores de camundongos infectados experimentalmente por vi a caudal com cepas de *C. diphtheriae* – Parte I - Membrana sinovial e tecido conjuntivo da membrana sinovial



Legenda: Modelo experimental do potencial artrítogenicobacteriano em camundongos infectados pelas cepas de *C. diphtheriae* CDCE-8392 e LDCIC-L2. Características de membrana sinovial e tecido conjuntivo da membrana sinovial de joelho esquerdo. (A) Grupo controle - Membrana sinovial e tecido conjuntivo sem alterações. (B) CDCE-8392 - (B1) Membrana sinovial em monocamadas (seta); sem alteração no tecido conjuntivo; (B2) Vaso congestionado com células inflamatórias (estrela). (C) LDCIC-L2 –(C1) Hiperplasia da membrana sinovial (seta grossa), célula necrótica (seta fina), fibras colágenas (ponta de seta). (C2) Edema no tecido conjuntivo (ponta se seta); (C3) Vaso congestionado com células inflamatórias (estrela).

Fonte:A AUTORA, 2018.

Figura 20 – Micrografias histológicas de articulações de membros posteriores de camundongos infectados experimentalmente por via caudal com cepas de *C.diphtheriae* – Parte II - Cartilagem.



Legenda: Modelo experimental do potencial artrítogênico bacteriano em camundongos infectados pelas cepas de *C. diphtheriae* CDCE-8392 e LDCIC-L2. Características de cartilagem de joelho esquerdo. (A) Grupo controle - cartilagem sem alterações. (B) CDCE-8392 – Aumento de celularidade e desorganização dos condrócitos (estrela); (C) LDCIC-L2 – Cartilagem articular com condrócitos hipertróficos com núcleos picnóticos (C1- seta fina) e áreas de calcificação (C1- estrela); Cartilagem epifisária com zonas não definidas (C2- estrela); Espessamento do endóstio (C3-seta); Perióstio com infiltrado de células inflamatórias difusas (C4- seta).

Fonte: A AUTORA, 2018.

6 DISCUSSÃO

Apesar das intensificações das ações de vacinação, a difteria, cujo principal agente etiológico é *C. diphtheriae*, continua ocorrendo em diferentes países, inclusive no Brasil, incidindo de forma endêmica e epidêmica. Mais frequentemente, são observados casos isolados e surtos em áreas que apresentam baixa cobertura vacinal, especialmente na população com baixas condições socioeconômicas e sanitárias. A letalidade esperada varia entre 5 a 10 %, atingindo 20 % em situações de surtos. No Brasil, o último surto descrito foi no Estado do Maranhão, em 2010, durante o qual foram relatados 29 casos e três óbitos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018; OMS, 2018; SANTOS et al., 2015).

Os principais sintomas da difteria clássica ocorrem como consequência da ação da TD, fator de virulência mais conhecido desta espécie (De ZOYSA; EFSTRATIOU; HAWKEY, 2005; WAGNER et al., 2010). No entanto, clones bacterianos não produtores da toxina têm sido associados a manifestações atípicas da doença e quadro de infecções invasivas, como endocardite, osteomielite, infecções relacionadas ao uso de cateteres e bacteremia. Além disso, quadros de difteria têm sido reportados mesmo em pacientes completamente imunizados. Estes fatos sugerem que outros fatores de virulência, além da toxina, são determinantes no processo patogênico desta espécie (MATTOS-GUARALDI et al., 2001; 2011). A capacidade de aderir a diferentes substratos e de se manter viável no interior de células humanas, incluindo células fagocíticas, são propriedades já descritas para o bacilo diftérico (HIRATA Jr et al., 2002).

Em condições fisiológicas, existe um equilíbrio homeostático entre a formação de espécies reativas e sua remoção por compostos endógenos antioxidantes. O estresse oxidativo ocorre quando este equilíbrio é interrompido pela produção excessiva de agentes oxidantes e/ou pela superação dos mecanismos de defesa antioxidantes (CUNHA et al., 2015).

ERO, como ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($OH\cdot$), são produzidas durante o curso normal do metabolismo aeróbico, devido à redução parcial do oxigênio molecular. Eles são capazes de reagir com uma ampla gama de biomoléculas, incluindo proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, levando à estase celular e à morte (FARR; KOGOMA, 1991; IMLAY, 2008). As bactérias também podem experimentar uma exposição transitória a altos níveis de ERO derivadas de fontes externas, como a resposta de defesa do hospedeiro ou como um efeito secundário de outras tensões ambientais aparentemente não relacionadas.

A capacidade de manter concentrações intracelulares de ERO/ERN dentro de limites seguros é essencial para todos os organismos aeróbicos, exigindo a expressão constitutiva dos sistemas de defesa contra elas. Dessa forma, as células bacterianas desenvolveram respostas adaptativas que levam à transdução de sinais e aumentam a expressão de genes envolvidos na eliminação desses agentes. Dentre as defesas antioxidantes estão as enzimas detoxificantes, que convertem as espécies em produtos inofensivos, e os sistemas reguladores que as detectam e coordenam a resposta apropriada, como o sistema OxyR (DUBBS; MONGKOLSUK, 2012; FARR; KOGOMA, 1991; IMLAY, 2008).

Na literatura, existem poucos relatos sobre enzimas e reguladores envolvidos nas respostas ao estresse oxidativo em *Corynebacterium spp.* (EL SHAFEY et al., 2008; KIM; HOLMES, 2012; MERKAMM et al., 2001; TERAMOTO et al., 2013). Genes codificadores de sistemas envolvidos diretamente com a resposta às ERO foram encontrados em todas as cepas sequenciadas de *C. diphtheriae*. Dentre eles foram identificados os genes codificadores das enzimas catalase (*CDCE-8392_0235*), superóxido dismutases (*CDCE-8392_2152*) e glutationaperoxidase (*CDCE-8392_1815*), e dos reguladores transcricionais *oxyR* (*CDCE8392_1399*) e *soxRS* (*DIP1205* e *DIP1207*) (TROST et al., 2012).

O sistema OxyR, um dos principais reguladores responsivos às ERO bacterianas, foram primeiramente estudados em *E. coli*, mas homólogos dele são encontrados em várias espécies bacterianas. OxyR é um regulador transcricional tipo LysR, funcionando como um regulador global da resposta ao estresse ao H₂O₂ e também desempenhando um papel na resposta celular à depleção de tióis (ASLUND et al., 1999; DEMPLE, 1999; DUBBS; MONGKOLSUK, 2012; SCHELL, 1993). Homólogos de OxyR têm sido caracterizados em várias espécies bacterianas, porém o arranjo dos genes ao redor de *oxyR* é diferente em cada organismo. (Imlay, 2008).

A análise do modelo tridimensional da proteína OxyR de *C. diphtheriae* realizada neste estudo, demonstrou analogia estrutural com a proteína OxyR da cepa C199D de *P. aeruginosa*, a estrutura cristalina do regulador transcricional tipo LysR de *C. testosteroni*, com o domínio regulador do OxyR2 de *V. vulnificus*, o regulador transcricional da família LysR de *C. necator*, e com a estrutura cristalina de OxyR oxidada de *E. coli*.

A proteína tetramérica OxyR existe nas formas oxidada e reduzida em *E. coli*, mas apenas a forma oxidada ativa a transcrição. Assim, a oxidação direta de OxyR por H₂O₂, neste microrganismo é o principal mecanismo pelo qual as células detectam o estresse oxidativo e induzem o regulon OxyR (STORZ, 1999). Interessantemente, a proteína OxyR de

C. diphtheriae apresenta homologia com a forma oxidada, ou seja, forma ativa do regulon de *E. coli*.

O presente trabalho demonstrou que diferentemente do que ocorre com *E. coli* e *S. typhimurium* (FARR; KOGOMA; 1991), a interrupção do gene *oxyR* em *C. diphtheriae* levou a uma resistência 4 vezes maior ao H₂O₂. Em contrapartida, não afetou a susceptibilidade da cepa ao O₂⁻. Resultados similares também foram encontrados nos ensaios com *C. glutamicum* (TERAMOTO, 2013), *N. gonorrhoeae* (TSENG et al., 2003) e *Shigella flexneri* (DAUGHERTY; SUVARNAPUNYA; RUNYEN-JANECKY, 2012).

Uma vez que a cepa mutante apresentou um fenótipo de maior resistência ao H₂O₂ em relação à cepa selvagem, ensaios para avaliar os níveis transcricionais do gene *kataA*, para expressão da enzima catalase, foram realizados. Desta forma, foi possível observar que a cepa incapaz de expressar OxyR apresentou níveis transcricionais do gene *kataA* maior do que os da cepa selvagem. Esses resultados vieram ao encontro daqueles observados por Kim e colaboradores (2012) que demonstraram que OxyR em *C. diphtheriae* controla negativamente a expressão de catalase, independentemente da presença de H₂O₂. Da mesma forma, em *C. glutamicum* a interrupção do gene *oxyR* resultou em um aumento acentuado na transcrição do gene *kataA*, ainda maior do que o induzido por H₂O₂. Além disso, os autores observaram que a proteína OxyR ligava-se especificamente a todas as quatro regiões a montante dos respectivos genes de resposta às ERO, avaliados naquele estudo, sob condições redutoras. Porém, na forma oxidada, OxyR ligava não apenas às regiões promotoras-alvo, mas também fragmentos de DNA não específicos, sugerindo que a repressão transcricional por OxyR é aliviada sob condições de estresse oxidativo devido à diminuição da especificidade da sua ligação ao DNA (TERAMOTO, 2013). Este dados contrastam com o sistema regulador convencional dependente do OxyR observados em *P. aeruginosa* e *E. coli* (JO et al., 2015).

O ozônio é uma molécula potente e altamente reativa que pode rapidamente induzir danos celulares em bactérias e seres humanos pelo seu alto poder oxidante. Sua ação antibacteriana potente levou ao seu ressurgimento como desinfetante em ambientes industrial, médico e de alimentos. No presente estudo, foi avaliado o papel de OxyR na susceptibilidade das cepas de *C. diphtheriae* ao estresse causado por esse agente estressor. Apesar da redução do número de bactérias viáveis após exposição, a cepa mutante mostrou-se mais resistente ao ozônio comparada à cepa selvagem. Este resultado sugere que em *C. diphtheriae* a ausência do regulador transcricional OxyR favorece a resistência contra ação do ozônio. A menor sensibilidade ao ozônio pela cepa LDCIC-L2 pode ser, entre outros fatores, devido a regulação negativa da expressão de catalase pelo OxyR, levando a uma tolerância em função

da maior produção da enzima catalase, por esta cepa. Respostas microbianas como a elevação da atividade de catalase e de SOD foram demonstradas em *L. monocytogenes* e *E. coli* em resposta à exposição ao ozônio (FISHER et al., 2000; WHITESIDE; HASSAN, 1987). Estes resultados contrastam com os observados por Ondarza (2017), que mostrou que o *oxyR* não desempenhou papel na proteção de *Serratia marcescens* ao ozônio, já que a mutação no gene *oxyR* não influenciou na capacidade de sobrevivência deste microrganismo.

Conforme mencionado anteriormente, as bactérias desenvolveram vários mecanismos para lidar com o estresse e se adaptar às mudanças ambientais. Em resposta à redução rápida da temperatura, por exemplo, muitas bactérias produzem pequenas proteínas de choque frio. Durante o choque frio, a fluidez da membrana celular e a atividade enzimática diminuem. Com isto, a estabilização de estruturas secundárias de ácido nucleico é dificultada, o que afeta a eficiência da transcrição e da tradução. As proteínas de choque frio, as Csp, agem impedindo esta desestabilização, facilitando, assim, o início da tradução. No entanto, algumas Csp não são induzidas pelo frio e acredita-se que estejam envolvidas em vários processos celulares para promover respostas de adaptação ao crescimento e estresse (KETO-TIMONEM, 2016).

Wan-soon e colaboradores (2007), sugeriram que a CspA atue em funções relacionadas à fisiologia normal de *C. glutamicum*, bem como na adaptação ao choque frio, possivelmente atuando como um fator de iniciação da tradução alternativo e/ou como chaperona de RNA. Em *E. coli*, a CspA forma 1 % de todas as proteínas solúveis na fase inicial do crescimento exponencial a 37 °C, sugerindo que ela exerça funções também em temperatura ótima de crescimento (BRANDI et al., 1999). De forma semelhante, estudos demonstraram que uma quantidade mínima de Csp é necessária para o crescimento de *B. subtilis* (GRAUMANN et al., 1997). Além disso, em *L. monocytogenes*, a CspA contribui para a tolerância ao estresse oxidativo (LOEPFE et al., 2010).

O regulador transcricional OxyR atua regulando genes não somente relacionados à resposta ao estresse oxidativo, mas também genes relacionados a outras funções celulares. Para investigar a influência desse regulador e do choque frio na transcrição de genes que codificam as Csp em *C. diphtheriae*, as cepas selvagem e mutante foram cultivadas a 4 °C e a 37 °C. Houve transcrição de *cspA* por ambas as cepas, porém, não foi observada diferença nos níveis transcricionais da mesma quando as cepas foram cultivadas a 37 °C. No entanto, pode-se constatar que a transcrição de *cspA* foi maior quando a cepa mutante foi cultivada a 4 °C, sugerindo que a ausência de OxyR leva a uma maior necessidade de produção dessas

proteínas, para que estas auxiliem a célula bacteriana a adaptar-se aos efeitos danosos causados pelo choque frio.

O efeito de OxyR sobre a virulência parece não estar relacionado apenas à regulação dos genes de defesa ao estresse oxidativo, que permite aos patógenos escaparem da imunidade inata do hospedeiro, mas está associada, também, a processos clinicamente relevantes, como formação de biofilme, produção de toxinas e resistência antimicrobiana (JOHNSON et al., 2013; LAU et al., 2005; MELSTROM et al., 2007; SEIB et al., 2007; SHANKS et al., 2007; SRINIVASAN et al., 2013; SUND et al., 2008).

