



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Andrezza do Espírito Santo Cucinelli

Toxina Shiga-*like* e hemolisina TlyA em cepas de *Corynebacterium diphtheriae*: identificação, caracterização funcional e influência no potencial de virulência

Rio de Janeiro

2022

Andrezza do Espírito Santo Cucinelli

**Toxina Shiga-like e hemolisina TlyA em cepas de *Corynebacterium diphtheriae*:
identificação, caracterização funcional e influência no potencial de virulência**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Ana Luiza de Mattos Guaraldi

Coorientadora: Prof^ª. Dra. Alessandra Mattos Saliba

Rio de Janeiro

2022

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

C963 Cucinelli, Andrezza do Espírito Santo.
Toxina Shiga-like e hemolisina TlyA em cepas de *Corynebacterium diphtheriae*: identificação, caracterização funcional e influência no potencial de virulência / Andrezza do Espírito Santo Cucinelli – 2022.
171f.

Orientadora: Prof^a. Dra. Ana Luiza de Mattos Guaraldi
Coorientadora: Prof^a. Dra. Alessandra Mattos Saliba

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

1. *Corynebacterium diphtheriae* – Patogenicidade – Teses. 2. Toxina Shiga-like – Genética. 3. Hemolisina – Genética. I. Guaraldi, Ana Luiza de Mattos. II. Saliba, Alessandra Mattos. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 616.98

Bibliotecário: Felipe Caldonazzo
CRB7/7341

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

Assinatura

Data

Andrezza do Espírito Santo Cucinelli

**Toxina Shiga-like e hemolisina TlyA em cepas de *Corynebacterium diphtheriae*:
identificação, caracterização funcional e influência no potencial de virulência**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 29 de junho de 2022.

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Ana Luiza de Mattos Guaraldi (Orientadora)
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Prof.^a Dra. Ana Claudia de Paula Rosa Ignacio
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Prof.^a Dra. Louisy Sanches dos Santos Sant'Anna
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

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

Prof. Dr. Felipe Piedade Gonçalves Neves
Universidade Federal Fluminense

Rio de Janeiro

2022

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese a minha família por todo amor, carinho e atenção que me deram e por não terem medido esforços em prol de minha boa formação, me mantendo sempre no caminho do bem. Amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

A minha mãe Ilsa, por todo carinho e dedicação. Por nunca ter deixado que eu desistisse e por ter feito o possível e o impossível por mim.

Aos meus irmãos, Roberta e Marcello, por todo o apoio, carinho e ensinamentos, ajudando a me transformar na pessoa que sou hoje.

Ao meu sobrinho Roberto por ter dividido comigo todos os ensinamentos, desde os primeiros dias de vida, e me permitir ter vivido a infância juntos, como um irmão para mim.

À minha querida orientadora e Professora Dra. Ana Luíza de Mattos Guaraldi, pela orientação, dedicação, paciência, carinho, pelo aprendizado e confiança investidos em mim e por estimular meu interesse pela pesquisa científica.

À minha prezada orientadora e Professora Dra. Alessandra Mattos Saliba, por ter me aceitado como aluna e pela orientação, dedicação, paciência e carinho. Por sempre estar disposta e disponível a me ensinar e pela grande ajuda fornecida.

As minhas amigas queridas, que conheci ao longo do desenvolvimento deste trabalho, mas que se tornaram amigas fora dos “domínios” do laboratório, Dra. Elisabete Cappelli, Dra. Louisy Sanches Sant’Anna, Dra. Cíntia Santos e Dra. Mônica Souza. Obrigada por dividirem comigo alegrias, preocupações, sorrisos e agonias. Obrigada pelo apoio, companheirismo, incentivo, carinho e por toda a preocupação que sempre tiveram comigo. Sem vocês, nada disso teria sido possível!

Aos amigos dos Laboratórios 3 e 4, por estarem sempre torcendo, colaborando e divertindo todos os momentos.

Aos professores e secretários do Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, em especial para o João Paulo, pela contribuição na realização das atividades acadêmicas e burocráticas, necessárias para o desenvolvimento deste trabalho.

Se não puder voar, corra
Se não puder correr, ande
Se não puder andar, rasteje
Mas continue em frente de qualquer jeito.

Martin Luther King Junior

RESUMO

CUCINELLI, Andrezza do Espírito Santo. **Toxina Shiga-like e hemolisina TlyA em cepas de *Corynebacterium diphtheriae***: identificação, caracterização funcional e influência no potencial de virulência. 2022. 171 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

As manifestações clínicas observadas nas infecções por *Corynebacterium diphtheriae*, principal agente etiológico da difteria, são frequentemente associadas à ação da toxina diftérica (TD), seu principal fator de virulência. No entanto, cepas não produtoras de TD têm sido isoladas de infecções invasivas e estudos recentes vem demonstrando o envolvimento de mecanismo multifatorial na sua patogenicidade. A análise do pangenoma desta espécie identificou a presença de 57 ilhas genômicas, indicando que a transferência horizontal de genes é uma estratégia frequentemente utilizada pelas corinebactérias para estabelecer diferenças nas interações patógeno-hospedeiro. Diversos trabalhos indicam que os genes codificadores da toxina Shiga são passíveis de transferência entre espécies. Em *Corynebacterium ulcerans* a proteína Rbp, similar à cadeia A da toxina Shiga de *Escherichia coli* (SLT-1), cuja função é impedir a síntese de ribossomos provocando morte celular, foi identificada. Adicionalmente, os genes codificadores de hemolisinas, outro importante fator de virulência, são capazes de causar lesão celular através da formação de poros. Os genes da alfa-hemolisina (HlyA) de *E. coli* e, de outras espécies bacterianas, também são passíveis de transferência horizontal. Algumas cepas de *C. diphtheriae* parecem ser produtoras de hemolisinas específicas, uma vez que são classificadas quanto à atividade hemolítica. O sequenciamento genômico de *C. diphtheriae* biovar *gravis* cepa NCTC 13129 identificou a sequência de uma proteína hipotética, semelhante a hemolisina (TlyA) de *Mycobacterium tuberculosis*. Neste sentido, foi demonstrada a presença e a expressão de genes semelhantes às toxinas Shiga-like e hemolisina, em diferentes espécies de *Corynebacterium*. Pesquisas *in silico* da presença dos genes *rbp* (toxina Shiga-like) e *tlyA* (hemolisina) nas espécies de *Corynebacterium* foram realizados. Adicionalmente, os seguintes experimentos para a confirmação fenotípica foram desenvolvidos: i) construção de cepa mutante para os genes alvos; ii) padronização de PCR e RT-qPCR; iii) expressão gênica em PCR por tempo real; iv) ensaios de citotoxicidade em células Vero; v) influência de diferentes condições ambientais na expressão destes genes, e vi) potencial artrítogênico em modelos animais (murinos). Os resultados obtidos através de análises de bioinformática demonstraram que diferentes espécies de *Corynebacterium* apresentavam genes que codificam proteínas com expressiva homologia para as toxinas Rbp e TlyA. Os dados dos ensaios fenotípicos verificaram os efeitos citotóxicos destas proteínas em diferentes cepas de *C. diphtheriae* analisadas. Em conclusão, as cepas de *C. diphtheriae* isoladas de casos de difteria e/ou infecções invasivas podem também utilizar a produção de hemolisina TlyA e de toxina Shiga-like nos mecanismos cepa-dependentes de patogenicidade. Estudos adicionais relacionados a esses fatores de virulência permanecem em andamento tanto para *C. diphtheriae* quanto para outras corinebactérias de relevância clínica.

Palavras - chave: *Corynebacterium diphtheriae*. Toxina Shiga-like. Hemolisina. Gene *tlyA*. Gene *rbp*.

ABSTRACT

CUCINELLI, Andrezza do Espírito Santo. **Shiga-like toxin and TlyA hemolysin in *Corynebacterium diphtheriae*: identification, functional characterization and influence on virulence potential.** 2022. 171 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

The clinical features observed in cases of classic diphtheria caused by *Corynebacterium diphtheriae* are associated with diphtheria toxin production (DT), its main virulence factor. However, non-DT-producing strains have been isolated from invasive infections. Recent studies have demonstrated the involvement of a multifactorial virulence mechanism expressed by *C. diphtheriae* strains. The analysis of the pangenome of this species identified the presence of 57 genomic islands, indicating that horizontal gene transfer is a strategy frequently used by corynebacteria to establish differences in pathogen-host interactions. Several studies indicate that the genes encoding Shiga toxin are transferable between species. In *Corynebacterium ulcerans*, the Rbp protein, similar to the A chain of *Escherichia coli* Shiga toxin (SLT-1), whose function is to inhibit the synthesis of ribosomes causing cell death, was previously identified. Additionally, genes encoding hemolysins, another important virulence factor, may cause cell damage through pore formation. The alpha-hemolysin (HlyA) genes from *E. coli* and other bacterial species are also capable of horizontal transfer. Some *C. diphtheriae* strains possibly produce specific hemolysins, as they are classified according to hemolytic activity. Genomic sequencing of *C. diphtheriae* biotype *gravis* NCTC 13129 strain identified the sequence of a hypothetical hemolysin-like protein (TlyA) from *Mycobacterium tuberculosis*. Therefore, the presence and expression of genes similar to Shiga-like toxins and hemolysin were demonstrated in different *Corynebacterium* species. Additionally, the following experiments for the investigation of phenotypic expression were performed: i) construction of mutant strains for the target genes; ii) gene expression by real-time PCR; iii) Vero cell cytotoxicity assays; iv) influence of environmental conditions on the expressions of these genes; v) arthritogenic potential using an animal model (murine). Data obtained through bioinformatics analysis showed that different *Corynebacterium* species presented genes that encode proteins with expressive homology to the toxins Rbp (Shiga-like toxin) and TlyA (hemolysin) toxins. Phenotypic assays verified the cytotoxic effects of these proteins on different *C. diphtheriae* strains. In conclusion, *C. diphtheriae* strains isolated from cases of diphtheria and/or invasive infections may also utilize the production of TlyA hemolysin and Shiga-like toxin in the strain-dependent mechanisms of pathogenicity. Additional studies related to these virulence factors remain ongoing for both *C. diphtheriae* and other clinically relevant corynebacteria.

Keywords: *Corynebacterium diphtheriae*. Shiga-like toxin. Hemolysin. *tlyA* gene. *rbp* gene

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-------------|--|----|
| Figura 1 - | Análise da proteína Rbp de <i>Corynebacterium ulcerans</i> cepa 809 | 36 |
| Figura 2 - | Patogênese da infecção do trato urinário por <i>Escherichia coli</i> uropatogênica | 37 |
| Figura 3 - | Modelo de secreção de tipo 1 | 39 |
| Figura 4 - | Representação circular do cromossomo de <i>Corynebacterium diphtheriae</i> cepa NCTC 13129 | 42 |
| Figura 5 - | Alinhamento das sequências de aminoácidos de Rbp de <i>Corynebacterium diphtheriae</i> e <i>Corynebacterium ulcerans</i> | 73 |
| Figura 6 - | Modelos tridimensionais análogos a proteína Shiga-like encontrada em cepa de <i>Corynebacterium diphtheriae</i> HC04 | 75 |
| Figura 7 - | Predição do peptídeo sinal das proteínas Rbp de <i>Corynebacterium ulcerans</i> cepa 809 e de Shiga-like de <i>Corynebacterium diphtheriae</i> cepa HC04 | 76 |
| Figura 8 - | Predição das regiões transmembranas das proteínas Rbp de <i>Corynebacterium ulcerans</i> cepa 809 e de Shiga-like de <i>Corynebacterium diphtheriae</i> cepa HC04..... | 77 |
| Figura 9 - | Análise filogenética da família de proteínas Rbp de <i>Corynebacterium ulcerans</i> 809 e cepas de <i>Corynebacterium diphtheriae</i> | 78 |
| Figura 10 - | Eletroforese em gel de agarose 1,2% com o produto da amplificação do gene codificador da proteína Shiga-like de <i>C. diphtheriae</i> | 79 |
| Figura 11 - | Curva padrão da eficiência de amplificação dos iniciadores utilizados nos ensaios de RT-qPCR | 80 |
| Figura 12 - | Curvas de dissociação contínua obtidas para os produtos amplificados relativos aos transcritos do gene alvo e do gene normalizador | 81 |
| Figura 13 - | Quantificação relativa da expressão do gene <i>rbp</i> codificador da toxina Shiga-like em cepas de <i>Corynebacterium diphtheriae</i> após incubação a 37°C | 82 |
| Figura 14 - | Curva de amplificação para os genes analisados | 83 |
| Figura 15 - | Quantificação relativa da expressão do gene codificador da toxina Shiga-like em <i>Corynebacterium diphtheriae</i> cepa HC01 após incubação em diferentes temperaturas | 84 |
| Figura 16 - | Análise da citotoxicidade de <i>Corynebacterium diphtheriae</i> cepa HC01 após variações de temperatura | 85 |
| Figura 17 - | Alinhamento das sequências de aminoácidos da proteína TlyA das diferentes espécies de corinebactérias..... | 90 |