Dentre os sistemas de resposta às ERO, apenas o OxyR foi caracterizado funcionalmente em *C. diphtheriae* (KIM; HOLMES, 2012). Nesta oportunidade, o papel do OxyR na virulência de *C. diphtheriae* não foi esclarecido. Uma vez que células hospedeiras geram ERO como sistema de defesa contra patógenos invasores, torna-se claro que a capacidade de resistir ao estresse oxidativo, gera vantagem para manutenção desses microrganismos nesses ambientes (TERAMOTO et al., 2013). Além disso, o conhecimento a respeito da participação de OxyR, não só na resposta ao estresse oxidativo, mas também na virulência de várias espécies bacterianas, enfatiza a necessidade de estudos sobre a influência desse regulador na patogenicidade de *C. diphtheriae*.

A resistência antimicrobiana ameaça a prevenção e o tratamento efetivos de uma gama cada vez maior de infecções (OMS, 2018). Tem sido proposto que diferentes classes de antibióticos bactericidas, independentemente de suas interações fármaco-alvo, geram níveis variados de ERO que contribuem para a morte celular (BECERRA; ALBESA, 2002; DWYER et al., 2007; 2014; KOHANSKI et al., 2007). O papel do OxyR na resistência antimicrobiana tem sido descrito em diferentes espécies bacterianas. Em *K. pneumoniae*, por exemplo, a deleção de OxyR tornou as células sensíveis à amoxicilina, cloranfenicol, eritromicina, ácido nalidíxico, rifampicina e trimetoprima (SRINIVASAN et al., 2013). Em *Burkholderia cepacia* e *P. aeruginosa*, o OxyR contribuiu para a resistência a isotiazolona e aminoglicosídeos, respectivamente (WANG et al., 2012; ZHOU et al., 2014). No entanto, os resultados obtidos sugerem que o OxyR não está envolvido na resposta de *C. diphtheriae* aos antimicrobianos.

Biofilmes são comunidades complexas de microrganismos que aderem e crescem em superfícies bióticas e abióticas em diversos tipos de ambientes. Essas estruturas apresentam papel chave na proteção de bactérias patogênicas contra defesas do hospedeiro (KIM et al., 2006). Cepas de *C. diphtheriae* são capazes de aderir com intensidades variadas às superfícies abióticas do vidro e do poliestireno. Participam destes processos, interações físico-químicas,

como carga e hidrofobicidade, e interações moleculares específicas, por meio de adesinas fimbriais e não-fimbriais (ANTUNES et al., 2015; GOMES et al., 2009; MATTOS-GUARALDI; FORMIGA, 2001; SABBADINI et al., 2010). É sabido que a formação de biofilme é influenciada por fatores genéticos e ambientais e que estas estruturas constituem uma eficiente estratégia de sobrevivência bacteriana frente às condições hostis do ambiente, incluindo a presença de agentes oxidantes. Nestas condições, há a expressão diferenciada de muitos genes, particularmente aqueles envolvidos na resistência ao estresse oxidativo, na produção do exopolissacarídeo e no metabolismo bacteriano. O grupo de genes e, conseqüentemente, a transcrição de proteínas envolvidas na defesa contra o estresse oxidativo em biofilmes é diferente daquelas em células planctônicas. Tais genes são requeridos para proteger as células bacterianas dos danos causados pelas ERO durante o metabolismo celular dentro do biofilme (ELKINS et al., 1999; KIM et al., 2006). A regulação da formação de biofilme induzida pelo estresse oxidativo no hospedeiro pode fornecer estratégias de defesa às células bacterianas (HONMA et al, 2009).

Diversos estudos demonstraram o envolvimento do regulador OxyR no desenvolvimento de biofilme em diversos microrganismos. Em *E. coli*, por exemplo, a ativação de OxyR promove a formação de biofilme induzindo a expressão da adesina o Ag43 (DANESE et al., 2000). De forma semelhante, em *S. marcescens*, a formação de biofilme é drasticamente prejudicada pela interrupção do gene *oxyR* (SHANKS et al., 2007). Em contrapartida, em *B. pseudomallei*, OxyR regula negativamente a formação de biofilme. No presente estudo, observamos que a cepa selvagem não foi capaz de aderir à superfície do vidro, como já é conhecido para esta cepa, por ser uma amostra mais hidrofóbica e que, a interrupção do gene *oxyR*, não modificou esta característica. Por outro lado, esta cepa adere de forma moderada ao poliestireno, e esse perfil também não foi alterado pela incapacidade de expressar o OxyR pela cepa mutante, sugerindo que este regulador não participa diretamente do processo de formação de biofilme por esta cepa de *C. diphtheriae*.

A influência do ferro na formação de biofilme também foi investigada neste estudo. O ferro é um cofator essencial para proteínas envolvidas em inúmeras funções celulares importantes, como a respiração e a síntese de DNA. A limitação do ferro é uma estratégia comum dos hospedeiros mamíferos para suprimir o crescimento bacteriano. Logo, sistemas envolvidos na aquisição deste íon são reconhecidos como fatores de virulência bacteriana (GRIFFITHS, 1991). O regulador OxyR de *E. coli* está envolvido na regulação do gene *fur* (*ferric uptake regulator*) atuando na repressão do transporte de ferro (DUBBS; MONGKOLSUKA, 2012). No presente trabalho, não foi observado aumento ou redução na

formação de biofilme pela cepa mutante na ausência de ferro, quando comparada à cepa selvagem. Porém, foi observado que ambas as cepas apresentaram filamentação na ausência de ferro. A filamentação bacteriana pode ser induzida em resposta à ativação do sistema SOS por compostos que levam a danos no DNA ou afetam sua replicação (Walker 1985). A presença de filamentação celular em resposta as ERO foi verificada em *C. diphtheriae* através de estudos que avaliaram a resposta de *C. diphtheriae* ao cloreto de estânio (SnCl_2), um gerador de radical hidroxila ($\text{OH}\cdot$). Foi demonstrado que, além de aumentar os níveis de aderência às superfícies de vidro e poliestireno, este agente foi capaz de causar danos ao DNA e induzir a filamentação celular (SOUZA et al., 2003). A filamentação das cepas de *C. diphtheriae* observada neste estudo sugere que a presença do quelante pode acarretar danos no DNA bacteriano assim como a ativação do sistema SOS. Estudos adicionais são necessários para avaliar esse evento.

Além disso, a análise de microscopia realizada para investigar a natureza bioquímica do biofilme revelou que a matriz extracelular formada por ambas as cepas apresenta um grande conteúdo proteico. Dessa forma, pode-se verificar que o regulador OxyR e o ferro não influenciam na produção de biofilme, nem na natureza química da matriz exopolimérica formada por *C. diphtheriae*.

Estudos realizados previamente demonstraram que as proteínas OxyR de *K. pneumoniae* e *E. coli* contribuem positivamente para a colonização dos tratos intestinal e urinário, respectivamente (HENNEQUIN; FORESTIER, 2009; JOHNSON et al., 2006). A colonização e a disseminação tecidual no hospedeiro dependem da habilidade do patógeno de aderir às células do hospedeiro, bem como de interagir com proteínas plasmáticas e com constituintes da matriz extracelular (OFEK, 1980; SIMPSON-LOUREDO et al., 2014). As habilidades de induzir a internalização e de sobreviver no interior de células eucarióticas podem também contribuir nestes processos (ANTUNES et al., 2015; HIRATA JR et al., 2004).

O fibrinogênio é uma importante proteína do plasma humano que tem sua síntese positivamente regulada durante a inflamação ou em condições de estresse, tais como infecções sistêmicas. O fibrinogênio está envolvido principalmente no sistema de cascata da coagulação através da sua conversão em fibrina insolúvel. Tanto o fibrinogênio quanto a fibrina atuam na coagulação sanguínea, na fibrinólise, na resposta inflamatória, na interação matriz-célula e na cicatrização de ferida. Muitos patógenos bacterianos exploram mecanismos envolvidos no sistema de coagulação para colonizar proteínas de matriz tecidual expostas ou driblar mecanismos de depuração bacteriana pela resposta imune (DOOLITTLE, 1984,

SABBADINI et al., 2010). A presença de fibrinogênio na superfície bacteriana pode ser estratégia eficiente para evitar fagocitose em hospedeiros humanos, como descrito anteriormente para patógenos Gram-positivos (SABBADINI et al., 2010; SCHUBERT et al., 2002; SIMPSON-LOUREDO et al., 2014). Sabbadini e colaboradores (2010), sugeriram que a conversão de fibrinogênio a fibrina possa também desempenhar um papel na formação da pseudomembrana, observada no quadro de difteria clássica, atuando como determinante de virulência em cepas produtoras e não produtoras de TD em *C. diphtheriae*.

A fibronectina (Fn) é uma glicoproteína complexa encontrada na forma solúvel em fluidos corporais (sangue, saliva) e na forma insolúvel como componente das superfícies celulares, membranas basais e matriz extracelulares. A Fn plasmática solúvel interage com várias bactérias e superfícies celulares. Dessa forma, pode servir como um receptor na aderência das bactérias as células epiteliais do hospedeiro desempenhando um papel importante no tropismo tecidual (LIVORNESE; KORZENIOWSKI, 1992; SABADINE et al. 2010; SIMPSON-LOUREDO et al, 2014). O Colágeno tipo I é a forma mais prevalente de vários tipos distintos de colágeno observado nas paredes arteriais, osso, dentina, derme, tendão e parede uterina. Todos os tipos de colágeno estão envolvidos na ligação à Fn em intensidades diferentes (SIMPSON-LOUREIRO et al, 2014 apud ENGVALL et al., 1978). A capacidade de ligação a essas proteínas foi demonstrada para *C. ulcerans* e *C. diphtheriae* em intensidades variáveis (ANTUNES et al 2015; SABADINE et al 2010; SIMPSON-LOUREDO et al, 2014).

Sabendo da relevância da interação de *C. diphtheriae* com proteínas de matriz na virulência deste microrganismo, e que a síntese de fibrinogênio é aumentada sob condições de estresse, foi investigado no presente trabalho a influência do OxyR na interação com fibronectina, colágeno Tipo 1 e fibrinogênio. Foi observado que a cepa selvagem foi capaz de ligar-se a todas as proteínas, sendo que com maior intensidade à fibronectina, seguida do colágeno e fibrinogênio, respectivamente. A interrupção do gene *oxyR* resultou numa importante redução na ligação da cepa mutante a todas as proteínas testadas quando comparadas à cepa selvagem, sugerindo, portanto, que OxyR exerça um papel na regulação de genes responsáveis pela interação de *C. diphtheriae* com essas proteínas.

A capacidade de *C. diphtheriae* aderir a uma variedade de células epiteliais, incluindo hemácias, células endoteliais e células fagocíticas, já foi descrita em muitos estudos. Além disto, a capacidade de internalizar e sobreviver no interior dessas células também foi demonstrada (ANTUNES et al., 2015; HIRATA JR et al., 2002; 2004; KOSTYUKOVA E PEREVERZEV, 1985; MATTOS-GUARALDI; FORMIGA, 1991; SABBADINI et al., 2012;

SANTOS et al., 2015). A internalização e sobrevivência dentro de células hospedeiras contribui para a evasão da resposta imune bem como proteção contra ação de antibióticos extracelulares com consequente manutenção e disseminação de *C. diphtheriae* para tecidos mais profundos (ANTUNES et al., 2015).

Os dados obtidos nesse trabalho demonstraram que, apesar de OxyR estar envolvido na habilidade de *C. diphtheriae* de interagir com proteínas de matriz extracelular e plasmáticas, esse regulador não exerce papel na aderência às células epiteliais respiratórias. Porém, a interrupção do gene *oxyR* favoreceu a sobrevivência no interior de células epiteliais respiratórias e fagocíticas. Apesar de outras ERO serem geradas no interior dessas células como resposta à infecção, a maior resistência dessa cepa à toxicidade causada pelo H₂O₂, pode explicar parcialmente esse processo.

As células fagocitárias ativadas formam a maioria das ERO e das ERN produzidas durante a resposta inflamatória. Entretanto, células epiteliais respiratórias e endoteliais também contribuem para a geração local de estresse oxidativo em um ambiente inflamatório (CRAIG & SLAUCH, 2009; GRIENGLING et al., 2000). Uma vez que não existem estudos demonstrando o papel do regulador OxyR na resposta celular à infecção por *C. diphtheriae*, a produção de ERO e ERN, por células epiteliais respiratórias, foi abordada neste trabalho. Os dados gerados mostraram que tanto pneumócitos quanto as células epiteliais de faringe aumentaram a produção de ERO e ERN em relação às células controle, não infectadas, demonstrando que a infecção por esse microrganismo leva a um desbalanço na homeostasia com a formação de espécies reativas, gerando um condição de estresse oxidativo e nitrosativo. Através de sondas específicas, uma maior produção de NO pelas células infectadas com a cepa mutante (HEp-2 após 3h e A549 após 30 minutos) foi detectada, sugerindo que o regulador transcricional *oxyR* está envolvido na modulação da resposta celular eucariótica à infecção por *C. diphtheriae*.

O NO tem sido descrito por vários autores como uma das mais importantes moléculas de defesa contra agentes infecciosos (GRAYFER et al., 2013; RENIERE et al., 2018). Nas infecções, células ativadas como macrófagos, neutrófilos e células endoteliais secretam simultaneamente NO e intermediários reativos do oxigênio, e a ação citotóxica indireta do NO consiste, principalmente, na sua reação com esses intermediários do oxigênio. Uma ação tóxica cooperativa de NO e O₂⁻ resulta na formação de peroxinitrito (ONOO⁻), um poderoso oxidante de proteínas (BECKMAN; KOPPENOL, 1996; RENIERE et al., 2018). A maior produção de NO por células infectadas pela cepa mutante de *C. diphtheriae* pode resultar da superexpressão de iNOS (Óxido nítrico sintase induzida). A iNOS não é expressa

constitutivamente, sendo induzida por lipopolissacarídeos bacterianos e através de citocinas. Estudos adicionais serão necessários para avaliar o papel do regulador OxyR na produção aumentada de NO pelas células infectadas por *C. diphtheriae*, contudo é sabido que este regulador exerce um papel na resposta ao estresse nitrosativo em *M. tuberculosis* (GRAYFER et al., 2013).

Caenorhabditis elegans é um nematodeo que é encontrado em todo o mundo, predominantemente em áreas de clima temperado úmido, vivendo no solo, em pilhas de compostagem e em frutas podres. Nesses ambientes, os nematódeos interagem com diversos microrganismos, alguns dos quais são patogênicos. Além disso, múltiplos micróbios, incluindo patógenos humanos, podem causar infecções em *C. elegans* que resultam em morte (ENGELMANN; PUJOL, 2010; MARSH; MAY, 2012).

C. elegans tem sido amplamente utilizado para estudar vários aspectos da biologia dos vertebrados, incluindo transdução de sinal, desenvolvimento neuronal, respostas, senescência e imunidade inata e para o estudo da virulência bacteriana. Oferece muitas vantagens tais como, fácil cultivo e manutenção, fácil manipulação, possui vasta pesquisas genética e biblioteca de mutantes, que permite investigar a resposta do hospedeiro em combinação com as propriedades de virulência bacteriana (MAHAJAN-MIKLOS et al., 1999; OTT et al., 2012). Ott e colaboradores (2012), demonstraram a aplicação de *C. elegans* como um modelo de infecção para corinebactérias patogênicas. Nessa oportunidade, *C. elegans* foi usado como um sistema modelo para entender as diferenças na virulência entre espécies de *C. glutamicum*, *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* e *C. pseudotuberculosis*. Os autores sugeriram que diferentes propriedades e mecanismos de virulência usados pelas corinebactérias refletem a localização bacteriana e a cinética de morte dos experimentos. *C. elegans* normalmente põe ovos que eclodem fora do corpo parental. No entanto, os óvulos também podem ser retidos e eclodidos dentro do corpo parental, um processo denominado *worm bagging*, que ocorre em função de modulação gênica (MOSSER; MATIV; LEROY, 2011; RIDDLE et al., 1997; WAGGONE et al., 1998). A indução da formação do *worm bagging*, ocorre como uma resposta adaptativa do verme, em consequência a algum tipo de estresse, como por exemplo exposição a bactérias patogênicas. A retenção da progênie pode fornecer alimento suficiente, em ambiente de privação de nutriente, além de proteção física e transporte para larvas pequenas, que poderiam ser liberadas em ambientes mais favoráveis (MOSSER; MATIV; LEROY, 2011).

Uma das consequências da colonização da superfície de *C. elegans* por bactérias patogênicas é a formação de *star* (agregados de vermes fortemente ligados pela calda (ANTUNES et al, 2016). Os vermes grudados não se soltam e morrem após 24 h e sua

carcaça serve como fonte de nutriente para o crescimento bacteriano. Antunes e colaboradores (2016), demonstraram a capacidade de formação de *star* por cepas patogênicas (*C. diphtheriae*, *C. ulcerans*) e não patogênicas (*C. glutamicum*) de corinebactérias e sugeriram que ao invés de fatores de virulência específicos, propriedades distintas, porém gerais dos membros deste gênero, podem ser responsáveis por esse fenômeno.

C. elegans tem a capacidade de montar uma proteção contra a resposta oxidativa após infecção por patógenos, como observado em *E. faecalis* (CHÁVES et al; 2009). Sem e colaboradores (2012), sugeriram que o aumento de ERO atua como evento chave na patogênese da infecção por *S. typhimurium* e que esta bactéria leva a morte do nematodo pela indução de uma resposta oxidativa disseminada, verme dependente, da atividade TrxA, uma proteína chaperona independentemente de sua atividade redox.

No presente trabalho, foi investigada a influência de OxyR na colonização e morte de *C. elegans* por *C. diphtheriae*. Nossos resultados em relação à cepa selvagem corroboram com estudos realizados por Antunes e colaboradores (2015), que demonstraram que a cepa CDCE-8392 de *C. diphtheriae* é capaz de induzir a morte de *C. elegans* e que esses microrganismos foram capazes de colonizar e proliferar dentro dos vermes, uma vez que foi evidenciada sua localização por toda extensão do intestino do nematodeo. A interrupção do gene *oxyR* parece não influenciar na capacidade de colonização, localização e morte do verme. A formação de *star* foi observada em ambas as cepas. No entanto, a indução do efeito *bagging*, apesar de ter sido observado nas cepas selvagem e mutante, foi mais evidente nesta última. Uma vez que não foi constatada alteração na viabilidade de *C. elegans* após interação com as cepas analisadas, podemos sugerir que o OxyR não está envolvido diretamente na patogenicidade de *C. diphtheriae*, neste modelo *in vivo*. Antunes e colaboradores (2016) sugeriram que componentes do envelope celular possam estar envolvidos na formação de *star*.

Independente da capacidade de produção de toxina diftérica (TD), foram descritos diversos casos de artrite relacionados com *C. diphtheriae* (BARAKETT et al., 1993; CEILIEY, 1977; DAMADE et al., 1993; FARAJ et al., 2003; GURAN et al., 1979; MORREY et al., 1977; ORDÓÑEZ-PALAU et al., 2007). A habilidade de cepas de *C. diphtheriae* induzirem artrite por via hematogênica foi demonstrada utilizando modelo *in vivo* em camundongos. Dias e colaboradores (2011) demonstraram que esse processo foi específico para cada cepa e que a TD não interferiu no processo. No presente trabalho, foi avaliada a capacidade da cepa CDCE-8392 de causar artrite em camundongos. Além disso, foi investigada a influência de OxyR nesse processo.

Sinais clínicos de artrite não foram observados para ambas as cepas. Análises histológicas das articulações dos membros posteriores de camundongos demonstraram que camundongos infectados com a cepa LDCIC-L2 apresentaram um processo inflamatório local mais evidente quando comparado à cepa selvagem, sugerindo que o OxyR leva a uma menor agressividade dessas cepas, que pode ser explicado por uma resistência aumentada da cepa mutante ao peróxido.

CONCLUSÕES

A difteria e infecções invasivas causadas por *C. diphtheriae* continuam a ocorrer em diversas partes do mundo. Para o melhor entendimento a respeito dos processos de interação patógeno-hospedeiro, é necessária a busca contínua por determinantes de virulência e de resistência desse microrganismo. Nesse trabalho, o papel do regulador transcricional OxyR nos atributos de virulência e resistência de *C. diphtheriae* foi investigado. Dessa forma, pode-se concluir que:

- a) A sequência proteica e a estrutura tridimensional da proteína CDCE8392_1399 (OxyR) apresentaram analogia com as de proteínas ligadas à regulação transcricional da família LysR, incluindo OxyR, em outras espécies bacterianas, reiterando a sua função como um regulador transcricional;
- b) o regulador OxyR, não exerce influência nos mecanismos de resistência a antimicrobianos em *C. diphtheriae*;
- c) a ausência de OxyR aumenta a expressão de catalase e conseqüentemente, a resistência de *C. diphtheriae* ao peróxido de hidrogênio, confirmando que esta proteína regula negativamente a expressão de catalase neste microrganismo
- d) o regulador OxyR, por si só, aparentemente, não interfere na regulação da produção de enzimas antioxidantes em resposta ao ânion superóxido;
- e) a sensibilidade reduzida de *C. diphtheriae* a concentrações antimicrobianas de ozônio, na ausência do OxyR, reitera que esse regulador, nessa espécie, não exerce uma função específica de resposta ao estresse oxidativo;
- f) a expressão de *cspA* em *C. diphtheriae* aparentemente não é induzida apenas em resposta ao choque frio, porém, o regulador OxyR parece interferir na expressão de *cspA* neste ambiente;

- g) o regulador OxyR na presença ou ausência de ferro não está envolvido na capacidade de formação do biofilme produzido por *C. diphtheriae*, tampouco na natureza bioquímica deste.
- h) OxyR desempenha importante papel na aderência às proteínas de matriz extracelular e plasmáticas, sugerindo que esse regulador auxilie, entre outros fatores, nos processos de evasão da resposta imune e interação com matriz extracelular;
- i) apesar de OxyR não influenciar na aderência às células epiteliais respiratórias e macrófagos humanos, a regulação negativa da expressão de catalase por este regulador, acarreta uma menor viabilidade de *C. diphtheriae* no interior destas células, possivelmente, devido a redução da resistência às ERO geradas em decorrência da infecção por esse microrganismo;
- j) a infecção por *C. diphtheriae* induz a produção de ERO e ERN pelas células epiteliais respiratórias, evidenciando um quadro de estresse oxidativo e nitrosativo;
- k) o regulador transcricional OxyR aparentemente está envolvido na modulação da resposta nitrosativa da célula eucariótica à infecção por *C. diphtheriae*, mas não na resposta oxidativa;
- l) OxyR parece não estar envolvido na patogenicidade de *C. diphtheriae* no nematodo *C. elegans*;
- m) a cepa CDCE-8392 não foi capaz de induzir às lesões características de artrite, porém, sinais histológicos de inflamação mais evidentes, causados pela cepa mutante, sugerem que, a regulação negativa da expressão de catalase por OxyR e a maior resistência da cepa mutante a agentes oxidantes resultaram numa maior capacidade de estimular um processo inflamatório local;
- n) os efeitos do sistema OxyR sobre a virulência de *C. diphtheriae* parecem, não estar exclusivamente relacionados com a regulação de genes de resistência ao estresse, mas também a outros processos clinicamente relevantes que permitem a este patógeno permanecer nos tecidos do hospedeiro, independentemente das respostas inflamatória e celular do sistema imune;

REFERÊNCIAS

- ALATOOM, A. A.; CAZANAVE, C. J.; CUNNINGHAM, S. A.; IHDE, S. M.; PATEL, R. **Identification of non-diphtheriae *Corynebacterium* by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry.** *J Clin. Microbiol.*, v. 50, p. 160–163, 2012.
- AMON, J.; LÜDKE, A.; TITGEMEYER, F.; BURKOVSKI, A. General and regulatory proteolysis in corynebacteria. In *Corynebacteria: genomics and molecular biology*, pp. 295-311. Edited by A. Burkovski. Norfolk, UK: Caister Academic Press. 2008.
- ANANTHARAMAN, V.; ARAVIND, L. **Evolutionary history, structural features and biochemical diversity of the NlpC/P60 superfamily of enzymes.** *Genome Biol*, V. 4, P. 11, 2003.
- ANTELMANN, H.; HELMANN, J. D. **Thiol-based redox switches and gene regulation.** *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 14, n. 6, p. 1049-1063, 2011.
- ANTUNES, C. A.; CLARK, L.; WANUSKE, M. T.; HACKER, E.; OTT, L.; SIMPSON-LOUREDO, L.; LUNA, M. G.; HIRATA Jr, R.; MATTOS-GUARALDI, A. L.; HODGKIN, J.; BURKOSVSKI, A. ***Caenorhabditis elegans* star formation and negative chemotaxis induced by infection with corynebacteria.** *Microbiol.*, v. 162, p. 84-93, 2016.
- ANTUNES, C. A.; SANTOS, L. S.; HACKER, E.; KÖHLER, S.; BÖSL, K.; OTT, L.; De LUNA, M. D.; HIRATA Jr, R.; AZEVEDO, V. A.; MATTOS-GUARALDI, A. L.; BURKOVSKI, A. **Characterization of DIP0733, a multi-functional virulence factor of *Corynebacterium diphtheriae*.** *Microbiol.*, v. 161, p. 639-647, 2015.
- ASAD, N. R.; LEITÃO, A. C. **Effects of metal ion chelators on DNA strand breaks and inactivation produced by hydrogen peroxide in *Escherichia coli*: detection of iron-independent lesions.** *J. Bacteriol.*, v.173, n. 8, p. 2562-2568, 1991.
- ASAD, N. R.; ASAD, L. M.; SILVA, A. B.; FELZENSZWALB, I.; LEITÃO A. C. **Hydrogen peroxide effects in *Escherichia coli* cells.** *Ann. Biochem.*, v. 45, n. 3, p. 677-690, 1998.
- ASLUND, F.; ZHENG, M.; BECKWITH, J.; STORZ, G. **Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol-disulfide status.** *Proc Natl Acad. Sci. U. S. A.*, v. 96, n. 11, p. 6161-6165, 1999.
- ATSHAN, S. S.; SHAMSUDIN, M. N.; LUNG, L.T. T; LING, K. H.; SEKAWI, Z.; PEI, C. P.; GHAZNAVI-RAD, E. **Improved method for the isolation of RNA from bacteria refractory to disruption, including *S. aureus* producing biofilm.** *Gene*, v. 494, n. 2, p. 219-224, 2012.
- BARAKETT, V.; MOREL, G.; LESAGE, D.; E PETIT, J. C. **Septic arthritis due to a nontoxigenic strain of *Corynebacterium diphtheriae* subspecies *mitis*.** *Clin Infect Dis.*, v. 17, p. 520-521, 1993.

BECERRA, M. C.; ALBESA, I. **Oxidative stress induced by ciprofloxacin in *Staphylococcus aureus***. *Biochem Biophys Res Commun.*, v. 297, p. 1003–1007, 2002.

BELMARES, J.; DETTERLINE, S.; PAK, J. B.; PARADA, J. P. ***Corynebacterium endocarditis* species-specific risk factors and outcomes**. *BMC Infect Dis.*, v. 7, n. 4, p. 1-8, 2007.

BERTUCCINI, L.; BALDASSARRI, L.; von HUNOLSTEIN, C. **Internalization of non-toxicogenic *Corynebacterium diphtheriae* by cultured human respiratory epithelial cells**. *Microb. Pathog.*, v. 37, p. 111-118, 2004.