| | |
|--|-----|
| Figura 18 - Modelos tridimensionais para a hemolisina em <i>Streptococcus thermophilus</i> e <i>Corynebacterium diphtheriae</i> | 92 |
| Figura 19 - Ausência de hélices transmembranares para a TlyA de <i>Corynebacterium diphtheriae</i> | 93 |
| Figura 20 - Árvore filogenética da família de proteínas TlyA de corinebactérias | 94 |
| Figura 21 - Eletroforese em gel de agarose 1,2 % com o produto da amplificação do gene <i>tlyA</i> de cepas de <i>C. diphtheriae</i> não produtoras de toxina diftérica | 96 |
| Figura 22 - Eletroforese em gel de agarose 1,2 % com o produto da amplificação do gene <i>tlyA</i> de cepas de <i>C. diphtheriae</i> produtoras de toxina diftérica | 97 |
| Figura 23 - Eletroforese em gel de agarose 1,2% com o produto da PCR | 98 |
| Figura 24 - Avaliação da presença dos genes <i>tox</i> e <i>dtxR</i> na cepa mutante LDCIC-A1..... | 98 |
| Figura 25 - Análise morfo-tintorial de cepas de <i>Corynebacterium diphtheriae</i> | 99 |
| Figura 26 - Caracterização fenotípica pelo sistema API®Coryne das cepas de <i>C. diphtheriae</i> NCTC 13129 e LDCIC-A1 | 99 |
| Figura 27 - Percentuais de aderência e internalização a células HEp-2 de <i>C. diphtheriae</i> | 100 |
| Figura 28 - Comparação da capacidade hemolítica entre as cepas <i>C. diphtheriae</i> NCTC 13129 e a cepa mutante LDCIC-A1 | 102 |
| Figura 29 - Quantificação da atividade hemolítica por <i>Corynebacterium diphtheriae</i> | 103 |
| Figura 30 - Atividade hemolítica favorecida em ambiente de microaerofilia de <i>Corynebacterium diphtheriae</i> , representada pela cepa NCTC 13129 | 104 |
| Figura 31 - Formação de biofilme em poliestireno por cepas de <i>C. diphtheriae</i> , produtoras e não produtoras toxina diftérica | 105 |
| Figura 32 - Padrão de aderência e formação de biofilme em vidro por cepas de <i>Corynebacterium diphtheriae</i> | 106 |
| Figura 33 - Análise quantitativa da formação de biofilme por <i>Corynebacterium diphtheriae</i> em poliestireno e vidro | 107 |
| Figura 34 - Influência do ferro na formação de biofilme em vidro em <i>Corynebacterium diphtheriae</i> | 108 |
| Figura 35 - Micrografias histopatológicas de articulações de membros posteriores de camundongos infectados experimentalmente pela veia caudal com cepas de <i>C. diphtheriae</i> NCTC 13129 e LDCIC-A1 | 110 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-------------|--|-----|
| Tabela 1 - | Cepas, células e plasmídeos utilizados no presente estudo | 48 |
| Tabela 2 - | Células utilizadas no presente estudo | 49 |
| Tabela 3 - | Sequências oligonucleotídicas iniciadoras para os genes normalizador e alvo.. | 53 |
| Tabela 4 - | Sequências oligonucleotídicas iniciadoras para o gene <i>Shiga-like</i> de <i>Corynebacterium diphtheriae</i> | 60 |
| Tabela 5 - | Análise da proteína Rbp de <i>C. ulcerans</i> 809 (CULC809_00177) com diferentes cepas de <i>Corynebacterium diphtheriae</i> | 71 |
| Tabela 6 - | Análise da proteína Rbp (CDHC04_0155) de <i>Corynebacterium diphtheriae</i> HC04 com demais cepas <i>Corynebacterium diphtheriae</i> | 72 |
| Tabela 7 - | Microrganismos que apresentaram homologia com a sequência proteica de TlyA de <i>C. diphtheriae</i> NCTC 13129 | 86 |
| Tabela 8 - | Análise da proteína TlyA entre as diferentes cepas de <i>Corynebacterium diphtheriae</i> | 89 |
| Tabela 9 - | Identificação de outros genes relacionados a hemolisina em <i>Corynebacterium diphtheriae</i> | 95 |
| Tabela 10 - | Origem e caracterização de cepas de <i>Corynebacterium diphtheriae</i> quanto ao potencial de produção de TD e atividade hemolítica (AH) | 101 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|----------|---|
| AM | Ácido micólico |
| ATCC | <i>American Type Culture Collection</i> |
| BLAST | <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> |
| CAMP | Christie, Atkins e Munch-Petersen |
| CDC | <i>Center for Disease Control and Prevention</i> |
| CdiLAM | Lipomanana ou Lipoarabinomanana de <i>Corynebacterium diphtheriae</i> |
| cDNA | DNA complementar |
| CT | <i>Cycle threshold</i> |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| DNase | Desoxirribonuclease |
| dNTPs | Desoxirribonucleotídeos trifosfatados |
| DO | Densidade óptica |
| DEPEC | Dietilpirocarbonato |
| DT | Difteria – tétano |
| DTP | Difteria – tétano - <i>pertussis</i> |
| DTxR | <i>Diphtheria toxin repressor</i> |
| E | Eficiência da reação |
| ECDC | <i>European Center for Disease Control</i> |
| EDTA | Ácido etilenodiamino tetracético |
| EF-2 | Fator de alongamento 2 |
| EUA | Estados Unidos da América |
| FCM | Faculdade de Ciências Médicas |
| Gb3 | Receptor glicosíngolípídeo globotriaosilceramida |
| HC | Hemocultura |
| HEp-2 | Células epiteliais de carcinoma de laringe humana |
| IL | Interleucina |
| INCA | Instituto Nacional do Câncer |
| LAM | Lipoarabinomanana |
| LB | Luria Bertani |
| LCDIC | Laboratório de Difteria e Corinebactérias de Importância Clínica |
| LM | Lipomanana |
| LPS | Lipopolissacarídeo |
| MALD-TOF | <i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight</i> |
| MEM | Meio de cultura <i>Eagle's Minimal Essential</i> |
| MLST | Tipagem de sequência multiloco |
| MOI | Multiplicidade de infecção |
| mRNA | Ácido ribonucleico mensageiro |
| NAD | Nicotinamida adenina dinucleotídeo |
| NCBI | <i>National Center for Biotechnology Information</i> |
| NCTC | <i>National Collection of Type Cultures</i> |

| | |
|-----------------------|--|
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| PAIs | Ilhas de patogenicidade |
| PBS | Solução salina tamponada fosfatada |
| PCR | Reação em cadeia da polimerase |
| PLD | Fosfolipase D |
| PM | Peso molecular |
| PW8 | Park-Williams número 8 |
| <i>rbp</i> | Gene <i>rbp</i> |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| RNase | Ribonuclease |
| ROS | Espécies reativas de oxigênio |
| rRNA | Ácido ribonucleico ribossomal |
| RT-qPCR | <i>Reverse Transcriptase Quantitative PCR</i> |
| SAC | Sacarose |
| SAD | Soro anti-diftérico |
| SFB | Soro fetal bovino |
| ST | Sequência tipo |
| Taq | <i>Thermus aquaticus</i> |
| TD | Toxina diftérica |
| TD-A | Fragmento A da toxina diftérica |
| TD-B | Fragmento B da toxina diftérica |
| <i>Te^R</i> | Resistência ao telurito |
| T1SS | Sistema de secreção tipo I |
| <i>tlyA</i> | Gene <i>tlyA</i> |
| TM | Temperatura média |
| TNF | Fator de Necrose Tumoral |
| TOX- | Não produtora de toxina diftérica |
| TOX+ | Produtora de toxina diftérica |
| <i>tox</i> | Gene <i>tox</i> |
| TR | Trato respiratório |
| TRS | Trato respiratório superior |
| TSA | Meio de cultura ágar tripton de soja |
| TSB | Caldo tripton de soja |
| UERJ | Universidade do Estado do Rio de Janeiro |
| UFC | Unidades formadoras de colônia |
| UK | Reino Unido |
| UNICEF | Fundo das Nações Unidas para a Infância |
| UPEC | <i>Escherichia coli</i> uropatogênica |
| UV | Radiação ultravioleta |
| VERO | Células epiteliais de rim de macaco verde africano |
| WHO | <i>World Health Organization</i> |

SUMÁRIO

| | | |
|-------|---|----|
| | INTRODUÇÃO | 16 |
| 1 | JUSTIFICATIVA | 43 |
| 2 | OBJETIVOS | 45 |
| 2.1 | Geral | 45 |
| 2.2 | Específicos | 45 |
| 3 | MATERIAL E MÉTODOS | 47 |
| 3.1 | Origem das cepas bacterianas e condições de cultivo | 47 |
| 3.2 | Investigação da Toxina Shiga-like em <i>Corynebacterium diphtheriae</i> | 49 |
| 3.2.1 | <u>Análise da proteína Shiga-like por bioinformática</u> | 49 |
| 3.2.2 | <u>Detecção do gene Shiga-like pela reação em cadeia da polimerase (PCR)</u> | 50 |
| 3.2.3 | <u>Avaliação da expressão do gene <i>rbp</i> por <i>Corynebacterium diphtheriae</i></u> | 51 |
| 3.2.4 | <u>Avaliação da influência da temperatura na expressão do gene <i>rbp</i> de <i>Corynebacterium diphtheriae</i></u> | 55 |
| 3.2.5 | <u>Ensaio de Citotoxicidade</u> | 55 |
| 3.2.6 | <u>Análise estatística</u> | 57 |
| 3.3 | Investigação de hemolisina em <i>Corynebacterium diphtheriae</i> | 57 |
| 3.3.1 | <u>Análise da hemolisina por bioinformática</u> | 57 |
| 3.3.2 | <u>Relações filogenéticas da proteína TlyA em <i>Corynebacterium diphtheriae</i></u> | 58 |
| 3.3.3 | <u>Detecção do gene <i>tlyA</i> pela reação em cadeia da polimerase (PCR)</u> | 58 |
| 3.3.4 | <u>Construção da cepa de <i>Corynebacterium diphtheriae</i> mutante LDCIC-A1</u> | 60 |
| 3.3.5 | <u>Ensaio de interação bacteriana com células HEP-2</u> | 62 |

| | | |
|--------|---|-----|
| 3.3.6 | <u>Atividade hemolítica em cepas de diferentes biovares de <i>Corynebacterium diphtheriae</i></u> | 62 |
| 3.3.7 | <u>Avaliação da formação de biofilme em superfície de poliestireno</u> | 63 |
| 3.3.8 | <u>Avaliação da formação de biofilme em superfície de vidro</u> | 64 |
| 3.3.9 | <u>Avaliação da formação de biofilme em vidro sobre condições limitantes de ferro</u> | 65 |
| 3.3.10 | <u>Potencial artritogênico da hemolisina TlyA de <i>Corynebacterium diphtheriae</i></u> | 65 |
| 3.3.11 | <u>Análise estatística</u> | 67 |
| 4 | RESULTADOS | 68 |
| 4.1 | Toxina Shiga-like em <i>Corynebacterium diphtheriae</i> | 68 |
| 4.1.1 | <u>Análise de bioinformática para a proteína Rbp Shiga-like</u> | 68 |
| 4.1.2 | <u>Relações filogenéticas da proteína Rbp de <i>Corynebacterium diphtheriae</i></u> | 77 |
| 4.1.3 | <u>Detecção do gene <i>rbp</i> por PCR</u> | 79 |
| 4.1.4 | <u>Avaliação da expressão do gene <i>rbp</i> de <i>Corynebacterium diphtheriae</i></u> | 80 |
| 4.1.5 | <u>Avaliação da influência da temperatura na expressão do gene <i>rbp</i> de <i>Corynebacterium diphtheriae</i></u> | 83 |
| 4.1.6 | <u>Citotoxicidade da toxina Shiga-like em <i>Corynebacterium diphtheriae</i></u> | 84 |
| 4.2 | Hemolisina TlyA em <i>Corynebacterium diphtheriae</i> | 85 |
| 4.2.1 | <u>Análise de Bioinformática para a Hemolisina (TlyA)</u> | 85 |
| 4.2.2 | <u>Relações filogenéticas da proteína TlyA em <i>Corynebacterium spp.</i></u> | 88 |
| 4.2.3 | <u>Detecção do gene <i>tlyA</i> por PCR</u> | 96 |
| 4.2.4 | <u>Interrupção do gene <i>tlyA</i> na cepa mutante LDCIC-A1</u> | 97 |
| 4.2.5 | <u>Ensaio de interação bacteriana com células epiteliais HEp-2</u> | 100 |
| 4.2.6 | <u>Atividade hemolítica em cepas de diferentes biovares de <i>Corynebacterium diphtheriae</i></u> | 101 |

| | | |
|-------|--|-----|
| 4.2.7 | <u>Influência das condições ambientais na expressão de hemolisina (TlyA)</u> | 103 |
| 4.2.8 | <u>Potencial artritogênico da hemolisina TlyA de <i>Corynebacterium diphtheriae</i></u> | 108 |
| 5 | DISCUSSÃO | 111 |
| | CONCLUSÕES | 120 |
| | REFERÊNCIAS | 121 |
| | APÊNDICE - Códigos de acesso ao genoma das amostras utilizadas no banco de dados públicos GenBank/NCBI – 2022 | 145 |
| | ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética | 146 |
| | ANEXO B – Artigos publicados em periódicos | 147 |
| | ANEXO C – Capítulos de livros | 150 |
| | ANEXO D – Aprovação em concurso público | 152 |
| | ANEXO E – Prêmios | 153 |
| | ANEXO F – Participação em bancas de graduação | 155 |
| | ANEXO G – Participação em congressos nacionais e internacionais | 158 |
| | ANEXO H – Prática docente | 162 |

INTRODUÇÃO

Difteria

A difteria é uma doença bacteriana que acomete principalmente o trato respiratório superior e a pele. O principal agente etiológico é *Corynebacterium diphtheriae*. A difteria clássica apresenta evolução aguda em função da produção e circulação da toxina diftérica (TD) no organismo do hospedeiro. Desta forma, apresenta manifestações locais, com a formação de uma pseudomembrana acinzentada, sinal patognomônico da doença. Efeitos sistêmicos são causados pela exotoxina de origem proteica, que apresenta tropismo pelo miocárdio, sistema nervoso e pelas glândulas suprarrenais (CERDEÑO-TÁRRAGA et al., 2003; MATTOS-GUARALDI et al., 2003; TRUELOVE et al., 2020; VIEIRA et al., 2022).

Apesar da vacinação e dos relevantes conhecimentos adquiridos durante os anos, as estratégias disponíveis para erradicá-la ainda são insuficientes (SABBADINI et al., 2010). As desigualdades na cobertura vacinal, principalmente a infantil, e da saúde reprodutiva e materna são significativamente piores em países afetados por conflitos (AKSEER et al., 2020), sendo uma das principais explicações da disseminação da difteria e de outras doenças preveníveis por vacinação entre refugiados. Estes dados, aliados a falta de infraestrutura sanitária adequada, maior resistência a antimicrobianos, menor cobertura vacinal e crise econômica, fatores agravados ainda mais pela pandemia de COVID-19, sugerem uma elevação, a nível mundial, do ressurgimento de doenças controláveis por vacinação nos próximos anos (AKSEER et al., 2020; CUCINELLI et al., 2021; DOOCY et al., 2019; TRUELOVE et al., 2020).