BESA, N. C.; COLDIRON, M. E.; BAKRI, A.; RAJI, A.; NSUAMI, M. J.; ROUSSEAU, C.; HURTADO, N.; PORTEN, K. **Diphtheria outbreak with high mortality in northeastern Nigeria**. *Epidemiol Infect.*, v.142, n. 4, p. 797-802, 2014.

BOVERIS, B.; CHANCE, . **The mitochondrial generation of hydrogen peroxide**. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.*, v. 134, n. 3, p. 707-716, 1973.

BRANDI, A.; SPURIO, R.; GUALERZI, C.O.; PON, C.L. **Massive presence of the *Escherichia coli* “major cold-shock protein” CspA under non-stress conditions**. *EMBO J.*, v. 18, p. 1653-1659, 1999.

BROADWAY, M.M.; ROGERS, E. A.; CHANG, C.; HUANG, I. H.; DWIVEDI, P.; YILDIRIM, S.; SCHMITT, M. P.; DAS, A.; TON-THAT, H. **Pilus gene pool variation and the virulence of *Corynebacterium diphtheriae* clinical isolates during infection of a nematode**. *J. Bacteriol.*, v. 195, p. 3774-3783, 2013.

BURKOVSKI, A. **Diphtheria and its etiological agents**. In *Corynebacterium diphtheriae* and related toxigenic species, 1-14. Edited by Burkovski. Dordrecht: Springer. 2013.

CALDÉRON, I. L.; ARENAS, F. A.; PÉREZ, J. M.; FUENTES, D. E.; ARAYA, M. A.; SAAVEDRA, C. P.; TANTALÉAN, J. C.; PICHUANTES, S. E.; YOUNDERIAN, P. A.; VÁSQUEZ, C. C. **Catalases are NADPH-dependent tellurite reductases**. *Plos.*, v.1, n.1, p. e70, 2006.

CEILIEY, R. I. **Foot ulceration and vertebral osteomyelitis with *Corynebacterium haemolyticum***. *Arch Dermatol.*, v. 113, p. 646-647, 1997.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Health Information for International Travel**. Atlanta: U.S. 2017.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Travelers' Health - Yellow Book - Prevention of Specific Infectious Diseases – Diphtheria**. Disponível no site: <<http://wwwn.cdc.gov/travel/yellowBookCh4-Diphtheria.aspx>>. Acessado em 29 de dezembro de 2015.

CERDEÑO-TÁRRAGA, A. M.; EFSTRATIOU, A.; DOVER, L. G.; HOLDEN, M. T. G.; PALLEN, M.; BENTLEY, S. D.; BESRA, G. S.; CHURCHER, C.; JAMES, K. D.; DE ZOYSA, A.; CHILLINGWORTH, T.; CRONIN, A.; DOWD, L.; FELTWELL, T.; HAMLIN, N.; HOLROYD, S.; JAGELS, K.; MOULE, S.; QUAIL, M.A.; RABBINOWITSCH, E.; RUTHERFORD, K.M.; THOMSON, N. R.; UNWIN, L.; WHITEHEAD, S.; BARRELL, B. G.; PARKHILL, J. **The complete genome sequence and analysis of *Corynebacterium diphtheria* NCTC13129.** *Nucleic Acids Res.*, v. 31, p. 6516– 6523, 2003.

CHAVES, V.; MOHRI-SHIOMI, A.; GARSIN, D. **Ce-Doux1/BL1-3 generates reactive oxygens species as a protective innate immune mechanism in *Caenorhabditis elegans*.** *Infect Immun.*, p. 4983-4989, 2009.

CLARRIDGE, J. E.; SPRIGEL, C. A. ***Corynebacterium* and miscellaneous irregular Gram-positive rods, *Erysipelothrix* and *Gardnerella*.** In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds). *Manual of Clinical Microbiology*, Washington DC: American Society for Microbiology Press. 357-373. 1995.

CLINTON, L. K.; BANKOWSKI, M. J.; SHIMASAKI, T.; SAE-OW, W.; WHELEN, A. C.; O'CONNOR, N.; KIM, W.; YOUNG, R. **Culture-negative prosthetic valve endocarditis with concomitant septicemia due to a nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae* biotype *gravis* isolate in a patient with multiple risk factors.** *J. Clin. Microbiol.*, v. 51, p. 3900–3902, 2013.

CLSI. Performance for Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. CLSI document M100-S-23. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standard Institute; 2017.

COLOMBO, A.V.; HIRATA Jr., R.; ROCHA-DE-SOUZA, C. M.; MONTEIRO-LEAL, L. H.; PREVIATO, J. O.; FORMIGA, L. C. D.; ANDRADE, A. F. B.; MATTOS-GUARALDI, A. L. ***Corynebacterium diphtheriae* surface protein as adhesion to human erythrocytes.** *FEMS Microbiol Lett.*, v. 197, p. 235-239, 2001.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. **Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections.** *Sci.*, v. 284, n. 5418, p. 1318-1322, 1999.

CRAIG, M.; SLAUCH, J. M. **Phagocytic superoxide specifically damages an extracytoplasmatic target to inhibit or kill *Salmonella*.** *Plos.*, v. 4, n. 3, p. e4975, 2009.

CUNHA, L. G.; FERREIRA, M. F.; De MORAES, J. A.; REIS, P. A.; CASTRO-FARIANETO, H. C.; BARJA-FIDSALGO, C.; PLOTKOWISKI, M. C.; SALIBA, A. M. **ExoU – induced redox imbalance and oxidative stress in airway epithelial cells during *Pseudomonas aeruginosa* pneumosepsis.** *Med. Microbiol Immunol*, v. 204, n. 6, p. 673-680, 2015.

CZAPSKI, T. R.; TRUN, N. **Expression of *csp* gene in *E. coli* K-12 in defined rich and defined minimal media during normal growth, and after cold-shock.** *Gene*, v. 547, p. 91–97, 2014.

D'AFONSECA, V.; SOARES, S. C.; ALI, A.; SANTOS, A. R.; PINTO, A. C.; MAGALHÃES, A. A. C.; FARIA, C. J.; BARBOSA, E.; GUIMARÃES, L. C.; ESLABÃO, M.; ALMEIDA, S. S.; ABREU, V. A. C.; ZERLOTINI, A.; CARNEIRO, A. R.; CERDEIRA, L. T.; RAMOS, R. T. J.; HIRATA Jr, R.; MATTOS-GUARALDI, A. L.; TROST, E.; TAUCH, A.; SILVA, A.; SCHNEIDER, M. P.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. **Reannotation of the *Corynebacterium diphtheriae* NCTC13129 genome as a new approach to studying gene targets connected to virulence and pathogenicity in diphtheria.** *Bioinformatics*, v. 1, n. 3, p. 1-13, 2011.

DAMADE, R.; POUCHOT, J.; DELACROIX, I.; BOUSSOUGANT, Y.; VINCENEUX, P. **Septic arthritis due to *Corynebacterium diphtheriae*.** *Clin Infect Dis.*, v. 16, p. 446- 447, 1993.

DAMASCO, P. V.; PIMENTA, F. P.; FILARDY, A. A.; BRITO, S. M.; ANDRADE, A. F.; LOPES, G. S.; HIRATA Jr, R.; MATTOS-GUARALDI, A. L. **Prevalence of IgG diphtheria antitoxin in blood donors in Rio de Janeiro.** *Epidemiol & infect.*, v. 33, p. 911-914, 2005.

DANESE, P. N.; PRATT, L. A., DOVE, S.; KOLTER, R. **The outer membrane protein, antigen 43, mediates cell-to-cell interactions within *Escherichia coli* biofilms.** *Mol. Microbiol.*, v. 37, p. 424-432, 2000.

DAUGHERTY, A.; SUVARNAPUNYA, A. E.; RUNYEN-JANECKY, L. **The role of oxyR and soxRS in oxidative stress survival in *Shigella flexneri*.** *Microbiol. Res.*, v. 167, p. 238-245, 2012.

De SOUSA-D'AURIA, C.; KACEM, R.; PUECH, V.; TROPIS, M.; LEBLON, G.; HOUSSIN, C.; DAFPE, M. **New insights into the biogenesis of the cell envelope of corynebacteria: identification and functional characterization of five new mycoloyltransferase genes in *Corynebacterium glutamicum*.** *FEMS microbial. Let.s*, v. 224, p. 35-44, 2003.

De ZOYSA, A.; EFSTRATIOU, A.; HAWKEY, P. M. **Molecular characterization of diphtheria toxin repressor (dtxR) genes present in nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains isolated in the United Kingdom.** *J Clin Microbiol.*, v. 43, n. 1, p. 223-228, 2005.

DERMAN, Y.; SÖDERHOLM, H.; LINDSTRÖM, M.; KORKEALA, H. **Role of csp genes in NaCl, pH, and ethanol stress response and motility in *Clostridium botulinum* ATCC3502.** *Food Microbiol.*, v. 46, p. 463–470, 2015.

DIAS, A. A.; SILVA JR, F. C.; SANTOS, L. S.; RIBEIRO-CARVALHO, M. M.; SABBADINI, P. S.; SANTOS, C. S.; FILARDY, A. A.; MYIOSHI, A.; AZEVEDO, V. A.; HIRATA Jr, R.; VILLAS-BOAS, M. H.; MATTOS-GUARALDI, A. L. **Strain-dependent arthritogenic potential of the zoonotic pathogen *Corynebacterium ulcerans*.** *Veterinary Microbiol.*, v. 5354, p. 1-9, 2011.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. **Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms.** *Clin.Microbiol.Rev.*, v. 15, n.2, p. 167-193, 2002.

DOOLITTLE, R. S. **Fibrinogen and Fibrin**. *Ann. Rev. Biochem.* v. 53, p. 195-229, 1984.

DORELLA, F. A.; ESTEVAM, E. M.; PACHECO, L. G. C.; GUIMARÃES, C. T.; LANA, U. G. P.; GOMES, E. A.; BARSANTE, M. M.; OLIVEIRA, S. C.; MEYER, R.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. **In Vivo insertional mutagenesis in *Corynebacterium pseudotuberculosis*: an efficient means to identify DNA sequences encoding exported proteins**. *Appl and Environm Microbiol*, v. 72, n. 11, p. 7368-7372, 2006.

DRAPER, R. K.; SIMON, M. I. **The entry of diphtheria toxin into the mammalian cell cytoplasm: evidence for lysosomal involvement**. *J. Cell Biol.*, v. 87, p. 849-854, 1980.

DROGE, W. **Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function**. *Physiol Rev.*, v. 82, p. 47-95, 2002.

DUBBS, J. M.; MONGKOLSUK, S. **Peroxide-sensing transcriptional regulators in bacteria**. *J. Bacteriol.*, v. 194, p. 5495-5503, 2012.

DURVAL, B. D.; MATHEW, A.; SATOLA, S.W.; SHAFER, W. M. **Altered growth, pigmentation, and antimicrobial susceptibility properties of *Staphylococcus aureus* due to loss of the major cold shock gene *csp B***. *Antimicrob. Agents Chemother.* v. 54, p. 2283-2290, 2010.

DWYER, D. J.; BELENKY, P. A.; YANG, J. H.; MACDONALD, I. C.; MARTELL, J. D.; TAKAHASHI, N.; CHAN, C. T.; LOBRITZ, M. A.; BRAFF, D.; SCHWARZ, E. G.; YE, J. D.; PATI, M.; VERCRUYSE, M.; RALIFO, P. S.; ALLISON, K. R.; KHALIL, A. S.; TING, A. Y.; WALKER, G. C.; COLLINS, J. J. **Antibiotics induce redox-related physiological alterations as part of their lethality**. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 111, p. E2100-2109, 2014.

DWYER, D. J.; KOHANSKI, M. A.; HAYETE, B.; COLLINS, J. J. **Gyrase inhibitors induce oxidative damage cellular death pathway in *Escherichia coli***. *Mol. Syst. Biol.*, v. 3, p. 1-15, 2007.

ECDC -EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. A fatal case of diphtheria in Belgium. Rapid risk assessment. Stockholm. 2016.

EFSTRATIOU, A.; ENGLER, K. H.; MAZUROVA, I. K.; GLUSHKEVICH, T.; VUOPIO-VARKILA, J.; POPOVIC, T. **Current approaches to the laboratory diagnosis of diphtheria**. *J Infect Dis.*, v. 181, n.1, p.138-145, 2000.

EFSTRATIOU, A.; GEORGE, R. C. **Laboratory guidelines for the diagnosis of infections caused by *Corynebacterium diphtheriae* and *C. ulcerans***. World Health Organization. *Commun Dis Public Health.*, v. 2, n. 4, p. 250-257, 1999.

EL SHAFEY, H. M.; GHANEM, S.; MERKAMM, M.; GUYONVARCH, A. ***Corynebacterium glutamicum* superoxide dismutase is a manganese-strict non-cambialistic enzyme in vitro**. *Microbiol Res.*, v. 163, n. 1, p. 80-86, 2008.

ELEK, S. D. **The recognition of toxicogenic bacterial strains in vitro**. *Br. Med. J.*, v.1, p. 493-496, 1948.