Atualmente, *C. diphtheriae*, *Corynebacterium ulcerans*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Corynebacterium belfantii* e *Corynebacterium rouxii* formam um grupo de patógenos potencialmente produtores de TD relacionados a processos infecciosos em humanos e/ou animais (BADELL et al., 2020; DAZAS et al., 2018; MATTOS-GUARALDI et al., 2011; VIEIRA et al., 2022).

Desde meados de 1900, quando ocorreu a maior epidemia de difteria em países do Leste Europeu, muitos estudos foram realizados para entender a fisiopatologia da doença, desenvolver formas de prevenção e tratamento, obtendo uma expressiva redução na sua mortalidade. Assim, a difteria passou a não ser mais considerada uma grande ameaça à saúde

pública e foi amplamente esquecida. Diferentes trabalhos científicos fizeram suposições inadequadas, como: a de que a vacinação conferia imunidade contra a colonização, a imunidade é vitalícia e não diminui com o tempo e que apenas indivíduos sintomáticos são infecciosos (TRUELOVE et al., 2020). No entanto, durante as últimas décadas foram verificadas características clínicas e epidemiológicas incomuns de casos de difteria, incluindo surtos entre adultos e crianças completamente imunizados (SANTOS et al., 2014; VIGUETTI et al., 2012), e o surgimento de *C. ulcerans* como o principal agente causador da difteria zoonótica em alguns países (DIAS et al., 2011b; MATTOS-GUARALDI et al., 2008; OKAMOTO et al., 2018; SIMPSON-LOURÊDO et al., 2019; YASUDA et al., 2018).

Além disso, infecções atípicas causadas por cepas de *C. diphtheriae* e *C. ulcerans*, não produtoras de TD, têm sido cada vez mais relatadas (SANTOS et al., 2014; VIGUETTI et al., 2012), o que sugere que outros fatores de virulência podem ser expressos por cepas patogênicas, além da produção da TD (HIRATA-JUNIOR. et al., 2008; VIEIRA et al., 2022).

Aspectos Microbiológicos

Atualmente, o gênero *Corynebacterium* compreende mais de 135 espécies descritas, sendo *C. diphtheriae* a espécie mais conhecida. Caracterizada por apresentar células bacterianas em forma de bastonetes Gram-positivos, pleomórficos, que tendem a formar arranjos em padrões de paliçadas e/ou letras chinesas, aeróbicos, imóveis e não formadores de esporos (CERDEÑO-TÁRRAGA et al., 2003).

Do ponto de vista bioquímico, *C. diphtheriae* é capaz de produzir catalase, reduzir o nitrato e o telurito, além de fermentar carboidratos, especialmente glicose, maltose e ribose. Além disso, são pirazinamidase, urease e CAMP negativos (MURRAY, 2007); DNase positivos (PIMENTA et al., 2008a), podendo fermentar ou não a sacarose (MATTOS-GUARALDI; FORMIGA, 1991).

Devido a sua complexidade bioquímica, a espécie já foi subdividida em quatro variedades classificadas em biovars: *gravis*, *mitis*, *intermedius* e *belfanti*, de acordo com as diferentes características fenotípicas, tais como: forma das colônias no ágar chocolate telurito, padrões bioquímicos e seu potencial de hemólise (FUNKE et al., 1997). Atualmente existem três biovars, uma vez que o biovar *belfanti*, a partir de estudos genômicos, foi elevado à

categoria de espécie, em 2018, *C. belfantii* (DAZAS et al., 2018). Estudos indicam que a variação genômica de *C. diphtheriae* não suporta a separação de cepas em biovars, e sim na sequência tipo (ST) utilizando a tipagem de sequência multiloco (MLST), mais adequada para investigar a dinâmica evolutiva a longo tempo (MAIDEN, 2006; SANGAL; HOSKISSON, 2016; TROST et al., 2012). Os estudos utilizando MLST não observaram correlação entre os STs e os biovars, a severidade da doença e as diferentes cepas, também foi demonstrada a ampla disseminação de cepas *C. diphtheriae* pelo mundo (BOLT et al., 2010; DU PLESSIS et al., 2017; FARFOUR et al., 2012; SANGAL; HOSKISSON, 2016). Apesar da classificação em biovars ser complexa, por razões históricas, ainda permanece rotineiramente utilizada, inclusive em laboratórios de referência (SANGAL; HOSKISSON, 2016).

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 produtoras de TD, *C. ulcerans* e *C. pseudotuberculosis*, ambas de importância veterinária, podem causar infecções em humanos (DIAS et al., 2011c; MATTOS-GUARALDI et al., 2011; OKAMOTO et al., 2018; WAGNER et al., 2010a). Recentemente, *C. ulcerans* tem sido cada vez mais isolado de animais de companhia, como gatos ou cães, inclusive em regiões urbanas no Brasil (DIAS et al., 2010; HACKER et al., 2016; SIMPSON-LOUREDO et al., 2014). A ocorrência de difteria e outros tipos de infecções causadas por *C. ulcerans* tem superado os casos por *C. diphtheriae* em diversos países, incluindo países europeus, Estados Unidos e Japão (HACKER et al., 2016; MOORE et al., 2015; OTSHUDIEMA et al., 2021; OTSUJI et al., 2019). Diante da possibilidade de difteria no país, o Ministério da Saúde emitiu, em 2010, nota técnica estabelecendo medidas de controle, notificação e tratamento (BRASIL, 2010).

As manifestações clínicas da difteria por *C. ulcerans* são similares às causadas pelo *C. diphtheriae*, inclusive a formação de pseudomembrana e as lesões cutâneas típicas (DIAS et al., 2011b; WAGNER et al., 2012) e atípicas (DIAS et al., 2011b; WAGNER et al., 2001). No entanto, algumas manifestações são atribuídas à presença de fosfolipase D (PLD), como ulceração de mucosas, necrose e pneumonia (DIAS et al., 2011b). Este patógeno foi relatado em outros tipos de infecção, tendo como fonte objetos, indicando tratar-se de uma espécie em circulação no ambiente (LEITZ; LEITZ; SCHALLER, 2013; MATTOS-GUARALDI et al., 2008). Esses dados sugerem que outros fatores de virulência podem ser expressos por cepas patogênicas, além da produção da TD (HIRATA-JUNIOR. et al., 2008; VIEIRA et al., 2022).

Aspectos Clínicos

O patógeno *C. diphtheriae* pode ser transmitido pelo contato direto do indivíduo doente, ou portador assintomático, com pessoas susceptíveis, através de gotículas produzidas pela nasofaringe e, eliminadas por tosse, espirro ou fala. Outra via de transmissão comum deste patógeno ocorre pelas lesões de pele, que podem ser mais contagiosas do que as do trato respiratório. Em casos raros, pode ocorrer a contaminação por fômites (CERDEÑO-TÁRRAGA et al., 2003; QUICK et al., 2000). O período de incubação da difteria é, em geral, de 1 a 6 dias, podendo ser mais longo, enquanto o período de transmissibilidade tem duração média de até 2 semanas após o início dos sintomas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

Os primeiros sinais/sintomas da doença são inespecíficos, de evolução subaguda, que se assemelham aos quadros de viroses respiratórias, caracterizados por mal-estar geral, febre baixa, dor de garganta e perda do apetite, denominados no meio científico como sinais prodrômicos. 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. Pode-se observar a formação de pseudomembrana acinzentada principalmente nas regiões de tonsila, oro e nasofaringe. 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 confere aparência de “pescoço de touro”, sinal patognomônico da doença, juntamente com a pseudomembrana (FARFOUR et al., 2012; MATTOS-GUARALDI et al., 2001).

A ação da toxina diftérica no miocárdio pode resultar em insuficiência cardíaca aguda, sendo fatal em aproximadamente 25 % dos casos. As manifestações neurológicas estão associadas com a gravidade dos sintomas respiratórios e levam a paralisia do palato e faringe, podendo evoluir para crânio e músculos da face, elevando o risco de broncoaspiração (FARFOUR et al., 2012; MATTOS-GUARALDI et al., 2001). Os distúrbios neurológicos desenvolvem-se semanas a meses após o início dos sintomas e são responsáveis por até 15 % dos casos fatais (TRUELOVE et al., 2020). Outras complicações incluem otite média e insuficiência respiratória devido à obstrução aérea, principalmente em crianças (FARFOUR et al., 2012; MATTOS-GUARALDI et al., 2001).

A difteria cutânea envolve o aparecimento de erupções ou úlceras na pele, podendo ocorrer a formação de pseudomembrana com bordas bem demarcadas, que ao se desprender deixa uma lesão serosa e hemorrágica. Neste tipo de infecção, as cepas são capazes de produzir toxina diftérica e, por isso, devem ser identificadas e analisadas. Qualquer lesão de pele crônica pode albergar o bacilo diftérico (CDC, 2015; WAGNER et al., 2010b).

Cepas de *C. diphtheriae* não produtoras de TD também são capazes de causar infecções, tais como faringite e tonsilite severas, além de infecções invasivas, como endocardite (CLINTON et al., 2013; HIRATA-JUNIOR. et al., 2008; MUTTAIYAH et al., 2011; SANTIS et al., 2020), bacteremia (GOMES et al., 2009; KATO et al., 2020; MATTOS-GUARALDI et al., 2001; ZASADA et al., 2005), pneumonia (TROST et al., 2012; YANG et al., 2018), artrite séptica (DIAS et al., 2011b; PEIXOTO et al., 2017; PULITI et al., 2006), abscesso esplênico (ALEXANDER, 1984) e osteomielite (PEIXOTO et al., 2016; POILANE et al., 1995), inclusive levando a óbito.

Além disso, quadros de difteria atípica, com ausência de formação de pseudomembrana, podem ocorrer em indivíduos parcialmente imunizados e infectados por cepas de *C. diphtheriae*, independentemente de sua capacidade de produção de toxina (CDC, 2015; FARFOUR et al., 2012; MATTOS-GUARALDI et al., 2001). Recentemente, dois casos de *C. diphtheriae* não produtor de TD foram diagnosticados, incidentalmente, em hemocultura de rotina pelo ensaio MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight*) e, confirmados por métodos convencionais e amplificados por PCR (reação em cadeia da polimerase) para os genes *tox* e *dtxR*. Em um dos casos, *C. diphtheriae* foi agente causador de infecção da corrente sanguínea, em um idoso diabético, com úlceras cutâneas crônicas não cicatrizantes na região dos dedos do pé, e doença vascular periférica (SHANMUGAM et al., 2021). No segundo caso, *C. diphtheriae* foi isolado de um abscesso intratonsilar em uma paciente do sexo feminino, de 21 anos de idade, na região metropolitana do Rio de Janeiro (CUCINELLI et al., 2021). Curiosamente, casos de mononucleose infecciosa concomitante com difteria por ambos os patógenos, *C. diphtheriae* e *C. ulcerans*, também podem ocorrer, especialmente em crianças parcialmente imunizadas (CYRIL et al., 2020; MATTOS-GUARALDI et al., 2011; SIMPSON-LOURÊDO et al., 2019; WELLINGHAUSEN et al., 2002; YASUDA et al., 2018).

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 a toxina ligada aos tecidos, apenas a circulante, e deve ser administrado o mais cedo possível após o diagnóstico clínico presuntivo, preferencialmente nas primeiras 48 horas da infecção, uma vez que a probabilidade de aumento da mortalidade praticamente dobra a cada dia de atraso, a partir do dia 5 do início dos sintomas (CDC, 2015; TRUELOVE et al., 2020).

Estudos apontam que a duração média da infecciosidade pode ser de até 2 semanas entre pacientes que recebem tratamento antimicrobiano para colonização respiratória. Esse dado diverge da recomendação atual da OMS (Organização Mundial de Saúde), sugerindo isolamento de apenas 48 horas nestes casos. Assim, um período de isolamento mais longo, de até 6 dias, ou até culturas negativas, como recomendado pelos Centros de Controle de Doenças e Prevenção e pela Academia Americana de Pediatria, são mais eficazes (COID, 2018; TRUELOVE et al., 2020).

Penicilina e eritromicina têm sido utilizados como drogas de escolha para a erradicação de *C. diphtheriae*. Contudo, a 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). Os dados enfatizam a necessidade de um levantamento contínuo da susceptibilidade aos antimicrobianos para esse patógeno, visto que já foram descobertos diversos genes relacionados a resistência antimicrobiana nas espécies do gênero *Corynebacterium* (HENNART et al., 2020; HIRATA, 2008; PIMENTA et al., 2008b; SANTOS et al., 2014; SIMPSON-LOURÊDO et al., 2019).

A prevenção da difteria clássica é realizada através da vacina preparada apenas com a TD inativada (toxóide diftérico), oriunda da cepa Park-Williams no. 8 (PW8), visando a produção de anticorpos antitoxina diftérica. 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 entre 12 e 23 meses, o segundo entre 4 e 7 anos de idade e o terceiro reforço entre 9 e 15 anos de idade. Em função da redução dos

títulos de anticorpos protetores, que devem ser $\geq 0,1$ UI/mL, com o decorrer do tempo, passou a ser administrada dose de reforço a cada 10 anos em adultos. No Brasil, desde 2012, o Programa Nacional de Imunizações (PNI) oferta a vacina pentavalente, indicada para prevenir contra a difteria, tétano, coqueluche, hepatite B e contra a bactéria *Haemophilus influenzae* tipo b. A vacina pentavalente é recomendada a partir dos 2, 4 e seis meses de vida e as doses de reforço, em crianças a partir de 1 ano, são realizados com a vacina adsorvida difteria, tétano e coqueluche (DTP). A partir de 2021, o Ministério da Saúde (MS) passou a disponibilizar a vacina hexavalente acelular, que inclui os mesmos patógenos da pentavalente acrescido da poliomielite. O esquema vacinal é realizado em três doses, aplicada a partir do segundo mês de vida, com intervalos de 2 meses até o sexto mês. A quarta dose, dose de reforço, deve ser aplicada após 15 meses da terceira dose, sendo a idade máxima para sua aplicação os 6 anos, 11 meses e 29 dias (TRUELOVE et al., 2020).

A vacinação e o tratamento reduzem substancialmente a taxa de mortalidade da doença. Segundo uma recente revisão sistemática, a taxa de mortalidade é em torno de 29 % entre os pacientes com difteria clássica não tratados e não vacinados (intervalo de credibilidade de 95 %). Além disso, os pesquisadores concluíram que crianças com idade inferior a 5 anos são mais propensas ao óbito do que pessoas com mais de 20 anos de idade e que, 31 % das infecções entre indivíduos não vacinados são assintomáticas. Nos surtos mais recentes, a mortalidade está concentrada entre os casos iniciais, que muitas vezes recebem tratamento inadequado devido a erro de diagnóstico (TRUELOVE et al., 2020).

Apenas a cobertura vacinal não é suficiente para interromper a transmissão de *C. diphtheriae* durante surtos epidêmicos. A vacinação deve estar associada com outras intervenções: a) administração de antitoxina diftérica, preferencialmente nas primeiras 48 horas, dos casos sintomáticos e, principalmente dos não-vacinados; b) rastreamento dos casos assintomáticos; c) aumento do período de isolamento para 6 dias após o início do tratamento antimicrobiano, ou até o surgimento de culturas negativas; d) antibiótico-profilaxia dos indivíduos contactantes; e f) administração em massa de antibióticos, principalmente azitromicina, para os portadores sintomáticos e assintomáticos, associados a vacinação durante o período de surtos e crises humanitárias, para o controle da difteria (SHARMA et al., 2019; TRUELOVE et al., 2020).

Atualmente existe uma negligência quanto a produção de antitoxina diftérica, uma vez que o estoque mundial contém doses de SAD suficientes apenas para o tratamento de 500 a 2.500 pacientes. Infelizmente, não existe outro produto autorizado pela OMS que possa

substituir a falta de SAD. Deste modo, estudos adicionais para desenvolver alternativas terapêuticas, como a utilização de anticorpos monoclonais humanos, permanecem necessários (TRUELOVE et al., 2020).

Análises genômicas poderão contribuir para o desenvolvimento de novas vacinas, incluindo proteínas de superfícies de células bacterianas e/ou outros fatores de virulência de *C. diphtheriae* e de *C. ulcerans*, que são de extrema relevância para aumentar o espectro de ação (SANGAL; HOSKISSON, 2016; VIEIRA et al., 2022).

Aspectos Epidemiológicos

As primeiras descrições clínicas da difteria datam do século XVI. Em 1890, Emil von Behring conseguiu produzir antitoxinas diftéricas, obtidas após inoculação de um cavalo e, assim, obteve a cura de pacientes infectados (MENZEL et al., 2013). Alguns anos depois, William H. Park e Anna W. Williams identificaram uma cepa de *C. diphtheriae* capaz de produzir grande quantidade de TD, chamada cepa Park-Williams no. 8 (PW8) (PARK, W. H. AND WILLIAMS, 1896) e, apenas em 1923, a vacina contra a TD foi produzida (EFSTRATIOU, 1998; MENZEL et al., 2013; TROST et al., 2012).

O perfil epidemiológico da difteria sofreu alterações ao longo dos anos, principalmente entre os períodos pré e pós-vacinação. O uso dessa vacina nas crianças dos países industrializados começou no final da década de 1930, se generalizando nas duas décadas seguintes. Com a vacinação infantil, ocorreu uma acentuada diminuição na incidência de difteria e na circulação de cepas de *C. diphtheriae* toxigênicas, o que resultou em um aumento menos natural dos níveis de anticorpos. Desta forma, os adultos deixaram de ter exposição natural ao bacilo e não recebiam doses de reforço da vacina, diminuindo sua imunidade induzida pela imunização infantil e se tornando, novamente, susceptíveis a doença (GALAZKA, 2000a; MATTOS-GUARALDI et al., 2003).

As mudanças na distribuição etária dos casos de difteria derivam de outros fatores além da vacinação: mudança nos padrões socioeconômicos, famílias menores, melhoria no padrão de vida, aumento de encontros sociais entre crianças e adolescentes de diferentes áreas, além da migração e deslocamento de muitas pessoas em decorrência de conflitos

políticos, sociais, econômicos e religiosos (MATTOS-GUARALDI et al., 2003; MELKER, H.E. DE; BERBERS, G.A.M.; NAGELKERKE; M.A.E. CONYN-VAN, 1999).

Na década de 1970, foi implementado o Programa Ampliado de Imunização da Organização Mundial de Saúde, através da vacina tríplice bacteriana (DTP), contendo os toxóides da difteria e do tétano e a bactéria *Bordetella pertussis* inativada, que estendeu a vacinação aos países em desenvolvimento (MATTOS-GUARALDI et al., 2003). No entanto, na década de 1990, reemergiram diversos surtos epidêmicos. O maior surto da era pós-vacinal ocorreu no Leste Europeu, que demonstrou a susceptibilidade de adultos na era vacinal, apresentando de 64 % a 82 % dos casos em pessoas acima de 15 anos de idade, sendo o perfil etário predominante entre 40 a 49 anos, com 5.000 mortes e mais de 157.000 casos registrados (GALAZKA, 2000b; MATTOS-GUARALDI et al., 2003).

Apesar do uso difundido da imunização nos países em desenvolvimento, a difteria permaneceu endêmica em várias regiões (GALAZKA; ROBERTSON, 1995; MATTOS-GUARALDI et al., 2003), incluindo África, Índia, Bangladesh, Vietnã, trópicos e áreas da América do Sul, inclusive o Brasil (FORMIGA, 1985). O perfil dos infectados continuou a ser predominantemente na população adulta (GALAZKA, 2000b; MOREIRA et al., 2003).

Os registros sobre a difteria no Brasil, no período anterior a 1980, são escassos, uma vez que os relatórios eram infreqüentes e a confirmação laboratorial não estava disponível (MATTOS-GUARALDI et al., 2003). Durante 1980 a 1999, um total de 27.134 casos de difteria foram relatados às autoridades de saúde pública no país, sendo que, aproximadamente 50 % desses, ocorreram na região Nordeste e 26 % (715 casos) foram relatados na região Sudeste (MATTOS-GUARALDI et al., 2003). Assim como observado nas epidemias da Europa, em São Paulo, e em outros estados, ocorreu maior incidência de casos de difteria entre adultos (CASAGRANDE et al., 2005; MATTOS-GUARALDI et al., 2001). No Rio de Janeiro, foi relato caso de difteria em uma mulher, de 32 anos, após contato com europeus. Ela declarou ter sido submetida ao esquema completo de imunização contra difteria (DTP-tríplice bacteriana) na infância e as doses de reforço (dT-dupla adulto) há dois anos. O diagnóstico confirmou que a cepa, *C. diphtheriae* biovar *gravis* (VA01), isolada da paciente, possuía capacidade de produzir toxina diftérica e não fermentava a sacarose, indicando tratar-se de um espécime comumente encontrado em diversos países europeus e responsável pela epidemia na região correspondente a antiga União Soviética (MATTOS-GUARALDI et al., 2001; SANTOS et al., 2015a). Ainda no Rio de Janeiro, a partir de uma paciente do sexo feminino, de 14 anos, que veio a óbito, observou-se a presença de cepa atípica, do biovar

mitis, capaz de fermentar a sacarose, diferentemente dos surtos apresentados em outras regiões do mundo, alertando para a inclusão da fermentação da sacarose nos testes diagnósticos para difteria (MATTOS-GUARALDI; FORMIGA, 1998).

No Brasil, surtos localizados, de pequena magnitude têm sido detectados desde 1980 até os dias atuais. Acredita-se que este perfil seja resultado da alta taxa de infecções cutâneas, que cria um reservatório de bacilos diftéricos. Um estudo realizado em crianças em idade escolar, no Rio de Janeiro, demonstrou que 15,09 % dos casos de lesões cutâneas estavam relacionadas a difteria cutânea, sendo 13,9 % relacionadas a cepas não toxigênicas (GALAZKA; ROBERTSON, 1995; MATTOS-GUARALDI et al., 2003). Não se pode descartar a possibilidade de subnotificação de casos no Brasil e, em outros países em desenvolvimento, devido à falta de esclarecimento da população para a busca de atendimento médico e às dificuldades de obtenção do diagnóstico clínico-laboratorial em casos de difteria, em particular, quando os pacientes estão parcialmente protegidos contra a ação da TD (DIAS et al., 2011b; SANTOS et al., 2014).

Em 2010, no estado do Maranhão, foram confirmados 27 casos de difteria, sendo a maioria em crianças com esquema de vacinação completo. Este surto de difteria foi causado por *C. diphtheriae* biovar *intermedius*, enquanto o mais frequente eram os biovars *mitis* e *gravis* predominarem nos surtos brasileiros e europeus, respectivamente (SANTOS et al., 2014).

Na última década, os movimentos populacionais se intensificaram em todo o mundo. Seja pela facilidade do acesso a viagens de ônibus e aviões, seja pela migração de povos para diversos países na condição de refugiados, fugindo de conflitos, guerras e perseguições. A propagação geográfica de infecções é facilitada pelos movimentos populacionais. As viagens colocam as pessoas em contato com agentes infecciosos, importando doenças. A pandemia de COVID-19 ratifica a importação de doenças através de viagens. Acredita-se que novas medidas de vigilância sanitária e epidemiológica devam ser tomadas, a nível mundial, para tentar mitigar os efeitos das importações de doenças. O aumento da lista de vacinas exigidas entre viajantes internacionais deverá ser uma dessas medidas (AKSEER et al., 2020; CUCINELLI, 2020).

Nos últimos anos, diferentes trabalhos voltaram a indicar casos e/ou surtos de difteria em diferentes partes do mundo, demonstrando que ela permanece endêmica, principalmente entre aqueles que receberam/recebem refugiados e/ou pessoas oriundas de locais com problemas sanitários e de infraestrutura (BADELL et al., 2021; BANSAL et al., 2019;

CZAJKA et al., 2018; DANGEL et al., 2018; DU PLESSIS et al., 2017; GOWER et al., 2020; MARTINI et al., 2019; MEINEL et al., 2016; SCHEIFER et al., 2019), inclusive no Brasil (SANTOS et al., 2014) e em outros países da América Latina (DOOCY et al., 2019; EXAVIER et al., 2019; TUTE et al., 2018; VOS et al., 2019). O Brasil, atualmente, é o sexto país em número de refugiados venezuelanos, sendo Roraima o estado mais procurado. O crescente número de imigrantes está contribuindo para a disseminação de doenças infecciosas, aumento da carga do sistema de saúde brasileiro e risco de novos surtos e epidemias (DOOCY et al., 2019; ESTOFOLETE et al., 2020; EXAVIER et al., 2019).

Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico da difteria deve ser realizado com base nos sintomas clínicos do paciente, 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 nos quais os programas de imunização foram implantados e a doença é raramente observada. Portanto, é essencial a pronta investigação dos casos com procedimentos laboratoriais eficientes (CDC, 2015; EFSTRATIOU et al., 2000; SHARMA et al., 2019).

O diagnóstico microbiológico envolve a cultura da lesão para confirmar o diagnóstico clínico, a partir do material coletado da área da faringe, sem a remoção da pseudomembrana, que poderia levar a uma maior disseminação da TD e reação imunológica intensa, agravando o quadro do paciente e, por vezes, levando a óbito. 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; SHARMA et al., 2019). O meio de cultura contendo telurito proporciona uma vantagem seletiva para o crescimento dos patógenos *C. diphtherie* e *C. ulcerans* (CDC, 2015).

Após o isolamento, podem ser utilizados testes bioquímicos convencionais, que 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 et al., 2011; MATTOS-GUARALDI; FORMIGA; ANDRADE, 1999; PIMENTA et al., 2008a).

Além dos testes convencionais, são disponibilizados comercialmente sistemas compactos de identificação, como o sistema API[®]Coryne (API-bioMérieux, Inc., La Balme lès Grottes, France) que consiste numa combinação de 20 provas bioquímicas e sistemas automatizados de identificação. Devido as dificuldades de diagnóstico por meio dos testes bioquímicos convencionais, a técnica de MALDI TOF, baseada na composição de proteínas da bactéria, representa uma ferramenta relevante no laboratório para identificação de espécies de *Corynebacterium* spp., independente da produção da TD, além de ser um procedimento fácil, rápido e de identificação precisa de um maior número de espécies de patógenos bacterianos (CUCINELLI et al., 2021; KONRAD et al., 2010). No entanto, recentemente foi desenvolvido um equipamento, denominado I-Doni, pela empresa italiana Alifax, com a tecnologia ATR-FTIR que associa a reflectância total atenuada (ATR) com o espectro de infravermelho. Assim, o equipamento é capaz de identificar bactérias através de um pellet de colônia isolada em placa de Petri ou de uma gota de hemocultura positiva. Dentre as vantagens desta nova metodologia estão: i) a agilidade do resultado (menos de 1 minuto), ii) o baixo custo e a fácil manipulação, uma vez que não há necessidade de utilização de reagentes; iii) a tecnologia não destrói a bactéria permitindo a identificação de espécies e subespécies com segurança.

Testes de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos, biotipagem e de toxigenicidade também auxiliam no diagnóstico, fornecendo maior segurança na escolha da terapêutica (HENNART et al., 2020; SEKAR et al., 2017; SHARMA et al., 2019).

Outras técnicas diagnósticas, como a PCR, PCR em tempo real e ensaios de genotipagem têm sido utilizadas para a identificação de diferentes espécies de *Corynebacterium* (CDC, 2017; KONRAD et al., 2010). 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 alvos (*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 carregam o gene *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; PIMENTA et al., 2008b; SEKAR et al., 2017).

Assim, é essencial a pronta investigação dos casos com procedimentos laboratoriais eficientes e precisos, a fim de melhorar o diagnóstico precoce e a eficiência terapêutica. Devido à falta de conhecimento sobre a patogenicidade das corinebactérias entre os profissionais de saúde, permanecem muitos erros na identificação laboratorial, além das interpretações clínicas equivocadas. Estes fatos levam ao descarte de inúmeras amostras como mero contaminantes, mesmo quando isoladas de cultura pura, sem proceder a identificação das cepas envolvidas. Isso gera atraso e/ou engano no diagnóstico que acaba gerando um aumento dos casos graves, inclusive da mortalidade da difteria e/ou de infecções atípicas por esses patógenos (CUCINELLI et al., 2021; MATTOS-GUARALDI et al., 2003; ZASADA; MOSIEJ, 2018)(DU PLESSIS et al., 2017).