- ELGELMANN, I.; PUJOL, N. **Innate Immunity in *C. elegans***. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v. 708, p. 105-121, 2010
- ELKINS, J. G.; HASSETT, D. J.; STEWART, P. S.; SCHWEIZER, H. P.; McDERMOTT, T. R. **Protective role of catalase in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm resistance to hydrogen peroxide**. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 65, n. 10, p. 4594-4600, 1999.
- FARFOUR, E.; BADELL, E.; ZASADA, A.; HOTZEL, H.; TOMASO, H.; GUILOT, S.; GUIISO, N. **Characterization and comparison of invasive *Corynebacterium diphtheriae* isolate from France and Poland**. *J. Clin. Microbiol.*, v. 50, p. 173-175, 2012.
- FARR, S. B.; KOGOMA, T. **Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium***. *Microbiol. Rev.*, v. 55, p. 561-585, 1991.
- FINN, R. D.; COGGILL, P.; EBERHARDT, R. Y.; EDDY, S. R.; MISTRY, J.; MITCHELL, A. L.; POTTER, S. C.; PUNTA, M.; QURESHI, M.; SANGRADOR-VEGAS, A.; SALAZAR, G. A.; TATE, J.; BATEMAN, A. **The Pfam protein families database: towards a more sustainable future**. *Nucleic Acids Res.*, Database Issue, v. 44, p. D279-D285, 2016.
- FISHER, C. W.; LEE, D.; DODGE, B. A.; HAMAN, K. M.; ROBBINS, J. B.; MARTIN, S. E. **Influence of Catalase and Superoxide Dismutase on Ozone**. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 66, n.4, p. 1405-1409, 2000.
- FORMIGA, L. C. **New possibilities for the laboratory diagnosis of diphtheria**. *Braz. J. medical and biol. Res.*, v.18, p. 401-402, 1985.
- FRANKS, S. E.; EBRAHIMI, C.; HOLLANDS, A.; OKUMURA, C. Y.; AROIAN, R. V.; NIZET, V.; MCGILLIVRAY, S. M. **Novel role for the yceGH tellurite resistance genes in the pathogenesis of *Bacillus anthracis***. *Infect. and Immun.*, v. 82, p. 1132-1140, 2014.
- FRIEDBERG, F. C.; WALKER, G. C.; SIEDE, W.; WOOD, R. D.; SCHULTZ, R. A.; ELLENBERGER, T. **DNA repair and mutagenesis**. 2 ed. Washington DC: ASM Press. 2006.
- FUKUDA, T.; MATSUMURA, T.; ATO, M.; HAMASAKI, M.; NISHIUCHI, Y.; MURAKAMI, Y.; MAEDA, Y.; YOSHIMORI, T.; MATSUMOTO, S.; KOBAYASHI, K.; KINOSHITA, T.; MORITA, Y. S. **Critical roles for lipomannan and lipoarabinomannan in cell wall integrity of mycobacteria and pathogenesis of tuberculosis**. *MBio*, v. 4, p. 472-412, 2013.
- FUNKE, G.; von GRAEVENITZ, A.; CLARRIDGE, J.; BERNARD, K. **Clinical microbiology of coryneform bacteria**. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 10, p. 125-159, 1997.
- FUNKE, G.; BERNARD, K. A. **Coryneform gram-positive rods**. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; LANDRY, M. A.; PFALLER, M. A.; eds. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington (DC): American Society for Microbiology Press, 2007, pp. 485-514. 2007.

GALAZKA, A. **The changing epidemiology of diphtheria in the vaccine era.** *Braz. J. Infect. Dis.*, v. 181, n. 1, p. S2-S9, 2000.

GASPAR, A. H.; TON-THAT, H. **Assembly of distinct pilus structures on the surface of *Corynebacterium diphtheriae*.** *J. Bacteriol.*, v. 188, n. 4, p. 1526-1533, 2006.

GILBERT, L. **Infections with *Corynebacterium diphtheriae*: changing epidemiology and clinical manifestations.** Report of the third international meeting of the European Laboratory Working Group on Diphtheria (ELWGD). Institute Pasteur (Paris, 7-8 June 1996). *Commun Dis. Intell.*, v. 21, p. 161-164, 1997.

GIULIODORI, A. M.; DiPIETRO, F.; MARZI, S.; MASQUIDA, B.; WAGNER, R.; ROMBY, P. **The csp A Mrna is a thermos sensor that modulates translation of the cold-shock protein Csp A.** *Mol. Cell.*, v. 37, p. 21-33, 2010.

GOLAZ, A.; HARDY, I. R.; STREBEL, P.; BISGARD, K. M.; VITEK, C.; POPOVIC, T.; WHARTON, M. **Epidemic diphtheria in the Newly Independent States of the former Soviet Union: implications for diphtheria control in the United States.** *J. Infect Dis.*, v. 181, n. 1, p. 237-243, 2000.

GOLDSTEIN, J.; POLLITT, N. S.; INOUE, M. **Major cold shock protein of *Escherichia coli*.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 87, p. 283-287, 1990.

GOMES, D. L.; PEIXOTO, R. S.; BARBOSA, E. A.; NAPOLEÃO, F.; SABBADINI, P. S.; SANTOS, K. R.; MATTOS-GUARALDI, A. L.; HIRATA Jr, R. **SubMICs of penicillin and erythromycin enhance biofilm formation and hydrophobicity of *Corynebacterium diphtheriae* strains.** *J. Med. Microbiol.*, v. 62, p. 754-760, 2013.

GOMES, D. L.; MARTINS, C. A.; FARIA, L. M.; SANTOS, L. S.; SANTOS, C. S.; SABBADINI, P. S.; SOUZA, M. C.; ALVES, G. B.; ROSA, A. C.; NAGAO, P. E.; PEREIRA, G. A.; HIRATA Jr, R.; MATTOS-GUARALDI, A. L. ***Corynebacterium diphtheriae* as an emerging pathogen in nephrostomy catheter-related infection: evaluation of traits associated with bacterial virulence.** *J. Med. Microbiol.*, v. 58, p. 1419-1427, 2009.

GRAUMANN, P. L.; MARAHIEL, M. A. **Some like it cold: response of microorganisms to cold shock.** *Arch. Microbiol.*, v. 166, p. 293-300, 1996.

GRAY, N. F.; PERCIVAL, S. L.; YATES, M. V.; WILLIAMS, D. **Ozone disinfection.** In: *Microbiology of waterborne diseases.* Jordan Hill, GBR: Academic Press: GBR, p. 599-615, 2013.

GRIENGLING, K.; SORESCU, D.; LASSÈNGUE, B.; USHIO-FUKA, I. **Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology.** *Arterioscler. Thromb. Vas. Biol.*, v. 20, n. 10, p. 2175-2183, 2000.

HADFIELD, T. L.; MCEVOY, P.; POLOTSKY, Y.; TZINSERLING, V. A.; YAKOVLEV, A. **The pathology of diphtheria.** *J. Infect Dis.*, v. 181, n. 1, p. S116-120, 2000.

HALL, A. J.; CASSIDAY, P. K.; BERNARD, K. A.; BOLT, F.; STEIGERWALT, A. G.; BIXLER, D.; PAWLOSKI, L. C.; WHITNEY, A. M.; IWAKI, M.; BALDWIN, A.; DOWSON, C. G.; KOMIYA, T.; TAKAHASHI, M.; HINRIKSON, H. P.; TONDELA, M. L. **Novel *Corynebacterium diphtheriae* in domestic cats.** *Emerg infect dis*, v. 16, p. 688-691, 2010.

HALLIWELL, B.; CROSS, C. E. **Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress.** *Environ Health Perspect*, v. 102, n. 10, p. 5-12, 1994.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine.** 3a ed. Oxford: Oxford University Press, 936p. 1999.

HÉBRAUD, M.; POTIER, P. **Cold shock response and low temperature adaptation in psychrotrophic bacteria.** *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, v. 1, p. 211–219, 1999.

HEDGE, A.; BHAT, G. H.; MALLYA, S. **Effect of exposure to hydrogen peroxide on the virulence of *Escherichia coli*.** *Indian J. Med. Microbiol.*, v.26, n.1, p.25-28, 2008.

HENNEQUIN, C.; FORESTIER, C. **OxyR, a LysR-Type regulator involved in *Klebsiella pneumoniae* mucosal and abiotic colonization down-pointing small open triangle.** *Infect Immun.*, v. 77, p. 5449-5457, 2009.

HEO, Y. J.; CHUNG, I. Y.; CHO, W. J.; LEE, B. Y.; KIM, J. H.; CHOI, K.; LEE, J. W.; HASSETT, D. J.; CHO, Y. H. **The major catalase gene (*katA*) of *Pseudomonas aeruginosa* PA14 is under both positive and negative control of the global transactivator OxyR in response to hydrogen peroxide.** *J Bacteriol.*, v. 192, p. 381-390, 2010.

HIRATA Jr, R.; PEREIRA, G. A.; FILARDY, A. A.; GOMES, D. L. R.; DAMASCO, P. V.; ROSA, A. C. P.; NAGAO, P. E.; PIMENTA, F. P.; MATTOS-GUARALDI, A. L. **Potential pathogenic role of aggregative-adhering *Corynebacterium diphtheriae* of different clonal groups in endocarditis.** *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 41, p. 986-991, 2008.

HIRATA Jr, R.; SOUZA, S. M.; ROCHA-DE-SOUZA, C. M.; ANDRADE, A. F.; MONTEIRO-LEAL, L. H.; FORMIGA, L. C.; MATTOS-GUARALDI, A. L. **Patterns of adherence to HEp-2 cells and actin polymerization by toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains.** *Microbial Pathog.*, v. 36, p. 125-130, 2004.

HIRATA Jr., R.; PACHECO, L. G.; SOARES, S. C.; SANTOS, L. S.; MOREIRA, L. O.; SABBADINI, P. S.; SANTOS, C. S.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. A.; MATTOS-GUARALDI, A. L. **Similarity of *rpoB* gene sequences of sucrose-fermenting and non-fermenting *Corynebacterium diphtheriae* strains.** *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 99, p.733-737, 2011.

HIRATA Jr, R.; NAPOLEÃO, F.; MONTEIRO-LEAL, L. H.; ANDRADE, A. F.; NAGAO, P. E.; FORMIGA, L. C.; FONSECA, L. S.; MATTOS-GUARALDI, A. L. **Intracellular viability of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains in HEp-2 cells.** *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 215, p. 115- 119, 2002.

- HODGKIN, J.; KUWABARA, P. E.; CORNELIUSSEN, B. **A novel bacterial pathogen, *Microbacterium nematophilum*, induces morphological change in the nematode *C. elegans*.** *Curr. Biol.*, v. 10, p. 1615-1618, 2000.
- HÖFLER, W. **Cutaneous diphtheria.** *Int. J. Dermatol.*, v. 30, n. 12, p. 845-847, 1991.
- HOLMES, R. K. **Biology and molecular epidemiology of diphtheria toxin and the tox gene.** *J. infect. Dis.*, v. 181, n. 1, p. S156-167, 2000.
- HONMA, K.; MISHIMA, E.; INAGAKI, S.; SHARMA, A. **The oxyR homologue in *Tannerella forsythia* regulates expression of oxidative stress responses and biofilm formation.** *Microbiol.*, v. 155, n. 6, p. 1912-1922, 2009.
- IEVA, R.; RONCARATI, D.; METRUCCIO, M. M.; SEIB, K. L.; SCARLATO, V.; DELANY, I. **OxyR tightly regulates catalase expression in *Neisseria meningitidis* through both repression and activation mechanisms.** *Mol Microbiol.*, v. 70, p. 1152-1165, 2008.
- IMLAY, J. A. **The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium.** *Nat. Rev. Microbiol.*, v. 11, n. 7, p. 43-54, 2013.
- IMLAY, J. A. **How obligatory is anaerobiosis?** *Mol Microbiol.*, v. 68, n. 4, p. 801-804, 2008.
- IWAKI, M.; KOMIYA, T.; YAMAMOTO, A.; ISHIWA, A.; NAGATA, N.; ARAKAWA, Y.; TAKAHASHI, M. **Genome organization and pathogenicity of *Corynebacterium diphtheriae* C7(-) and PW8 strains.** *Infect. and Immun.*, v. 78, p. 3791-3800, 2010.
- JANION, C. **Inducible SOS response system of DNA repair and mutagenesis in *Escherichia coli*.** *Int. J. Biol. Sci.*, v. 4, n. 6, p. 338-344, 2008.
- JANION, C. **Some provocative thoughts on damage and repair of DNA.** *J. Biomed. Biotechnol.*, v. 1, n. 2, p. 50-51, 2001.
- JIN, B.; JEONG, K. W.; KIM, Y. **Structure and flexibility of the thermophilic cold-shock protein of *Thermus aquaticus*.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 451, p. 402-407, 2014.
- JO, I.; CHUNG, I. Y.; BAE, H. W.; KIM, J. S.; SONG, S.; CHO, Y. H.; HA, N. C. **Structural details of the OxyR peroxide-sensing mechanism.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v. 112, n. 20, p. 6443-6448, 2015.
- JOHNSON, J. R.; CLABOTS, C.; ROSEN, H. **Effect of inactivation of the global oxidative stress regulator oxyR on the colonization ability of *Escherichia coli* O1:K1:H7 in a mouse model of ascending urinary tract infection.** *Infect Immun.*, v. 74, n. 1, p. 461-468, 2006.
- KAZMIERCZAC, M. J.; WIEDMANN, M.; BOOR, K. J. **Alternative sigma factors and their roles in bacterial virulence.** *Microbiol Mol Biol Rev.*, v. 69, p. 527-543, 2005.
- KELLEY, L. A.; STERNBERG, M. J. **Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server.** *Nature Protocols*, v. 4, p. 363-371, 2009.