Mecanismos de Virulência

As manifestações locais e sistêmicas da difteria clássica e zoonótica têm sido principalmente relacionadas a absorção da toxina diftérica, epítipo vacinal e fator de virulência de *C. diphtheriae* mais bem estudado. A dose letal é menor que $0,1\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$ de peso corporal, sendo extremamente potente (SHARMA et al., 2019). A análise filogenética de sequências 16S rRNA permitiu identificar *C. ulcerans*, *C. diphtheriae* e *C. pseudotuberculosis* como espécies potencialmente produtoras de toxina diftérica (DIAS et al., 2011b). A toxina diftérica é uma exotoxina proteica capaz de inibir a síntese de proteínas e levar a morte de células eucarióticas susceptíveis. A TD danifica o epitélio faríngeo levando à formação de pseudomembrana e, também, pode ocluir as vias aéreas, algumas vezes causando a morte por obstrução respiratória. Além disso, pode disseminar pela corrente sanguínea e atuar em diversos tecidos, apresentando tropismo pelo miocárdio, sistema nervoso, rins e adrenais, resultando em complicações sistêmicas, incluindo miocardite e osteomielite (DIAS et al., 2011b; MAN et al., 2010; PEIXOTO et al., 2016).

Geneticamente, a TD é codificada pelo gene *tox*, presente nos corinefagos do tipo beta (β) e ômega (ω). Apenas cepas de *C. diphtheriae* que abrigam corinefagos com gene *tox* são capazes de produzir TD. Assim como a sequência nucleotídica de diferentes corinefagos apresentam altos níveis de diversidade, estudos tem revelado diferenças nas sequências do gene *tox* entre *C. ulcerans* e *C. diphtheriae*, inclusive entre cepas de uma mesma espécie de

corineobactérias. Esses fatos demonstram que indivíduos vacinados com o toxóide diftérico ou em soroterapia, não apresentam proteção total contra infecções por esses patógenos (OTSUJI et al., 2019; SANGAL; HOSKISSON, 2014; SHARMA et al., 2019; TROST et al., 2012).

A expressão do gene *tox* depende do controle bacteriano, pois está relacionado ao gene ferro-dependente *DtxR*, que é codificado por um gene cromossômico presente em *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* e *C. pseudotuberculosis*, sendo um determinante chave para a homeostase do ferro (DE ZOYSA; EFSTRATIOU; HAWKEY, 2005; SUNARNO et al., 2018; TROST et al., 2012). O ferro está envolvido em várias atividades celulares, e a indução de TD, em baixa disponibilidade de ferro, pode ajudar os patógenos na competição por esse elemento, ou na liberação de ferro através da morte de células hospedeiras. A composição gênica do regulador *DtxR* em diferentes cepas de *C. diphtheriae* pode variar, devido ao ganho ou perda de genes, que pode afetar a aquisição de ferro e a expressão do gene *tox* (TROST et al., 2012).

Apesar da difteria ser uma doença bastante conhecida mundialmente, a maioria das pesquisas priorizaram o estudo da toxina diftérica ao longo dos anos. Nas últimas décadas, quando passaram a ser detectados casos de doenças invasivas, causadas por *C. diphtheriae*, foram iniciados estudos relacionados a outros mecanismos de virulência, independente da produção de TD (MATTOS-GUARALDI; FORMIGA; PEREIRA, 2000; SANGAL; HOSKISSON, 2016).

A natureza multifatorial da patogenicidade de *C. diphtheriae* tem sido documentada em diversos trabalhos realizados por diferentes pesquisadores. Pesquisas envolvendo estudos fenotípicos e genotípicos tem sido realizadas, demonstrando que os novos mecanismos de virulência podem variar entre clones ou podem ser cepa-dependentes. Dentre eles tem sido investigados: a) capacidade de aderência, invasão e sobrevivência do microrganismo no interior de células do hospedeiro (ANTUNES et al., 2015; GOMES et al., 2009; HACKER et al., 2016; MATTOS-GUARALDI; FORMIGA, 1991; PEIXOTO et al., 2014; SANTOS et al., 2010) b) a produção de uma trans-sialidase, designada NanH (DIP0543) (BURKOVSKI, 2013; KIM et al., 2010); c) expressão de proteínas de superfície celular, como a proteína DIP0733 (inicialmente descrita como 67-72p), envolvida na atividade hemaglutinante, assim como na invasão e indução de apoptose em células HEp-2 (células epiteliais de câncer de laringe humana) (ANTUNES et al., 2015; COLOMBO, 2001; HIRATA-JUNIOR et al., 2004; SABBADINI et al., 2012); d) a presença dos genes *Te^R* que conferem resistência em condições de estresse na presença de telurito e aderência as células epiteliais (SANTOS et al.,

2015b), além de estarem relacionados a susceptibilidade às espécies reativas de oxigênio (ROS) (CAPPELLI et al., 2022; FRANKS et al., 2014).

Desde o ano de 2003, o genoma de *C. diphtheriae* biovar *gravis* foi sequenciado, evidenciando que a transferência horizontal de fatores de patogenicidade vai além TD e inclui sistemas de captação de ferro, adesinas, proteínas fimbriais, dentre outros fatores. 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. As PAIs estão associadas a genes tRNA, têm um conteúdo G+C diferente quando comparado ao DNA do hospedeiro e muitas vezes carregam genes críticos ou funcionais que codificam fatores de virulência (ANTUNES et al., 2015; CERDEÑO-TÁRRAGA et al., 2003; D'AFONSECA et al., 2012; GOWER et al., 2020; SANTOS et al., 2015b; SCHEIFER et al., 2019; TROST et al., 2012; VIEIRA et al., 2022). Além da presença de 57 ilhas genômicas, também foi observado um maior percentual de genoma móvel, localizado nestas ilhas, em comparação a outras espécies filogeneticamente semelhantes, o que parece estar relacionado aos mecanismos de virulência. Análises de MLST indicam que a recombinação gênica é uma estratégia comumente utilizada por *C. diphtheriae* para favorecer as interações patógeno-hospedeiro e a ocorrência de surtos em diversos países (BOLT et al., 2010; SANGAL; HOSKISSON, 2016; TROST et al., 2012; VIGUETTI et al., 2012). Além disso, as análises genômicas revelaram um elevado número de genes que codificam proteínas hipotéticas, uma vez que ainda não foram caracterizadas molecularmente e não se tem conhecimento dos mecanismos envolvidos (SANGAL; HOSKISSON, 2016).

Toxina Shiga-like como fator de virulência de *Corynebacterium diphtheriae* e *Corynebacterium ulcerans*

A toxina Shiga (Stx), principal fator de virulência relacionado a shigelose, foi identificada anos após a descoberta do seu agente etiológico, *Shigella dysenteriae* tipo 1 e, recebeu esse nome em homenagem ao microbiologista japonês, Kiyoshi Shiga, que a descobriu. Sua ação é capaz de causar diarreia e colite hemorrágica (CH) em humanos, que

podem evoluir para síndrome hemolítica urêmica (SHU) (JOSEPH et al., 2020; ZADRAVEC et al., 2016).

A síndrome hemolítica urêmica pertence ao grupo de doenças denominadas de microangiopatias trombóticas, um grupo heterogêneo de doenças caracterizadas por uma tríade: trombocitopenia, anemia hemolítica com fragmentação de eritrócitos (esquistocitose) e lesão do órgão (GEORGE; NESTER, 2014). SHU também pode ser causada por infecção gastrointestinal por uma *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga e, ocasionalmente, por outros patógenos (JOSEPH et al., 2020; SCULLY et al., 2017). Os efeitos são decorrentes da introdução de toxina Shiga no interior das células endoteliais, resultando em morte celular, ativação da coagulação intravascular e falência de órgãos (JOSEPH et al., 2020).

Karmeli e colaboradores (1983) relacionaram a SHU com a toxina isolada de fezes de crianças contaminadas com *E. coli*, que apresentava efeito citotóxico irreversível em células Vero, linhagem de células epiteliais isoladas do rim de macaco verde africano, e por isso foi denominada verotoxina (JOSEPH et al., 2020; KARMALI et al., 1983). A análise da verotoxina da cepa *E. coli* O157:H7 demonstrou que apresentava estrutura e atividade biológica similar à da toxina Shiga encontrada em *Shigella dysenteriae* tipo 1, e que o efeito citotóxico podia ser neutralizado por anticorpos anti-Stx. Foi então adotada a denominação Shiga-like toxina, e posteriormente, toxina Shiga. Hoje, sabe-se que não é apenas o sorogrupo *E. coli* O157:H7 que possui a toxina Shiga, mas que as *E. coli* produtoras de toxina Shiga (STEC) compreendem um grupo diverso de estirpes cujo principal fator de virulência descrito é a proteína secretada Stx (JOSEPH et al., 2020; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Estudos anteriores confirmam que a capacidade das cepas STEC de produzir toxina Shiga está relacionada com a integração de bacteriófagos, relacionados ao fago lambda, contendo genes *stx* de outras espécies. Uma única cepa STEC pode carrear até seis genes codificadores da toxina Shiga (KRÜGER; LUCCHESI, 2015). Em geral, os genes *stx* estão situados entre os genes controlados pelo promotor tardio do fago, sugerindo que a produção da toxina está ligada à indução ou progressão do seu ciclo lítico (KRÜGER; LUCCHESI, 2015; O'LOUGHLIN; ROBINS-BROWNE, 2001). Durante a fase de lisogenia, a expressão da maioria dos genes do fago está inibida. Porém, certos indutores, como por exemplo alguns antimicrobianos e luz ultravioleta, têm o potencial de favorecer a transcrição desses genes fagos, incluindo os genes *stx*. Portanto, a alteração da fase lisogênica para fase lítica (indução), mediada por fagos, induz um mecanismo de resposta bacteriana de sobrevivência – mecanismo SOS -, liberando a proteína Stx para o meio extracelular quando ocorre a lise

bacteriana (KIMMITT, 2000; WAGNER et al., 2002; WAGNER; WALDOR, 2002). Deste modo, o uso de antibióticos, principalmente da classe das quinolonas, para o tratamento da infecção, há muito é controverso e a terapia de suporte, reidratação e diálise quando necessário, é a recomendada atualmente (KAKOULLIS et al., 2019; MÜHLEN; DERSCH, 2020).

Diversas variantes de genes *stx* têm sido descritas e foram diferencialmente associadas com o risco de desenvolvimento de doença grave para o hospedeiro (BEUTIN et al., 2004; FRIEDRICH et al., 2002; PERSSON et al., 2007). Existem dois subgrupos da toxina imunologicamente distintos: Stx1 e Stx2, codificados pelos genes *stx1* e *stx2*, respectivamente, que variam na sua toxicidade e na capacidade de se ligarem aos anticorpos (HUNT, 2010; JOSEPH et al., 2020).

A Stx1 possui três subtipos (Stx1a, Stx1c e Stx1d), que são praticamente idênticos à toxina de *S. dysenteriae*, quanto a estrutura e antigenicidade, diferindo apenas em um aminoácido na porção A. Stx1c e Stx1d raramente estão associadas a doenças humanas, e, quando associadas à STEC isoladas de pacientes, estes apresentam sintomas leves (JOSEPH et al., 2020; MELTON-CELSA; O'BRIEN, 2014). A Stx2 está dividida em sete subtipos (Stx2, Stx2b, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f e Stx2g) e tem uma menor semelhança de aminoácidos com a Stx de *S. dysenteriae* (W55%), porém está frequentemente associada a doenças humanas, especialmente a síndrome hemolítico urêmica, em comparação a Stx1 (HUNT, 2010; JOSEPH et al., 2020; MATUSSEK et al., 2016; MELTON-CELSA; O'BRIEN, 2014). Os mecanismos moleculares que regulam a transcrição do gene inicial *stx2* são críticos. A mutação em sequências do promotor de *stx2* pode resultar em pouca ou nenhuma produção de Stx2 (KOITABASHI et al., 2006; SUARDANA et al., 2018).

Após a ingestão de alimentos contaminados, as STEC colonizam o trato gastrointestinal inferior, liberando a toxina Shiga, que é absorvida pelo epitélio, alcançando a corrente sanguínea e se ligando aos tecidos que expressam o receptor glicosíngolípídeo globotriaosilceramida (Gb3), também conhecido como antígeno do grupo sanguíneo CD77 ou pK raro. O receptor Gb3 também pode ser encontrado em células endoteliais microvasculares, plaquetas, linfócitos B e neurônios, além de eritrócitos. Todos os membros da família Stx são do tipo AB5, compostos por duas subunidades: a subunidade monomérica A (StxA), enzimaticamente ativa, que se liga não-covalentemente a subunidade pentamérica B (StxB) (JOHANNES; RÖMER, 2010; JOSEPH et al., 2020; MELTON-CELSA; O'BRIEN, 2014). A subunidade B se liga à membrana da célula hospedeira, através do receptor Gb3 na superfície

da célula alvo, e induz invaginações na membrana para facilitar a internalização da toxina, ou seja, a toxina Shiga entra nas células por endocitose mediada por receptores (CROXEN; FINLAY, 2010; JOHANNES; RÖMER, 2010; RÖMER et al., 2007). A subunidade A atua sobre o RNA ribossomal (rRNA), clivando um resíduo de adenina na região 28S, tornando-a incapaz de interagir com os fatores de alongamento EF-1 e EF-2 (CHAN; NG, 2016; JI YOUN; YOON; HOVDE, 2010; SAXENA; O'BRIEN; ACKERMAN, 1989) e, assim, inibe irreversivelmente a síntese proteica e leva à morte celular por apoptose (CROXEN et al., 2013; MELTON-CELSA; O'BRIEN, 1998). A Stx atravessa o cólon, sendo transportada através da corrente sanguínea até o rim, se ligando aos receptores Gb3 expressos no córtex, onde causa danos as células endoteliais renais ao promover a oclusão da microvasculatura por uma combinação de toxicidade direta e indução da produção local de citocinas e quimiocinas, resultando em inflamação renal (ANDREOLI et al., 2002). Assim, além do efeito de inibição do ribossomo e morte celular, a toxina Shiga também possui efeito de ativação de múltiplas vias de sinalização, de estresse e apoptóticas, além de ser responsável pela produção de citocinas inflamatórias pelas células-alvo (JOSEPH et al., 2020).

Durante o bloqueio da síntese de proteínas, a toxina Stx causa necrose e morte das células endoteliais renais, das células do epitélio intestinal ou de qualquer outra célula que expresse o receptor Gb3 em sua superfície. Embora as células endoteliais pareçam ser o principal alvo para Stx, outras células, como monócitos e plaquetas, também são afetadas. Após serem estimulados pela ação da Stx, os monócitos produzem citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina-1 β (IL-1 β), que potencializam a ação da toxina por induzir a expressão de mais Gb3 (CROXEN; FINLAY, 2010; GUTH et al., 2008). A produção dessas citocinas também pode contribuir para danos no cólon e outras complicações graves, como a síndrome hemolítica urêmica e anormalidades neurológicas (LEE; KIM; TESH, 2013).

Funcionalmente, as toxinas Shiga pertencem à família das proteínas inativadoras de ribossomos (WALSH; DODD; HAUTBERGUE, 2013). A classe AB5 de toxinas bacterianas também inclui a toxina da difteria, a coqueluche e a toxina da cólera, com as quais a toxina Shiga parece compartilhar uma relação evolutiva (JOSEPH et al., 2020; LING et al., 1998; STEIN et al., 1992). O fato dos bacteriófagos do tipo lâmbda poderem ser transferidos entre diferentes espécies, carreando diversos genes, dentre eles o gene *stx*, parece ser a melhor explicação para justificar a presença deste gene em espécies diferentes já relatadas, como *Citrobacter* spp., *Aeromonas* spp e *Enterobacter* spp. (HUNT, 2010).

Estudos recentes demonstraram que Stx é capaz de ativar diretamente o complemento, além de seus efeitos citotóxicos. O tipo Stx2 se liga ao fator H do complemento e seus reguladores (ORTH et al., 2009; POOLPOL et al., 2014). Enquanto Stx2 induz a expressão de p-selectina na superfície da célula endotelial microvascular humana, que se liga e ativa C3 através da via alternativa, levando a formação de trombos em um modelo murino (JOSEPH et al., 2020; MORIGI et al., 2011).

O sequenciamento de nucleotídeos de todo o genoma de referência de *C. diphtheriae* biovar *gravis* cepa NCTC 13129 revelou a presença de até 13 ilhas de patogenicidade (PAIs) (CERDEÑO-TÁRRAGA et al., 2003), incomuns entre as cepas de *C. diphtheriae* (IWAKI et al., 2010). Os pesquisadores identificaram um β -corinefago integrado ao genoma, junto ao gene tRNA^{Arg}. Um estudo posterior analisou a sequência genômica de duas cepas de *C. ulcerans* (809 e BR-AD22) e identificou a presença de um β -corinefago remanescente, em localização adjacente ao gene tRNA^{Arg}, contendo uma tirosina recombinase com 92 % de identidade na sequência de aminoácidos com a integrase do β -corinefago encontrado no genoma de *C. diphtheriae* NCTC 13129, sugerindo que um β -corinefago-like lisogênico teria sido integrado ao genoma da cepa *C. ulcerans* 809 ao longo dos anos. Estudos anteriores já demonstraram que alguns tipos de bacteriófagos podem infectar tanto *C. diphtheriae* quanto *C. ulcerans* (CIANCIOTTO; RAPPUOLI; GROMAN, 1986; ISHII-KANEI; UCHIDA; YONEDA, 1979; TROST et al., 2012) e que o gene *tox* de *C. ulcerans* está localizado numa região do genoma que apresenta sítios de ligação do fago conservados entre as duas espécies (CIANCIOTTO; RAPPUOLI; GROMAN, 1986; SETO et al., 2008).

O nosso grupo de pesquisa descobriu, ainda, a existência do gene *rbp* como sendo um possível fator de virulência de *C. ulcerans* cepa 809. O gene *rbp* codifica uma proteína hipotética de ligação ao ribossomo (Rbp). Esta proteína contém o domínio Pfam 00161, fazendo parte de uma família de proteínas cuja função é inativar ribossomos, sugerindo tratar-se de uma toxina Shiga-like (MARCHLER-BAUER et al., 2011; TROST et al., 2011; WEERASEKERA et al., 2019). O gene *rbp* (CULC809_00177) está localizado entre os genes que codificam uma integrase fágica (CULC809_00176) e uma transposase (CULC809_00178), além de apresentar baixo conteúdo G+C, em comparação ao genoma completo, indicando forte indício de transferência horizontal do gene para *C. ulcerans* cepa 809. Porém, ainda não foi determinado se o gene *rbp* faz parte de um corinefago ou se está associado a um elemento transponível adjacente (TROST et al., 2011).

A análise da sequência de aminoácidos da proteína Rbp de *C. ulcerans* cepa 809 apresentou baixa similaridade com a cadeia A das toxinas Stx1 e Stx2 de *E. coli* (MARCHLER-BAUER et al., 2011). A proteína Stx1 de *E. coli* pertence à família de proteínas de ligação ao ribossomo tipo II, que é caracterizada por uma baixa semelhança na sequência de aminoácidos e, por outro lado, por uma estrutura terciária altamente conservada dos seus membros (LAPOINTE; WEI; GARIÉPY, 2005). A Rbp encontrada em *C. ulcerans* cepa 809 apresenta em seu genoma apenas 24 % de similaridade com a cadeia A da Stx1, mas compreende todos os resíduos de aminoácidos altamente conservados necessários para a atividade catalítica da N-glicosidase (Figura 1). Além disso, a comparação *in silico* das estruturas terciárias de Rbp e da cadeia A da Stx1 demonstra semelhanças estruturais significativas (TROST et al., 2011).

Os estudos sugerem a existência de uma proteína Shiga-like em *C. ulcerans* cepa 809, semelhante ao verificado em cepas de *E. coli*, principalmente STEC. A proteína Stx1 tem sido implicada na patogênese da insuficiência renal aguda. Portanto, a proteína Rbp pode representar um importante fator de virulência através da inibição da biossíntese de proteínas em células hospedeiras devido à atividade de ligação ao ribossomo (TROST et al., 2011).

Análises posteriores da sequência genômica verificaram que ambas as cepas de *C. ulcerans* e *C. diphtheriae* podem ser capazes de secretar proteínas com semelhança estrutural com toxinas do tipo Shiga com efeitos citotóxicos observados em macrófagos de origem animal e humano e linhagem de células epiteliais (HIRATA-JUNIOR. et al., 2008; TROST et al., 2011, 2012; WEERASEKERA et al., 2019).

Figura 1 - Análise da proteína Rbp de *Corynebacterium ulcerans* cepa 809

```

Rbp      MLHLKTTYRKTCLRKVRSYFSVIMMAIVTLGAFLAAPHASAD DPEVSAVVWRLDQHDGPT
Toxin 2  MRHI-----LLKLVLFVCLSSVSYADEFTV-----DFS
Toxin 1  L-----

Rbp      VAKEYRDLLARIGNAVSHPIVN-----GIGAI PENT--ATNARVDIEVLTSEGNVAV
Toxin 2  SQKSYVDSLNSIRSAISTPLGNISQGGISVSVINHVPGGNYISLNVK-GLPEYSERFNHL
Toxin 1  -----FAVDVR-GIDPEEGRFNHL

Rbp      TFHMLRRNMYIQAFITLS--GTTYITSDAFGRGLISGAG--LPFSSDYASLGAHNTGNISD
Toxin 2  RLIMERNLYVAGFINTETNTFYRFSDFSHISVPDVITVSMTDSYSSL--QRIADLE-
Toxin 1  RLIVERNNLYVTGFVNRNTNWFYRFADFSHVTFPGTTAVTLSGDSSYTTL--QRVAGIS-

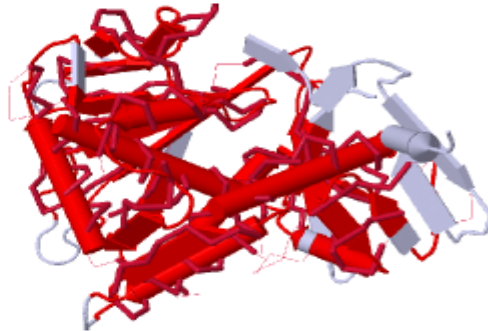
Rbp      PTLFTVGGASLDITLLCNLFHAVENTQNFNRSAARALYAAAILFSEATRFSPSLGNIAQA
Toxin 2  RTGMQIGRHSLVGSYLDIMEF--RGRSMTRASSRAMLRFVTVIAEALRFR-QIQRGFRPA
Toxin 1  RTGMQINRHSLTTSYLDLMSH--SGTSLTQSVARAMLRFVTVIAEALRFR-QIQRGFRPT

Rbp      IENGH--PYNLTNADSEMIRNWGQLSNWGRAQLQSPNQPPFQLPPHVNRANREGRPDGHGV
Toxin 2  LSEAS-PLYMTAQDVDLTLNWGRISNV-----LPEYRGE
Toxin 1  LDDLSGRSYVMTAEDVDLTLNWGRISNV-----LFDYHGQ

Rbp      DKVK---NMTTLAWLLGVLA-----
Toxin 2  EGVRIGRISFNLSAILGSAVALILNCHSTGYSVRSVRSQKQKTEOQIVGDRAAIKVNNVL
Toxin 1  DSVRVGRISFGSINAILGSAVALILNCHSTGYSVRSVRSQKQKTEOQIVGDRAAIKVNNVL

Rbp      -----IA-----KVSG
Toxin 2  WEANTIAALLNRKPKQLTEPNQ
Toxin 1  WDSSTLGALLMRR-----TISS

```



Legenda: Alinhamento da sequência de Rbp de *C. ulcerans* cepa 809 (GenBank/NCBI: NC_017317.1) com a cadeia A da toxina Shiga Stx1 e Stx2 de *E. coli*. Os peptídeos sinal estão em amarelo. Os aminoácidos conservados então grifados em laranja e os resíduos catalíticos conservados estão grifados em azul. O domínio de retranslocação do SLT-1 está marcado em verde. A similaridade entre a Rbp e a cadeia A de Stx1 é também demonstrada em modelo 3-D. As semelhanças estruturais entre as duas proteínas estão indicadas em vermelho.

Fonte: adaptado de TROST *et al.*, 2011 .

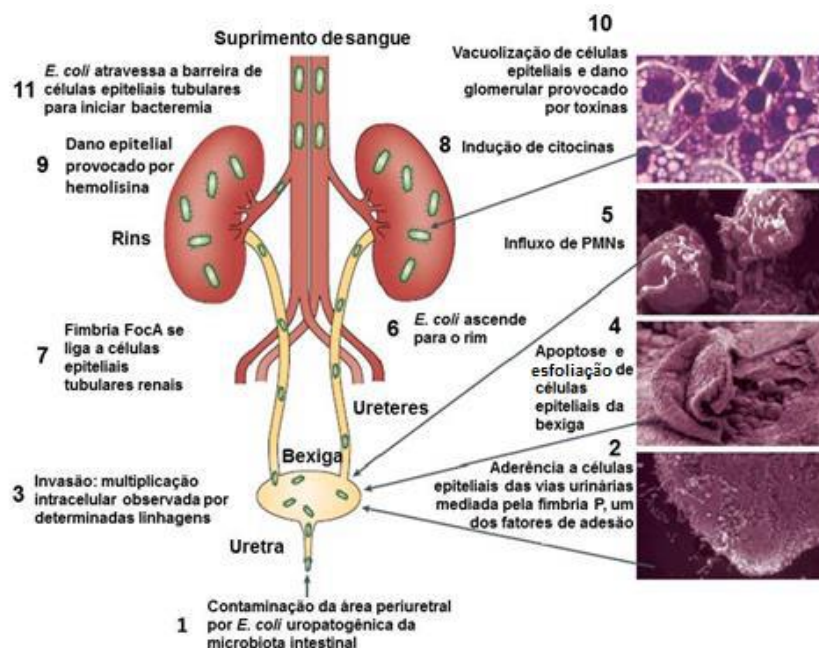
Hemolisinas são exotoxinas citolíticas, de natureza proteica, que lesam as membranas das células endoteliais e das células sanguíneas, particularmente eritrócitos, fibroblastos, linfócitos e monócitos, interrompendo a função da membrana plasmática e provocando morte celular (MAGALHÃES *et al.*, 2011). Diversas espécies bacterianas empregam a lise de células sanguíneas como um relevante fator de virulência: *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Treponema hyodysenteriae*, *Helicobacter pylori*, *Serratia marcescens*, *Vibrio parahemolyticus*, além de diferentes espécies de *Mycobacterium spp.*, provocando infecções diversas, incluindo infecções do trato urinário, peritonites, apendicites, septicemia e meningite neonatal (BIEN; SOKOLOVA; BOZKO, 2012; DEVAL *et al.*, 2016;

GEBISA; GERASU; LEGGESE, 2019; HUANG et al., 2022; RAHMAN et al., 2010). Alguns estudos relacionam a hemolisina A de *E. coli*, com câncer colorretal e adenomagnese (crescimento de glândulas benignas que podem evoluir para adenocarcinoma) em mulheres, inclusive indicando mal prognóstico destes tumores (JIN et al., 2016). Além disso, um estudo demonstrou que 26% das amostras isoladas de fezes de pacientes com câncer associado a bacteremia, foram identificadas como *E. coli* produtoras de hemolisina (HILALI et al., 2000).

Smith (1963) foi o primeiro pesquisador a diferenciar as hemolisinas de *E. coli*, classificando-as como α -hemolisinas ou β -hemolisinas. Um terceiro tipo, γ -hemolisina, foi descrito posteriormente. A α -hemolisina é a mais estudada e tem sido caracterizada bioquímica e geneticamente (BIEN; SOKOLOVA; BOZKO, 2012; CATANI, 1999; GEBISA; GERASU; LEGGESE, 2019; SCHWIDDER; HEINISCH; SCHMIDT, 2019).