- KELLEY, L. A.; MEZULIS, S.; YATES, C. M.; WASS, M. N.; STERNBERG, M. J. **The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis.** *Nature Protocols*, v.10, p. 845-858, 2015.
- KETO-TIMONEN, R.; HIETALA, N.; PALONEN, E.; HAKAKORPI A.; LINDSTRÖM, M.; KORKEALA, H. **Cold Shock Proteins: A Minireview with Special Emphasis on Csp-family of Enteropathogenic Yersinia.** *Front.Microbiol.*, v. 7, p. 1-7, 2016.
- KIM, J. S.; HOLMES, R. K. **Characterization of OxyR as a negative transcriptional regulator that represses catalase production in *Corynebacterium diphtheriae*.** *PLoS One*, v.7, p.e31709, 2012.
- KIM, S.; OH, D. B.; KWON, O.; KANG, H. A. **Identification and functional characterization of the NanH extracellular sialidase from *Corynebacterium diphtheriae*.** *J. Biochem.*, v. 147, p. 523-533, 2010.
- KIM, Y. H.; LEE, Y.; KIM, S.; YEOM, J.; YEOM, S.; KIM, B. S.; OH, S.; PARK, S.; JEOM, C.O.; PARK, W. **The role of periplasmic antioxidant enzymes (superoxide dismutase and thiol peroxidase) of the Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in the formation of biofilms.** *Proteomics*, v. 6, p. 6181-6193, 2006.
- KOHANSKI, M. A.; DWYER, D. J.; HAYETE, B.; LAWRENCE, C. A. & COLLINS, J. J. **A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics.** *Cell*, v. 130, n.5, p.797-810, 2007.
- KONRAD, R.; BERGER, A.; HUBER, I.; BOSCHERT, V.; HÖRMANSDORFER, S.; BUSCH, U.; HOGARDT, M.; SCHUBERT, S.; SING, A. **Matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry as a tool for rapid diagnosis of potentially toxigenic *Corynebacterium* species in the laboratory management of diphtheria-associated bacteria.** *EuroSurveill.*, v. 15, n. 43, p. 9, 2010.
- KRENN, V.; MORAWIETZ, L.; BURMESTER, G.R.; KINNE, R.W.; MUELLER-LADNER, U.; MUELLER, B.; HAUPL, T. **Synovitis score: discrimination between chronic low-grade and high-grade synovitis.** *Histopatol.*, v. 49, n. 4, p. 358-364, 2006.
- LAU, G. W.; BRITIGAN, B. E.; HASSETT, D. J. ***Pseudomonas aeruginosa* OxyR is required for full virulence in rodent and insect models of infection and for resistance to human neutrophils.** *Infect, immun.*, v. 73, n. 4, p. 2550-2553, 2005.
- LEBLANC, J. J.; BRASSINGA, A. K.; EWANN, F; DAVIDSON, R. J., HOFFMAN, P. S. **An Ortholog of OxyR in *Legionella pneumophila* is expressed postexponentially and negatively regulates the alkyl hydroperoxide reductase (ahpC2D) operon.** *J. Bacteriol.*, v. 190; n. 10, p. 3444-3455, 2008.
- LEMICHEZ, E.; BOMSEL, M.; DEVILLIERS, G.; VANDERSPEK, J.; MURPHY, J.R.; LUKIANOV, E.V.; OLSNES, S.; BOQUET, P. **Membrane translocation of diphtheria toxin fragment A exploits early to late endosome trafficking machinery.** *Mol. Microbiol.*, v. 23, p. 445-457, 1997.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. **Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method.** *METHODS*, v. 25, p. 402–408, 2001.

LIVORNESE, L. L.; KORZENIOWSKI, O. M. **Pathogenesis of infective endocarditis.** In: Kaye D (ed) *Infective endocarditis*, 2ª edição, Raven Press, p. 19–35, 1992.

LJUNGH, A.; HJERTÉN, S.; WADSTRÖN, T. **High surface hydrophobicity of autoaggregating *Staphylococcus aureus* strain isolated from human infections studied with the salt aggregation test.** *Infect Immun.*, v. 47, p. 522-526, 1985.

LOEPFEB, C.; RAIMANN, E.; STEPHAN, R.; TASARA, T. **Reduced host cell invasiveness and oxidative stress tolerance in double and triple csp gene family deletion mutants of *Listeria monocytogenes*.** *Food borne Pathog. Dis.*, v. 7, p. 775–783, 2010.

LOGINA, I.; DONAGHY, M. **Diphtheritic polyneuropathy: a clinical study and comparison with Guillain-Barré syndrome.** *J Neurol Neurosurg Psychiatry.*, v. 67, n.4, p. 433-438, 1999.

LOZHNIKOVA, S. M.; PIROGOV, V. N.; PIRADOV, M. A.; SAKHAROVA, A. V.; LIUDKOVSKAIA, I. G. **Diphtheric polyneuropathy clinic-morphologic study.** *Arkh. Patol.*, v. 59, p. 11-17, 1997.

MA, Z.; RUSSO, V. C.; RABA DI, S. M.; JEN, Y.; CATLETT, S. V.; BAKSHI, C. S.; MALIK, M. **Elucidation of a mechanism of oxidative stress regulation in *Francisella tularensis* live vaccine strain.** *Mol. Microbiol.*, v. 101, p. 56-878, 2016.

MAHAJAN-MIKLOS, S.; TAN, M. W.; RAHME, L. G.; AUSUBEL, F. M. **Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa*-*Caenorhabditis elegans* pathogenesis model.** *Cell*, v. 96, n. 1, p. 47-56, 1999.

MANCHADO, M.; MICHÁN, C.; PUEYO, C. **Hydrogen peroxide activates the SoxRS regulon in vivo.** *J Bacteriol.*, v. 182, n. 23, p. 6842-6844, 2000.

MANDLIK, A.; SWIERCZYNSKI, A.; DAS, A.; TON-THAT, H. ***Corynebacterium diphtheriae* employs specific minor pilins to target human pharyngeal epithelial cells.** *Mol. Microbiol.*, v. 64, n. 1, p. 111-124, 2007.

MANDLIK, A.; SWIERCZYNSKI, A.; DAS, A.; TON-THAT, H. **Pili in Gram-positive bacteria: assembly, involvement in colonization and biofilm development.** *Trends Microbiol.*, v. 16, n. 1, p. 33-40, 2008.

MARCHLER-BAUER, A.; DERBYSHIRE, M. K.; GONZALES, N. R.; LU, S.; CHITSAZ, F.; GEER, L. Y.; GEER, R. C.; HE, J.; GWADZ, M.; HURWITZ, D. I.; LANCZYCKI, C. J.; LU, F.; MARCHLER, G. H.; SONG, J. S.; THANKI, N.; WANG, Z.; YAMASHITA, R. A.; ZHANG, D.; ZHENG, C.; BRYANT S. H. **CDD: NCBI's conserved domain database.** *Nucleic Acids Res.*, v. 43, p. D222-6, 2015.

MARSH, E. K.; MAY, R. C. ***Caenorhabditis elegans*, a model organism for investigating immunity.** *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 78, n. 7, p. 2075-2081, 2012.

MARTINEZ-MARTINEZ, L.; ORTEGA, M. C.; SUÁREZ, A. I. **Comparison of E-Test with microdilution and disk diffusion for susceptibility testing of coryneform bacteria.** *J. Clin. Microbiol.*, v. 33, p. 1318-1321, 1995.

MATSUKURA, Y.; MUNETA, T.; TSUJI, K.; MIYATAKE, K.; YAMADA, J.; KAHAE, A.; KOGA, H.; TOMITA, M.; SEKIYA, I. **Mouse synovial mesenchymal stem cell increase in yield with knee inflammation.** *J. Orthop Res.*, v. 33, n. 2, p. 246-253, 2015.

MATTOS, J. C.; DANTAS, F. J.; BEZERRA, R. J.; BERNARDO-FILHO, M.; CABRAL-NETO, J. B.; LAGE, C.; LEITÃO, A. C.; CALDEIRA-DE-ARAÚJO, A. **Damage induced by stannous chloride in plasmid DNA.** *Toxicol. Lett.*, v. 116, n. 1-2, p. 159-163, 2000.

MATTOS-GUARALDI, A. L.; DAMASCO, P. V.; GOMES, D. L. R.; MELENDEZ, M. G.; SANTOS, L. S.; MARINELLI, R. S.; NAPOLEAO, F.; SABBADINI, P. S.; SANTOS, C. S.; MOREIRA, L. O.; HIRATA Jr, R. **Concurrent diphtheria and infectious mononucleosis: difficulties for management, investigation and control of diphtheria in developing countries.** *J. Medical Microbiol.*, v.60, p.1685 - 1688, 2011.

MATTOS-GUARALDI, A. L.; FORMIGA, L. C. D. **Bacteriological properties of a sucrose fermenting *Corynebacterium diphtheriae* strain isolated from a case of endocarditis.** *Curr Microbiol.*, v. 37, p. 156-158, 1998.

MATTOS-GUARALDI, A. L.; FORMIGA, L. C. D. ***Corynebacterium diphtheriae* e difteróides: ensaios de aderência.** *Rev. Brasil. Patol. Clin.*, v. 27, p. 53-60, 1991.

MATTOS-GUARALDI, A. L.; FORMIGA, L. C. D.; CAMELLO, T. C. F.; PEREIRA, G. A.; HIRATA Jr, R.; HALPERN, M. ***Corynebacterium diphtheriae* threats in cancer patients.** *Rev Argentina Microbiol*, v. 33, p. 96-100, 2001.

MATTOS-GUARALDI, A. L.; MOREIRA, L. O.; DAMASCO, P. V.; HIRATA Jr, R. **Diphtheria remains a threat to health in the developing world - an overview.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 98, p. 987-993, 2003.

MATTOS-GUARALDI, A. L.; FORMIGA, L. C.; ANDRADE, A. F. **Cell surface hydrophobicity of sucrose fermenting and nonfermenting *Corynebacterium diphtheriae* strains evaluated by different methods.** *Curr. Microbiol.*, v. 38, p. 37-42, 1999.

MATTOS-GUARALDI, A. L.; FORMIGA, L. C. D.; PEREIRA, G. A. **Cell surface components and adhesion in *Corynebacterium diphtheriae*.** *Microb. and Infect.*, v. 2, p. 1507-1512, 2000.

MELSTROM Jr, K. A.; KOZLOWSKI, R.; HASSETT, D. J.; SUZUKI, H.; BATES, D. M.; GAMELLI, R. L.; SHANKAR, R. **Cytotoxicity of *Pseudomonas* secreted exotoxins requires OxyR expression.** *J Surg Res.*, v. 143, p. 50-57, 2007.

MENON, T.; SENTHILKUMAR, S.; PACHAIAPPAN, P. **Native valve endocarditis caused by non-toxigenic strain of *Corynebacterium diphtheriae*.** *Indian J. Pathol. Microbiol.*, v. 53, p. 859-900, 2010.

MERKAMM, M.; GUYONVARCH, A. **Cloning of the sodA gene from *Corynebacterium melasecola* and role of superoxide dismutase in cellular viability.** *J. Bacteriol.*, v. 183, n. 4, p. 1284-1295, 2001.

MICHAUX, C.; MARTINI, C.; SHIOYA, K.; AHMEDLECHEHEB, S.; BUDIN-VERNEUIL, A.; COSETTE, P. **CspR, a cold shock RNA-binding protein involved in the long-term survival and the virulence of *Enterococcus faecalis*.** *J. Bacteriol.*, v. 194, p. 6900–6908, 2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Sistema de Informação de Agravos de Notificação – SINAN. Casos confirmados de difteria: Brasil e Grandes Regiões, 1997-2006. Brasília (DF); 2007. Acesso em 10 de maio de 2018. Disponível em http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/casos_difteria.pdf

MOREIRA, L. O.; ANDRADE, A. F.; VALE, M. D.; SOUZA, S. M.; HIRATA Jr, R.; ASAD, L. M.; ASAD, N. R.; MONTEIRO-LEAL, L. H.; PREVIATO, J. O.; MATTOS-GUARALDI, A.L. **Effects of iron limitation on adherence and cell surface carbohydrates of *Corynebacterium diphtheriae* strains.** *App. Environm. Microbiol.*, v. 69, p. 5907-5913, 2003.

MOREIRA, L. O.; MATTOS-GUARALDI, A. L.; ANDRADE, A. F. **Novel lipoarabinomannan-like lipoglycan (CdiLAM) contributes to the adherence of *Corynebacterium diphtheriae* to epithelial cells.** *Arc. Microbiol.*, v. 190, p. 521-530, 2008.

MORRIS, R. E.; GERSTEIN, A. S.; BONVENTRE, P. F.; DAELINGER, C. B. **Receptor-mediated entry of diphtheria toxin into monkey kidney (Vero) cells: electron microscopic evaluation.** *Infect. Immun.*, v. 50, p. 721-727, 1985.

MOSKAUG, J. O.; SANDVIG, K.; OLSNES, S. **Low pH-induced release of diphtheria toxin A-fragment in Vero cells.** Biochemical evidence for transfer to the cytosol. *The J. Biological Chem.*, v. 263, p. 2518-2525, 1988.

MOSSER, T.; MATIC, I.; LEROY, M. **Bacterium-Induced Internal Egg Hatching Frequency Is Predictive of Life Span in *Caenorhabditis elegans* Populations.** *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 77, n. 22, p. 8189-8192, 2011.

MUTTAIYAH, S.; BEST, E. J.; FREEMAN, J. T.; TAYLOR, S. L.; MORRIS, A. J.; ROBERTS, S. A. ***Corynebacterium diphtheriae* endocarditis: a case series and review of the treatment approach.** *Int J Infect Dis*, v.15, p. 584–588, 2011.

NEELEY, W. L.; DELANEY, S.; ALEKSEYEV, Y. O.; JAROSZ, D. F.; DELANEY, J. C.; WALKER, G. C.; ESSIGMANN, J. M. **DNA Polymerase V allows bypass of toxic guanine oxidation products in vivo.** *J. Biol. Chem.*, v. 282, n. 17, p. 12741-12748, 2007.

NIEMANN, H. H.; SCHUBERT, W. D.; HEINZ, D. W. **Adhesin and invasins of pathogenic bacteria: a structural view.** *Microb Infect* ., v. 6, p. 101-112, 2004.

OCHSNER, U. A.; VASIL, M. L.; ALSABBAGH, E.; PARVATIYAR, K.; HASSETT, D. J. **Role of the *Pseudomonas aeruginosa* oxyR-recG operon in oxidative stress defense and DNA repair: OxyR-dependent regulation of katB-ankB, ahpB, and ahpC-ahpF.** *J. Bacteriol.*, v. 182, n. 16, p. 4533-4544, 2000.

OFEK, I.; BEACHEY, E. H. **Bacterial adherence.** *Adv. Intern. Med.*, v. 25, p. 503-532, 1980.

ONDARZA, J. **Ozone Sensitivity and Catalase Activity in Pigmented and Non-Pigmented Strains of *Serratia marcescens*.** *Open Microbiol J.*, v. 11, p. 12-22, 2017.

ORDÓÑEZ-PALAU, S.; BOQUET, S.; GIL-GARCIA, M.; PARDINA-SOLANO, M. **Chronic osteomyelitis of the metatarsal sesamoid due to *Corynebacterium jeikeium* in a patient with rheumatoid arthritis.** *Joint Bone Spine.*, v. 74, n. 5, p. 516-517, 2007.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Diphtheria, 2014. Disponível em: <http://www.who.int/topics/diphtheria/en/index.html>. Acesso em: 18 de dezembro de 2017.

OTT, L.; Mc KENZIE, A.; BALTAZAR, M. T.; BRITTING, S.; BISCHOF, A.; BURKOVSKI, A.; HOSKISSON, P. A. **Evaluation of invertebrate infection models for pathogenic corynebacteria.** *FEMS Immunol Med Microbiol.*, v. 65, p. 413-421, 2012.

OTT, L.; HÖLLER, M.; GERLACH, R. G.; HENSEL, M.; RHEINLAENDER, J.; SCHAFFER, T. E.; BURKOVSKI, A. ***Corynebacterium diphtheriae* invasion-associated protein (DIP1281) is involved in cell surface organization, adhesion and internalization in epithelial cells.** *BMC microbiol.*, v. 10, p. 2, 2010.

OTT, L.; SCHOLZ, B.; HÖLLER, M.; HASSELT, K.; ENSSER, A.; BURKOVSKI, A. **Induction of the NFκB signal transduction pathway in response to *Corynebacterium diphtheriae* infection.** *Microbiol.*, v. 159, p. 126-135, 2013.

PAPPENHEIMER Jr, A. M. **The story of a toxic protein, 1888-1992.** *Prot. Science*, v. 2, p. 292-298, 1993.

PASCUAL, A.; LLORCA, I.; CANUT, A. **Use of ozone in food industries for reducing the environmental impact of cleaning and disinfection activities.** *Trends Food Sci Technol.*, v.18, n. 1, p. S29-35, 2007.

PATEY, O.; BIMET, F.; RIEGEL, P.; HALIOUA, B.; EMOND, J. P.; ESTRANGIN, E.; DELLION, S.; ALONSO, J. M.; KIREDJIAN, M.; DUBLANCHET, A.; LAFAIX C. **Clinical and molecular study of *Corynebacterium diphtheriae* systemic infections in France.** *J. Clin. Microbiol.*, v. 35, n. 2, p. 441-445, 1997.

PEI, B.; WANG, Y.; KATZIANER, D. S.; WANG, H.; WU, H.; ZHONG, Z.; ZHU, J. **Role of a TehA homolog in *Vibrio cholerae* C6706 antibiotic resistance and intestinal colonization.** *Canadian J. Microbiol.*, v. 59, p. 136-139, 2013.

- PEIXOTO, R.; BORGES, L. L.; SANTOS, C. S.; NAPOLEÃO, F.; CAMELLO, T. C.; PEREIRA, G. A.; HIRATA Jr, R.; VIEIRA, V. V.; COSME, L. M.; SABBADINI, P. S.; MATTOS-GUARALDI, A. L. **Diphtheria outbreak in Maranhão, Brazil: microbiological, clinical and epidemiological aspects.** *Epidemiol. Infect.*, v. 143, p. 791-798, 2014.
- PEREIRA, G. A.; PIMENTA, F. P.; SANTOS, F. R.; DAMASCO, P. V.; HIRATA Jr, R.; MATTOS-GUARALDI, A. L. **Antimicrobial resistance among Brazilian *Corynebacterium diphtheriae* strains.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 103, n. 5, p.507-510, 2008.
- PETER, B.; WARTENA, M.; KAMPINGA, H. H.; KONINGS, A. W. **Role of lipid peroxidation and DNA damage in paraquat toxicity and the interaction of paraquat with ionizing radiation.** *Biochem. Pharmacol.*, v. 43, n. 4, p. 705-715, 1992.
- PHADTARE, S.; SEVERINOV, K. **RNA remodeling and gene regulation by cold shock proteins.** *RNA Biol.*, v. 7, p. 788–795, 2010.
- PHADTARE, S. **Recent developments in bacterial cold-shock response.** *Curr. Issues Mol. Biol.*, v.6, p. 125–136, 2004.
- PIMENTA, F. P.; DAMASCO, P. V.; CERBINO, N. J.; LOPES, G. S.; HIRATA Jr, R.; MILAGRES, L. G.; MATTOS-GUARALDI, A. L. **Diphtheria-neutralizing antibody levels in healthy adults from Rio de Janeiro, Brazil.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 101, p. 459-462, 2006.
- PIMENTA, F. P.; SOUZA, M. C.; PEREIRA, G. A.; HIRATA Jr, R.; CAMELLO, T. C.; MATTOS-GUARALDI, A. L. **DNase test as a novel approach for the routine screening of *Corynebacterium diphtheriae*.** *Lett. Appl. Microbiol.*, v. 46, n. 3, p. 307-311, 2008.
- POILANE, I.; FAWAZ, F.; NATHANSON, M.; CRUAUD, P.; MARTIN, T.; COLLIGNON, A.; GAUDELUS, J. ***Corynebacterium diphtheriae* osteomyelitis in an immunocompetent child: a case report.** *Eur. J. Pediatr.*, v. 154, n. 5, p. 381-383, 1995.
- POMPOSIELLO, P. J.; DEMPLE, B. **Redox-operated genetic switches: the SoxR and OxyR transcription factors.** *Trends Biotechnol.*, v.19, n. 3, p. 109-114, 2001.
- PUECH, V.; CHAMI, M.; LEMASSU, A.; LANÉELLE, M. A.; SCHIFFLER, B.; GOUNON, P.; BAYAN, N.; BENZ, R.; DAFFÉ, M. **Structure of the cell envelope of corynebacteria: importance of the non-covalently bound lipids in the formation of the cell wall permeability barrier and fracture plane.** *Microbiol.*, v. 147, p. 1365-1382, 2001.
- PULITI, M.; von HUNOLSTEIN, C.; MARANGI, M.; BISTONI, F.; TISSI, L. **Experimental model of infection with non-toxigenic strains of *Corynebacterium diphtheriae* and development of septic arthritis.** *J. Med. Microbiol.*, v. 55, p. 229-235, 2006.
- QUICK, M. L.; SUTTER, R. W.; KOBALIDZE, K.; MALAKMADZE, N.; STREBEL, P. M.; NAKASHIDZE, R.; MURVANIDZE, S. **Epidemic diphtheria in the Republic of Georgia, 1993-1996: risk factors for fatal outcome among hospitalized patients.** *The J. Infect. Dis.*, v. 181, p. 130-307, 2000.

RASMUSSEN, R. **Quantification on the LightCycler**. In: MEUER, S.; WITTEW, C.; NAKAGAWARA, K; eds. Rapid Cycle Real-Time PCR, Methods and Applications. Springer Press, Heidelberg. P21-34. 2001. RASMUSSEN, R. Quantification on the LightCycler. In: MEUER, S.; WITTEW, C.; NAKAGAWARA, K; eds. Rapid Cycle Real-Time PCR, Methods and Applications. Springer Press, Heidelberg. P21-34. 2001.

REARDON-ROBINSON, M. E.; TON-THAT, H. **Assembly and Function of *Corynebacterium diphtheriae* Pili**. In *Corynebacterium diphtheriae* and Related Toxigenic Species, 123-141. Edited by A. Burkovski. 2014.

RENIERE, L. M. Reduce, Induce, Thrive: Bacterial redox sensing during pathogenesis. J. Bacteriol.pii: JB.00128-18, Accepted Manuscript Posted Online 11 June 2018.

REVEILLAUD, I.; NIEDZWIECKI, A.; BENSCH, K. G.; FLEMING, J. E. **Expression of bovine superoxide dismutase in *Drosophila melanogaster* augments resistance to oxidative stress**. *Mol. Cell. Biol.*, v. 11, n. 2, p. 632-640, 1991.

ROHDE, K.; YATES, R. M.; PURDY, G. E.; RUSSELL, D. G. ***Mycobacterium tuberculosis* and the environment within the phagosome**. *Immunol. Rev.*, v. 219, p. 37-54, 2007.

ROMNEY, M. G.; ROSCOE, D. L.; BERNARD, K.; LAI, S.; EFSTRATIOU, A.; CLARKE, A. M. **Emergence of an invasive clone of nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae* in the urban poor population of Vancouver, Canada**. *J. Clin. Microbiol.*, v. 44, p. 1625-1629, 2006.

SABBADINI, P. S.; GENOVEZ, M. R.; SILVA, C. F.; ADELINO, T. L.; SANTOS, C. S.; PEREIRA, G. A.; NAGAO, P. E.; DIAS, A. A.; MATTOS-GUARALDI, A. L.; HIRATA Jr, R. **Fibrinogen binds to nontoxigenic and toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains**. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 105, p. 706-711, 2010.

SABBADINI, P. S.; ASSIS, C. M.; TROST, E.; GOMES, D. L.; MOREIRA, L. O.; Dos SANTOS, C. S.; PEREIRA, G. A.; NAGAO, P. E.; AZEVEDO, V. A.; HIRATA Jr., R.; Dos SANTOS, A. L.; TAUCH, A.; MATTOS-GUARALDI, A. L. ***Corynebacterium diphtheriae* 67-72p hemagglutinin, characterized as the protein DIP0733, contributes to invasion and induction of apoptosis in HEp-2 cells**. *Microb. Pathog.*, v. 52, p. 165-176, 2012.

SANTOS, C. S.; SANTOS, L. S.; SOUZA, M. C.; DOURADO, F. S.; DIAS, A. A. S. O.; SABBADINI, P. S.; PEREIRA, G. A.; CABRAL, M. C.; HIRATA Jr, R.; MATTOS-GUARALDI, A. L. **Non-opsonic phagocytosis of homologous non-toxicogenic and toxicogenic *Corynebacterium diphtheriae* strains by human U-937 macrophages**. *Microbiol. Immun.*, v. 54, p. 1-10, 2010.

SANTOS, L. S.; SANT'ANNA, L. O.; RAMOS, J. N.; LADEIRA, E. M.; STAVRACAKIS-PEIXOTO, R.; BORGES, L. L.; SANTOS, C. S.; NAPOLEÃO, F.; CAMELLO, T. C.; PEREIRA, G. A.; HIRATA, R.; VIEIRA, V. V.; COSME, L. M.; SABBADINI, P. S.; MATTOS-GUARALDI, A. L. **Diphtheria outbreak in Maranhão, Brazil: microbiological, clinical and epidemiological aspects**. *Epidemiol. Infect.*, v. 143, p. 791-798, 2014.

SANTOS, L.S. Diversidade de respostas de *Corynebacterium diphtheriae* frente a agentes oxidantes: resistência, adaptação e envolvimento do determinante de resistência ao telurito (TeR) e do sistema OxyR na virulência bacteriana [Tese de Doutorado]. Rio de Janeiro, RJ: Universidade do Estado do Rio de Janeiro. 2015.

SCHÄRER, K.; STEPHAN, R.; ANDTASARA, T. **Cold shock proteins contribute to the regulation of listeriolysin O production in *Listeria monocytogenes*.** *Food borne Pathog. Dis.*, v. 10, p. 1023–1029, 2013.

SCHELL, M. A. **Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators.** *Annu. Rev. Microbiol.*, v. 47, p. 597–626, 1993.

SCHEMBRI, M. A.; KLEMM, P. **Coordinate gene regulation by fimbriae-induced signal transduction.** *EMBO J.*, v. 20, n. 12, p. 3074-3081, 2001.

SCHMID, B.; KLUMPP, J.; RAIMANN, E.; LOESSNER, M. J.; STEPHAN, R.; ANDTASARA, T. **Role of cold shock proteins in growth of *Listeria monocytogenes* under cold and osmotic stress conditions.** *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 75, p. 1621–1627, 2009.

SCHMITT, M. P. **Transcription of the *Corynebacterium diphtheriae* hmuo gene is regulated by iron and heme.** *Infect. Immun.*, v. 65, p. 4634-4641, 1997.

SCHMITT, M. P.; TALLEY, B. G.; HOLMES, R. K. **Characterization of lipoprotein IRP1 from *Corynebacterium diphtheriae*, which is regulated by the diphtheria toxin repressor (DtxR) and Iron.** *Infect. Immun.*, v. 65, p. 5364-5367, 1997.

SCHUBERT, A.; ZAKIKHANY, K.; SCHREINER, M.; FRANK, R.; SPELLERBERG, B.; EIKMANN, B. J.; REINSCHIED, D. J. **A fibrinogen receptor from group B *Streptococcus* interacts with fibrinogen by repetitive units with novel ligand binding sites.** *Mol. Microbiol.*, v. 46, n. 2, p. 557-569, 2002.

SEIB, K. L.; WU, H. J.; SRIKHANTA, Y. N.; EDWARDS, J. L.; FALSETTA, M. L.; HAMILTON, A. J.; MAGUIRE, T. L.; GRIMMOND, S. M.; APICELLA, M. A.; MCEWAN, A. G.; JENNINGS, M. P. **Characterization of the OxyR regulon of *Neisseria gonorrhoeae*.** *Mol. Microbiol.*, v. 63, p. 54-68, 2007.