As *E. coli* uropatogênicas (UPEC) apresentam, como principal fator de virulência, a produção e secreção de α -hemolisina (HlyA), que está frequentemente associada a doenças humanas graves, como colite hemorrágica e a SHU. A HlyA pertence à família de toxinas/citolisinas de repetição (RTX), formadoras de poros, difundida entre os patógenos Gram-negativos (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; SCHWIDDER; HEINISCH; SCHMIDT, 2019).

Figura 2 - Patogênese da infecção do trato urinário por *Escherichia coli* uropatogênica



Legenda: PMNs – Polimorfonucleares.

Fonte: Adaptado de KAPER et al. (2004).

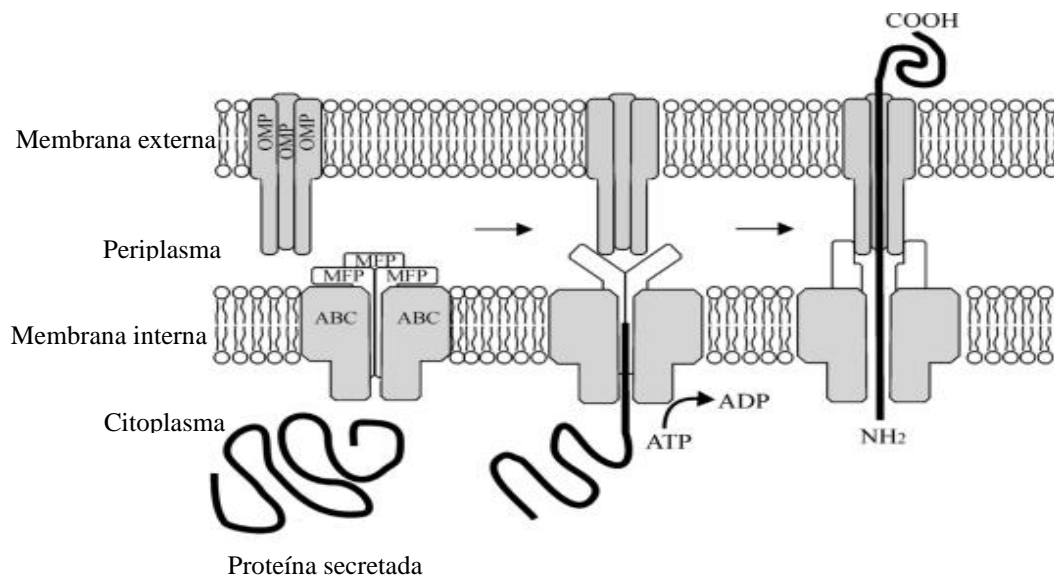
A análise genômica identificou o operon *hlyCABD*, indicando que a hemolisina é codificada por um conjunto de quatro genes: *hlyA*, que codifica a síntese do precursor inativo da toxina intracelular; *hlyC* que codifica uma proteína crucial para a modificação pós-traducional da HlyA, tornando essa proteína hemoliticamente ativa; *hlyB* e *hlyD*, que estão relacionados com a secreção extracelular (KORONAKIS; HUGHES, 2002; KUDINHA, 2017; SILBERGLEIT et al., 2020; WAGNER; VOGEL; GOEBEL, 1983). Adicionalmente, a análise da sequência de DNA indicou a presença de mais de 39 % de conteúdo G+C, além da localização do operon *hlyCABD* em ilhas de patogenicidade, próxima a outros fatores de virulência, sugerindo que estes genes foram adquiridos de outras espécies (GEBISA; GERASU; LEGGESE, 2019; KORONAKIS; HUGHES, 2002; SILBERGLEIT et al., 2020).

A HlyA de *E. coli* representa uma classe de toxinas bacterianas que requer uma ativação pós-traducional, que permite a secreção de proteínas do citoplasma para o ambiente extracelular em uma única etapa, sem intermediários citoplasmáticos, conhecido como sistema de secreção tipo I (T1SS) (GEBISA; GERASU; LEGGESE, 2019; WELLS; HENDERSON, 2013). Assim, a hemolisina é sintetizada como uma pré-hemolisina (pró-HlyA), não tóxica, que é ativada pela acetiltransferase HlyC co-sintetizada com esta pré-hemolisina (DIETRICH; VIRET; GENTSCHEV, 2003). O sistema de exportação tipo 1 de HlyA foi também caracterizado numa variedade de bactérias Gram-negativas, incluindo diferentes sorotipos de *Salmonella* spp., *Shigella* spp. ou *Vibrio Cholerae*, e teve a confirmação do seu funcionamento em diversos modelos animais, incluindo camundongos, coelhos e gado bovino (GENTSCHEV et al., 1996; SILBERGLEIT et al., 2020).

O T1SS de *E. coli* é composto pelas proteínas HlyB, HlyD e TolC, sendo as duas primeiras componentes específicos do sistema de transporte de HlyA, enquanto a terceira é uma proteína multifuncional localizada na membrana externa da bactéria (KORONAKIS; HUGHES, 1993; WAGNER; VOGEL; GOEBEL, 1983). A porção C-terminal carrega uma proteína de secreção sinal (HlyAs) que é reconhecida pelo translocador HlyB/HlyD/TolC, promovendo a secreção direta da HlyA, no meio extracelular, na forma solúvel, sem a formação de intermediários (Figura 3) (GENTSCHEV et al., 1996; KORONAKIS; KORONAKIS; HUGHES, 1989; SILBERGLEIT et al., 2020). O sistema de secreção da HlyA pode ser utilizado para secretar proteínas heterólogas, de vários tamanhos e origens, covalentemente ligadas à sua porção C-terminal (HlyAs), que têm sido alvo de diversos estudos imunológicos, incluindo produção de vacinas, já que é um imunógeno fraco

(DIETRICH; VIRET; GENTSHEV, 2003; KORONAKIS; KORONAKIS; HUGHES, 1989; WELLS; HENDERSON, 2013).

Figura 3 - Modelo de secreção de tipo 1



Legenda: Modelo de sistema de secreção do tipo 1 (T1SS). De acordo com esse modelo de secreção, o sistema de formação de poros na membrana das células, que caracteriza a atividade lítica da hemolisina (HlyA), ocorre em 3 estágios: ligação, inserção e oligomerização da toxina na membrana, resultando na secreção da toxina no meio extracelular, sem o auxílio de intermediários. Essa atividade lítica da toxina parece ocorrer em altas concentrações da HlyA.

Fonte: adaptado de Wells e Henderson (2013).

Os tecidos dos hospedeiros infectados pelas *E. coli* são extremamente pobres em nutrientes, e a função da HlyA tem sido a destruição celular com a finalidade de facilitar a liberação dos nutrientes e de outros fatores, como o ferro, que são críticos para o crescimento bacteriano. Esse mecanismo lítico envolve três estágios: ligação, inserção e oligomerização da toxina na membrana e, ocorre em altas concentrações da HlyA (Figura 3). As α -hemolisinas não são internalizadas pelas células alvo, mas atuam como citolisinas formadoras de poros cátion-seletivos. Além disso, estudos relataram que a α -hemolisina induz o vazamento de grandes vesículas unilamelares, resultando em um efeito parecido com a ação de detergentes, que rompem a bicamada lipídica celular (BIEN; SOKOLOVA; BOZKO, 2012; GEBISA;

GERASU; LEGGESE, 2019; MOROVA et al., 2008; OSTALAZA et al., 1993; SCHMIDT; BEUTIN; KARCH, 1995).

A atividade da α -hemolisina de *E. coli* não está restrita a lise das células-alvo. Em baixas concentrações, a HlyA pode induzir a apoptose de células hospedeiras, incluindo neutrófilos, linfócitos T e células renais. Adicionalmente, a atividade hemolítica de HlyA está relacionada com a ativação de canais de Ca^{2+} tipo L, dependentes do receptor IP3 do retículo endoplasmático, para obter oscilações deste eletrólito nas células, resultando no aumento de produção de citocinas pró inflamatórias (IL-6 e IL-8), particularmente em células do sistema renal. Além disso, estudos apontam que a HlyA interage fisicamente com o lipopolissacarídeo (LPS), outro importante fator de virulência de *E. coli*, presente nas membranas celulares, desempenhando um papel indireto na atividade citolítica de HlyA em eritrócitos e em células epiteliais. Desta forma, a habilidade de HlyA de induzir oscilações de Ca^{2+} , tem sugerido o LPS como um cofator, assim o complexo LSP-HlyA explora o sistema de reconhecimento da proteína de ligação CD14/LPS para levar HlyA para a membrana celular, onde a sinalização de Ca^{2+} intracelular é iniciada. O efeito citolítico desencadeado pela exposição da célula a altas concentrações de HlyA ocorre independente dos mecanismos de oscilação de Ca^{2+} . Também foi observado que a HlyA permite que cepas de *E. coli* realizem translocação, através do aumento da permeabilidade iônica, associada com a diminuição da integridade epitelial, em culturas de células (BIEN; SOKOLOVA; BOZKO, 2012; GEBISA; GERASU; LEGGESE, 2019; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; KUDINHA, 2017; SILBERGLEIT et al., 2020).

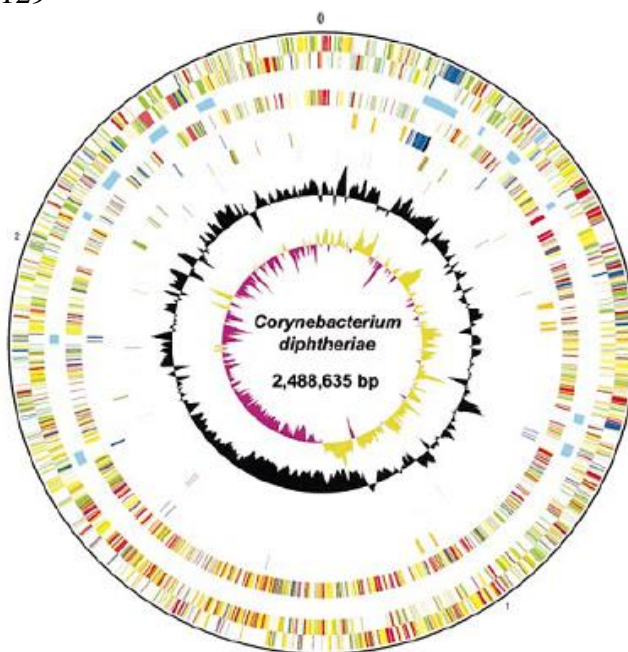
A hemolisina estimula a liberação de ânions superóxido e de peróxido de hidrogênio, levando ao consumo de oxigênio pelas células tubulares renais, resultando na liberação de histamina de mastócitos e basófilos (KUDINHA, 2017). Além de exercer atividade hemolítica, esta toxina parece apresentar um papel multifatorial, em baixas concentrações, capaz de favorecer a implantação e disseminação dos patógenos nos tecidos dos hospedeiros (BIEN; SOKOLOVA; BOZKO, 2012; CATANI, 1999; GEBISA; GERASU; LEGGESE, 2019).

A primeira descrição da natureza transmissível dos genes da α -hemolisina (*HlyA*) de *E. coli* para outros gêneros de enterobactérias (*Salmonella* spp., *Shigella* spp.) ocorreu em 1967. Sabe-se que as ilhas de patogenicidade estão diretamente relacionadas com a transmissão de genes entre as espécies. No entanto, em alguns estudos foi observada a relação entre os genes que codificam fatores de colonização, que permitem às cepas de *E. coli*,

causadoras de infecção urinária (UPECs), aderirem às células das vias urinárias e o gene responsável pela hemolisina (HACKER et al., 1990; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). A primeira identificação das PAIs foi obtida na cepa 536 de *E. coli* (UPEC), onde quatro PAIs foram identificadas, sendo os genes codificadores da hemolisina e das fímbrias P localizados na PAI II (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

A descrição e análise da sequência genômica completa de *C. diphtheriae* biovar *gravis* cepa NCTC 13129 (Figura 4), identificou uma ampla variedade de sequências com potencial de codificação de fatores de virulência, incluindo sideróforos, metaloproteases, adesinas, sialidases e proteínas fimbriais, entre outros, além de evidências de aquisição de transferência horizontal de genes. Nesta oportunidade, foi identificada uma sequência proteica hipotética, com função de metiltransferase, conferindo atividade de hemolisina, anotada no banco de dados NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/499237326/?report=ipg>), no gene DIP_RS17105, antigo DIP1180, alertando a comunidade científica sobre a possibilidade de haver, em outras cepas de *C. diphtheriae*, a presença de gene(s) codificante(s) de hemolisina(s) com potencial para atuar como fator(es) de virulência (CERDEÑO-TÁRRAGA et al., 2003).

Figura 4 - Representação circular do cromossomo de *Corynebacterium diphtheriae* cepa NCTC 13129



Legenda: Representação do cromossomo circular de *C. diphtheriae* cepa NCTC 13129 (GenBank/NCBI: BX248357.1). Do círculo externo ao círculo interno: Círculo 1: Bases de DNA, contagem no sentido horário; Círculos 2 e 3: Todos os genes (cadeias directa e inversa); Círculo 4, PAIs; Círculo 5, genes com ortólogos em *M.tuberculosis*; Círculo 6, transporte de íons metálicos (Laranja), genes relacionados com fagos (azul marinho), TD (preto); Círculo 7: putativo sortases (vermelho), putativo sortase substratos (verde); Círculo 8: repX (marrom), pares de elementos (roxo); Círculo 9, conteúdo de G + C (traçado usando uma janela de 10 kb); Círculo 10, GC inclinado $[(G \pm C) / (G + C)]$ (traçado usando uma janela de 10 kb). Codificação de cor para os círculos 2, 3 e 5: azul escuro - patogenicidade / adaptação; Preto - metabolismo energético; Vermelho - transferência de informação; Verde escuro - superfície associada; Ciano - degradação de grandes moléculas; Magenta - degradação de pequenas moléculas; Amarelo - metabolismo central / intermediário; Verde pálido - desconhecido; azul pálido - Reguladores; Laranja - conservado hipotético; Castanho - pseudogenes; Rosa - fago e elementos; Cinzento - variado.

Fonte: CERDEÑO-TÁRRAGA *et al.*, 2003.