SEKAR, S. K. R.; VEERARAGHAVAN, B.; ANANDAN, S.; DEVANGA-RAGUPATHI, N. K.; SANGAL, L.; JOSHI, S. **Strengthening the laboratory diagnosis of pathogenic *Corynebacterium* species in the vaccine era.** *Lett Appl Microbiol.*, v. 65, n. 5, p. 354-365, 2017.

SEM, X.; RHEN, M. **Pathogenicity of *Salmonella enterica* in *Caenorhabditis elegans* Relies on Disseminated Oxidative Stress in the Infected Host.** *Plos One*, v. 7, n. 9, p. 1-14, 2012.

SHANKS, R. M. Q.; STELLA, N. A.; KALIVODA, E. J.; DOE, M. R.; O'DEE, D. M.; LATHROP, K. L.; GUO, F. L.; NAU, G. J. **A *Serratia marcescens* OxyR homolog mediates surface attachment and biofilm formation.** *J. Bacteriol.*, v. 189, n. 20, p. 7262-7272, 2007.

SHARMA, A. M.; YADAV, S. **Biofilms: microbes and disease.** *Braz. J. Infect. Dis.*, v. 12, n. 6, p. 526-530, 2008.

SHARMA, M.; HUDSON, J. B. **Ozone gas is an effective and practical antibacterial agent.** *Am J Infect Contro*, v. 36, n. 8, p. 559-63, 2008.

SIMPSON-LOUREDO, L.; RAMOS, J. N.; PEIXOTO, R. S.; SANTOS, L. S.; ANTUNES, C. A.; LADEIRA, E. M.; SANTOS, C. S.; VIEIRA, V. V.; BÔAS, M. H.; HIRATA Jr, R.; MATTOS-GUARALDI, A. L. **Corynebacterium ulcerans isolates from humans and dogs: fibrinogen, fibronectin and collagen-binding, antimicrobial and PFGE profiles.** *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 105, p.343–352, 2014

SIMPSON-LOUREDO, L.; RAMOS, J. N.; PEIXOTO, R. S.; SANTOS, L. S.; ANTUNES, C. A.; LADEIRA, E. M.; SANTOS, C. S.; VIEIRA, V. V.; BÔAS, M. H.; HIRATA Jr, R.; MATTOS-GUARALDI, A. L. **Corynebacterium ulcerans isolates from humans and dogs: fibrinogen, fibronectin and collagen-binding, antimicrobial and PFGE profiles.** *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 105, p.343–352, 2014. Apud ENGVALL, E.; RUOSLAHTI, E.; MILLER, E. J. **Affinity of fibronectin to collagens of different genetic types and to fibrinogen.** *J. Exp. Med.*, v. 147, p. 1584–1595, 1978.

SOUZA, S. M. S.; HIRATA Jr, R.; MOREIRA, L. O.; GOMES, M. L.; ANDRADE, A. F. B.; BERNARDO-FILHO, M.; MATTOS-GUARALDI, A. L. **Influence of stannous chloride on the adhesive properties of *Corynebacterium diphtheriae* strains.** *Int. J. Mol. Med.*, v.12, n.4, p. 657-661, 2003.

SPLETTSTOESSER, W. D.; SCHUFF-WERNER, P. **Oxidative stress in phagocytes-"the enemy within".** *Microsc. Res. Tech.*, v. 57, n. 6. p. 441-455, 2002.

SRINIVASAN, V. B.; MONDAL, A.; VENKATARAMAIAH, M.; CHAUHAN, N. K.; RAJAMOHAN, G. **Role of oxyRKP, a novel LysR-family transcriptional regulator, in antimicrobial resistance and virulence in *Klebsiella pneumoniae*.** *Microbioly*, v. 159, p. 1301–1314, 2013.

STAVRACAKIS-PEIXOTO, R.; PEREIRA, G. A.; SANTOS, L. S.; SOUZA, M. C.; GOMES, D. L.; SANTOS, C. S.; WERNECK, L. M.; DIAS, A. A.; HIRATA Jr, R.; NAGAO, P. E.; MATTOS-GUARALDI, A. L. **Invasion of endothelial cells and arthritogenic potential of endocarditis-associated *Corynebacterium diphtheriae*.** *Microbiol.*, v. 160, p. 537-546, 2014.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; DAVIC, I.; SAVIC, B.; SVABIC-VLAHOVIC, M. **A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation.** *J. Microbiol. Methods*, v. 40, p. 175-179, 2000.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; HOLA, V.; DI BONAVENTURA, G.; DJUKIC, S.; CIRKOVIC, I.; RUZICKA, F. **Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci.** *APMIS*, v. 115, p. 891-899, 2007.

STORZ, G.; IMLAY, J. A. **Oxidative stress.** *Curr. Opin. Microbiol.*, v. 2, n. 2, p. 188-194, 1999.

SUND, C. J.; ROCHA, E. R.; TZIANABOS, A. O.; WELLS, W. G.; GEE, J. M.; REOTT, M. A.; O'ROURKE, D. P.; SMITH, C. J. **The bacterioidesfragilis transcriptome response to oxygen and H₂O₂: the role of OxyR and its effect on survival and virulence.** *Mol. Microbiol.*, v.67, n.1, p. 129-142, 2008.

TAILLEUX, L.; NEYROLLES, O.; HONORE-BOUAKLINES, S.; PERRET, E.; SANCHEZ, F.; ABASTADO, J. P.; LAGRANGE, P. H.; GLUCKMAN, J. C.; ROSENZWAJG, M.; HERRMANN, J. L. **Constrained intracellular survival of *Mycobacterium tuberculosis* in human dendritic cells.** *The J. Immunol.*, v. 170, p.1939-1948, 2003.

TAKEUCHI, M.; YOKOTA, A. **Cell wall polisaccharides in coryneform bacteria.** *J Gen Appl. Microbiol.*, v. 35, p. 233-252, 1989.

TERAMOTO, H.; INUI, M.; YUKAWA, H. **OxyR acts as a transcriptional repressor of hydrogen peroxide-inducible antioxidant genes in *Corynebacterium glutamicum*.** *R. FEBS J.*, v. 280, p. 3298–3312, 2013.

TON-THAT, H.; SCHNEEWIND, O. **Assembly of pili on the surface of *Corynebacterium diphtheriae*.** *Mol. Microbiol.*, v. 50, p. 1429-1438, 2003.

TORRES, L. F. C.; RIBEIRO, D.; HIRATA Jr, R.; PACHECO, L. G. C.; SOUZA, M. C.; SANTOS, L. S.; SANTOS, C. S.; SALAH, M.; COSTA, M. M.; GARCIA, M.; SELIM, S. S.; AZEVEDO, V. A. C.; MATTOS-GUARALDI, A. L. **Multiplex polymerase chain reaction to identify and determine the toxigenicity of *Corynebacterium spp* with zoonotic potential and an overview of human and animal infections.** *Mem Inst Oswaldo Cruz.* v. 108, n. 3, p. 272-279, 2013.

TROST, E.; BLOM, J.; SOARES, S. C.; HUANG, I. H.; AL-DILAIMI, A.; SCHRÖDER, J.; JAENICKE, S.; DORELLA, F. A.; ROCHA, F. S.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V.; SCHNEIDER, M. P.; SILVA, A.; CAMELLO, T. C.; SABBADINI, P.;S.; SANTOS, C.;S.; SANTOS, L. S.; HIRATA Jr, R.; MATTOS-GUARALDI, A. L.; EFSTRATIOU, A.; SCHMITT, M. P.; TON-THAT, H.; TAUCH, A. **Pangenomic study of *Corynebacterium diphtheriae* that provides insights into the genomic diversity of pathogenic isolates from cases of classical diphtheria, endocarditis, and pneumonia.** *J. Bacteriol.*, v. 194, p. 3199-3215, 2012.

TSENG, H. J.; MCEWAN, A.G.; APICELLA, M.A.; JENNINGS, M.P. **OxyR acts as a repressor of catalase expression in *Neisseria gonorrhoeae*.** *Infect. Immun.*, v. 71, n. 1, p. 550-556, 2003.

VAROL, B.; EDIS, B. Ö.; BEKTAS, M. **Toxin Structure, Delivery and Action.** In *Corynebacterium diphtheriae and Related Toxigenic Species*, pp. 83-91. Edited by A. Burkovski: Springer Netherlands. 2014.

VASIL'EVA, S. V.; STUPAKOVA, M. V.; LOBYSHEVA, I. I.; MIKOYAN, V. D.; VANIN, A. F. **Activation of the *Escherichia coli* SoxRS-regulon by nitric oxide and its physiological donors.** *Biochem (Mosc).*, v. 66, p. 984–988, 2001.

- VERNEUIL, N.; SANGUINETTI, M.; BRETON, Y.; POSTERARO, B.; FADDA, G.; AUFRAY, Y.; HARTKE, A.; GIARD, J. **Effects of the *Enterococcus faecalis* hypR gene encoding a new transcriptional regulator on oxidative stress response and intracellular survival within macrophages.** *Infect. Immun.*, v. 72, n. 8, p. 4424-4431, 2004.
- VIGUETTI, S. Z.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V.; SOARES, S. C.; GUIISO, N.; PACHECO, L. G. C.; BOLT, F.; SANTOS, L. S.; ROSSO, M. L.; HIRATA Jr, R.; BALDWIN, A.; MATTOS-GUARALDI, A. L.; DOWSON, C. G. **Multilocus sequence types of invasive *Corynebacterium diphtheriae* isolated in the Rio de Janeiro urban area, Brazil.** *Epidemiology and Infection (Online)*, v.14, p.1 - 4, 2011.
- WAGGONER, L. E., ZHOU, G. T. ; SCHAFFER, R. W. ; SCHAFFER, W. R. **Control of alternative behavioral states by serotonin in *Caenorhabditis elegans*.** *Neuron*, v. 21, p. 203–214, 1998.
- WAGNER, K. S.; WHITE, J. M.; CROWCROFT, N. S.; DE MARTIN, S.; MANN, G.; EFSTRATIOU, A. **Diphtheria in the United Kingdom, 1986–2008: the increasing role of *Corynebacterium ulcerans*.** *Epidemiol. Infect.*, v. 138, p. 1519-1530, 2010.
- WALKER, G. C. **Inducible DNA Repair Systems.** *Ann. Rev. Biochem.*, v. 54, p. 425-457, 1985.
- WANG, J.; LONDON, E. **The Membrane topography of diphtheria toxin T domain Linked to the A chain reveals a transient transmembrane hairpin and potential translocation mechanisms.** *Biochem.*, v. 48, p. 10446–10456, 2009.
- WANG, X.; LI, M.; LIU, L.; MOU, R.; ZHANG, X.; BAI, Y.; XU, H.; QIAO, M. **DsbM, a novel disulfide oxidoreductase affects aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa* by OxyR-regulated response.** *J. Microbiol.*, v. 50, n. 6, p. 932-938, 2012.
- WANG, Z.; WANG, S.; WU, Q. **Cold shock protein A plays an important role in the stress adaptation and virulence of *Brucella melitensis*.** *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 354, p. 27–36, 2014.
- WAN-SOO, K.; PARK, S. D.; LEE, S. M.; KIM, Y.; KIM, P.; LEE, H. S. **Expression Analysis of the csp-like Genes from *Corynebacterium glutamicum* Encoding Homologs of the *Escherichia coli* Major Cold-Shock Protein CspA.** *J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 17, n. 8, 1553-1560, 2007.
- WHITESIDE, C.; HASSAN, H. M. **Induction and inactivation of catalase and superoxide dismutase of *Escherichia coli* by ozone.** *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 257, p. 467–471, 1987.
- YAMAIZUMI, M.; MEKADA, E.; UCHIDA, T.; OKADA, Y. **One molecule of diphtheria toxin fragment A introduced into a cell can kill the cell.** *Cell*, v. 15, p. 245-250, 1978.
- YAMANAKA, K.; FANG, L.; INOUE, M. **The Csp A family in *Escherichia coli*: multiple gene duplication for stress adaptation.** *Mol. Microbiol.*, v.27, p. 247–255, 1998.

YANAGAWA, R.; HONDA, E. **Presence of Pili in Species of Human and Animal parasites and pathogens of the genus *Corynebacterium***. *Infect. Immun.*, v. 13, p. 1293-1295, 1976.

YIN, X.; WHEATCROFT, R.; CHAMBERS, J. R.; LIU, B.; ZHU, J.; GYLES, C. L. **Contributions of O island 48 to adherence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to epithelial cells in vitro and in ligated pig ileal loops**. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 75, p. 5779-86, 2009.

ZASADA, A. A.; ZALESKA, M.; PODLASIN, R. B.; SEFERYNKA, I. **The first case of septicemia due to nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae* in Poland: case report**. *Ann. Clin. Microbiol. and Antimicrob.*, v. 4, p.1-3, 2005.

ŽGUR-BERTOK, D. **DNA damage repair and bacterial pathogens**. *PLoS Pathog.*, v. 9, n. 11, p. e1003711, 2013.

ZHENG, M.; STORZ, G. **Redox sensing by prokaryotic transcription factors**. *Biochem. Pharmacol.*, v.59, n.1, p.1-6, 2000.

ZHOU, G.; SHI, Q. S.; OUYANG, Y. S.; CHEN, Y. B. **World involvement of outer membrane proteins and peroxide-sensor genes in *Burkholderia cepacia* resistance to isothiazolone**. *J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 30, p. 1251-1260, 2014.

ANEXO



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCANTARA GOMES



COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº CEUA/029/2015 sobre "Caracterização molecular e análise da expressão bacteriana na formação *in vitro* e *in vivo* de biofilmes" sob a responsabilidade de Raphael Hirata Jr, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEUA), em 28/07/2015. Este certificado expira em 28/07/2019.

Rio de Janeiro, 28 de Julho de 2015.

Prof. Dr. Israel Felzenszwalb
CEUA/IBRAG/UERJ

Profa. Dra. Patricia C. Lisboa
CEUA/IBRAG/UERJ