1 JUSTIFICATIVA

Infecções causadas por *C. diphtheriae* representam um desafio médico global, sobretudo porque continuam sendo observadas em países onde ocorreram melhorias das condições socioeconômicas e de imunização. Os fatores e mecanismos relacionados à virulência das cepas de *C. diphtheriae* que contribuíram para a perpetuação da endemicidade e/ou que ocasionaram as principais epidemias nas últimas décadas ainda não foram completamente esclarecidos (TRUELOVE et al., 2020; VIEIRA et al., 2022).

Linhagens de *C. diphtheriae* não produtoras de toxina diftérica têm sido isoladas de diversos processos infecciosos invasivos, inclusive entre indivíduos imunocompetentes, caracterizando o bacilo diftérico como um patógeno emergente (BADELL et al., 2021; BANSAL et al., 2019; EXAVIER et al., 2019; GOWER et al., 2020; MARTINI et al., 2019; OTSHUDIEMA et al., 2021; SANTIS et al., 2020; SCHEIFER et al., 2019). Esses aspectos alertam para outros fatores de virulência passíveis de serem expressos por cepas de *C. diphtheriae*, além da toxina diftérica (DU PLESSIS et al., 2017; SANGAL; HOSKISSON, 2014; SHARMA et al., 2019; TRUELOVE et al., 2020; VIEIRA et al., 2022). Assim sendo, estudos que justifiquem a patogenicidade de cepas de *C. diphtheriae* não produtoras de toxina diftérica e, potencialmente invasoras, permanecem necessários.

Estudos anteriores já demonstraram que *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 et al., 2002). Adicionalmente, 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). Esses estudos indicam que mecanismos que permitam a sobrevivência e a multiplicação de patógenos no interior de células fagocíticas representam um fator importante na disseminação bacteriana e na manutenção do processo infeccioso.

Trabalhos recentes ressaltam que a expressão de fatores de virulência, nas mais variadas espécies bacterianas, está relacionada com a aquisição de genes, localizados geralmente em ilhas de patogenicidade, por transferência horizontal (AHN et al., 2016; ALI et al., 2017; BAASKE et al., 2016; D'AFONSECA et al., 2012; LECLERCQ et al., 2016).

Adicionalmente, estudos de sequenciamento genômico indicaram que *C. diphtheriae* difere de outras espécies filogeneticamente semelhantes, por apresentar maior percentual de genes relacionados a mecanismos de virulência, estabelecendo diferenças nas interações hospedeiro-patógeno (CERDEÑO-TÁRRAGA et al., 2003; SOARES et al., 2012; TROST et al., 2012).

A importância das hemolisinas e da toxina Shiga-like para a virulência de diferentes espécies bacterianas tem sido cada vez mais enfatizada na literatura. Os genes que codificam esses dois fatores são passíveis de transferência, conforme já apontado por trabalhos envolvendo, principalmente, espécies dos gêneros *Escherichia*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Vibrio* e *Streptococcus*, entre outros (AHN et al., 2016; ALI et al., 2017; BAASKE et al., 2016; HACKER et al., 1990; LECLERCQ et al., 2016; SMITH; HALLS, 1967).

Em *C. diphtheriae*, algumas cepas podem produzir hemolisinas, uma vez que são classificadas quanto à atividade hemolítica (TRABULSI; ALTERTHUM, 2015). Além disso, Cerdeno-Tárraga e colaboradores (2003) já indicaram a presença de uma proteína hipotética, denominada inicialmente como DIP1180, com atividade de hemolisina e citotoxina em *C. diphtheriae* cepa NCTC 13129. Contudo, pouco se sabe a respeito da influência da produção desta citotoxina na virulência da espécie.

Com relação à presença da toxina Shiga-like, o trabalho do grupo de pesquisa de TROST (2011) ressalta a possibilidade da presença desta toxina em *C. ulcerans* cepa 809. Foi detectada alta semelhança estrutural da cadeia terciária da proteína Rbp desta espécie com o fragmento Stx-1 da toxina Shiga de *E. coli* (CERDEÑO-TÁRRAGA et al., 2003; TROST et al., 2011).

Diante do exposto, o propósito deste trabalho foi investigar a presença e a expressão de genes que codificam as toxinas hemolisina e Shiga-like, e seus efeitos na patogenicidade de cepas de *C. diphtheriae*.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Investigar por métodos fenotípicos e genotípicos a presença, caracterização funcional, mecanismos de virulência e influência na patogenicidade da toxina Shiga-*like* e da hemolisina TlyA em cepas de *C. diphtheriae*.

2.2 Específicos

a) Análise genômica *in silico* para detecção da presença de genes codificantes da toxina Shiga-*like* e hemolisina (TlyA) em espécies de *Corynebacterium* spp. e em cepas de *C. diphtheriae*, produtoras e não produtoras de TD, potencialmente patogênicas, e com sequenciamentos disponíveis em banco de dados públicos;

b) Detecção da presença das proteínas relacionadas aos genes alvos utilizando ferramentas de bioinformática e para realização de alinhamentos, predição de porção transmembranar, investigação de peptídeo sinal, busca de estrutura tridimensional da proteína modelo, elaboração de árvore filogenética com *C. diphtheriae* e outras espécies de corinebactérias de importância clínica;

Para os estudos relacionados a toxina Shiga-*like* em *C. diphtheriae* foram realizadas as seguintes investigações:

c) Desenvolvimento de novo ensaio utilizando a técnica de PCR para a detecção do gene *rbp* codificante da toxina Shiga-*like*;

d) Detecção e quantificação dos níveis de mRNA de toxina Shiga-*like* utilizando a técnica de PCR em tempo real;

e) Influência da citotoxicidade da toxina Shiga-*like* utilizando células epiteliais de linhagem Vero;

f) Influência da variação da temperatura na produção e na citotoxicidade de toxina Shiga-*like*

Para os estudos relacionados a hemolisina TlyA em *C. diphtheriae* foram realizadas as seguintes investigações:

g) Desenvolvimento de novo ensaio utilizando a técnica de PCR para a detecção do gene *tlyA* codificante da hemolisina;

h) Construção da cepa mutante, por recombinação homóloga, para o gene *tlyA* utilizando a cepa selvagem *C. diphtheriae* NCTC 13129;

i) Influência da hemolisina TlyA na interação bacteriana e sobrevivência intracitoplasmática em células epiteliais de linhagem HEp-2;

j) Detecção e quantificação da atividade hemolítica em cepas de *C. diphtheriae* de diferentes biovares e em diferentes condições de microaerofilia;

k) Influência das condições ambientais na expressão de hemolisina e capacidade de produção de biofilme em diferentes superfícies abióticas, e em baixas concentrações de ferro na capacidade de produção de biofilme em vidro;

l) Avaliação do potencial artritogênico em murinos comparando cepas selvagem e mutante para o gene *tlyA*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Origem das cepas bacterianas e condições de cultivo

Os microrganismos utilizados neste trabalho fazem parte da Bacterioteca do Laboratório de Difteria e Corinebactérias de Importância Clínica (LDCIC), Faculdade de Ciências Médicas (FCM), Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

As cepas de *C. diphtheriae* foram cultivadas a 37 °C por 24-48 horas, 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. O armazenamento das cepas 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.

A autenticidade das cepas de *C. diphtheriae* utilizadas neste trabalho foi verificada, periodicamente, quanto à pureza e às características fenotípicas, pela técnica de espectrometria de massa MALDI-TOF e sistema miniaturizado API[®]Coryne (ALATOOM et al., 2012; KONRAD et al., 2010) (MATTOS-GUARALDI; FORMIGA, 1998). O potencial de produção da toxina diftérica foi confirmado por genotipagem em reações de PCR multiplex, utilizando pares de iniciadores para o gene espécie-específico *dtxR* (DtxR 1F e DtxR 1R, 258 pb) e para os fragmentos A (Dipht 2F e Dipht 4R, 719pb) e B (Dipht 6F e Dipht 7R, 534 pb) do gene *tox*, relativos aos domínios A e B da TD, respectivamente (NAKAO; POPOVIC, 1997; PIMENTA et al., 2008b).

As culturas de *E. coli* quimicamente competentes foram cultivadas em meio de cultura Luria Bertani (LB, *Difco Laboratories*), na forma de ágar ou de caldo, durante a noite, a 37° C e sob agitação (190 rpm, GIO Gyrotory[®] shaker, New Brunswick). Quando necessário, os meios foram acrescidos de 25 µg/mL de canamicina ou 10 µg/ml de cloranfenicol.

No presente estudo foram analisadas cepas de *C. diphtheriae*, produtoras e não produtoras de toxina diftérica, pertencentes a diversos biovars e origens, relacionados a casos de difteria clássica e infecções invasivas, quanto a presença e capacidade de produção de toxina Shiga-like e hemolisina relacionadas nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1 - Cepas, células e plasmídeos utilizados no presente estudo

| Cepa | Genótipo/Quadro Clínico | Biovar/sac/tox | tlyA | Referências |
|--------------------------------|---|----------------------------|--------------|----------------------------------|
| <i>C. diphtheriae</i> | | | | |
| NCTC13129* | DIP_RS17105 / Difteria/ Cepa selvagem | <i>gravis</i> / + / + | + | (D'AFONSECA et al., 2012) |
| LDCIC-A1 | NCTC13129 DIP_RS17105 :: pCR2.1-TOPO 'DIP_RS17105' | <i>gravis</i> / + / + | interrompido | Presente estudo |
| HC01* | CDHC01_1109/ Endocardite | <i>mitis</i> / + / - | NI | (MANDLIK; DAS; TON-THAT, 2008) |
| HC02* | CDHC02_1090/ Endocardite | <i>mitis</i> / + / - | + | (PARK, W. H. AND WILLIAMS, 1896) |
| HC03* | CDHC03_1084/ Endocardite | <i>mitis</i> / + / - | + | (PARK, W. H. AND WILLIAMS, 1896) |
| HC04* | CDHC04_1094/ Endocardite | <i>gravis</i> / - / - | + | (HIRATA-JUNIOR. et al., 2008) |
| HC06 | NI / Endocardite | <i>gravis</i> / + / - | + | Não publicado |
| INCA 402* | CDB402_1090/ Pneumonia | <i>belfanti</i> / + / - | + | (TROST et al., 2011) |
| VA01* | CDVA01_1051/ Difteria | <i>gravis</i> / - / + | + | (MATTOS-GUARALDI et al., 2001) |
| MA136 | NI / Difteria | <i>intermedius</i> / - / - | + | (SANTOS et al., 2014) |
| TR241* | CD241_1111/ Difteria | <i>mitis</i> / + / + | + | (MANDLIK; DAS; TON-THAT, 2008) |
| 31 A* | CD31A_1192/Difteria | <i>mitis</i> / + / + | + | (MANDLIK; DAS; TON-THAT, 2008) |
| PW8* | CDPW8_1159/Difteria | <i>mitis</i> / - / + | + | (ORAM; AVDALOVIC; HOLMES, 2004) |
| INCA 814 | /Pneumonia | <i>mitis</i> / - / - | + | (VIGUETTI et al., 2012) |
| ATCC 27010 | CDC7B_1176/Cepa tipo | <i>mitis</i> / - / - | + | (VIGUETTI et al., 2012) |
| ATCC 27012/ C7* | CDC7B_1176/Cepa tipo | <i>mitis</i> / - / + | + | (VIGUETTI et al., 2012) |
| CDC-E8392* | CDCE8392_1081/ Difteria | <i>mitis</i> / - / + | + | (TROST et al., 2012) |
| <i>Escherichia coli</i> | | | | |
| TOP10Electrocomp | F2 mcrA D(mrr-hsdRMS-mcrBC) w80lacZDM15 DlacX74 recA1 araD139 D(ara-leu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG l2 | | | Invitrogen |
| OP50 | Uracil-auxotrophic <i>E. coli</i> B strain | | | (BRENNER, 1974) |
| Plasmídeos | | | | |
| pCR 2.1-TOPO | ori _{pUC} , ori _{f1} , lacZ _a , pM13, pT7, Km ^R , Ap ^R | | | Invitrogen |
| pCR2.1-TOPO-DIP_RS17105 | pCR 2.1-TOPO containing a 720 bp internal DNA fragment | | | Presente estudo |

Legenda: ATCC *American Type Culture Collection*; CDC *Centers for Disease Control and Prevention*; HC cepas isoladas do sangue; INCA cepas isoladas do Instituto Nacional do Câncer; MA isolada durante o surto no Maranhão/Brasil; NCTC *National Collection of Type Cultures*; TR cepa isolada do trato respiratório; *cepas sequenciadas (NCBI 2022), códigos de acesso no Apêndice 1. Fonte: A autora.

Tabela 2 - Células utilizados no presente estudo

| Células | Descrição | Referências |
|----------------|--|------------------------------|
| Vero | Células epiteliais de rim de macaco verde africano | (YASUMURA; KAWAKITA, 1963) |
| HEp-2 | Células epiteliais de câncer de laringe humana | (HIRATA-JUNIOR et al., 2004) |

Fonte: A autora.

3.2 Investigação da Toxina Shiga-like em *Corynebacterium diphtheriae*

3.2.1 Análise da proteína Shiga-like por bioinformática

A sequência de aminoácidos da proteína Rbp de *C. ulcerans* 809 foi usada como referência para a pesquisa do alinhamento de sequências no banco de dados não redundantes, disponibilizado gratuitamente no portal *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), respeitando-se as regiões onde se localizavam o maior número de domínios conservados (ALTSCHUL et al., 1997; D'AFONSECA et al., 2012; TROST et al., 2011).

Sequências proteicas homólogas entre cepas de *C. diphtheriae* foram identificadas por meio do servidor NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) e comparadas, *in silico*, para verificar a porcentagem de identidade e cobertura, através da ferramenta *online* BLASTp (disponível no site: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

As sequências, no formato FASTA, Shiga-like homólogas a proteína Rbp de *C. ulcerans* 809 encontradas em diferentes cepas de *C. diphtheriae* patogênicas foram alinhadas, pela comparação direta entre os resíduos de aminoácidos analisados par a par pelo programa Clustal Omega (SIEVERS et al., 2011).

A procura por domínios conservados foi realizada utilizando os bancos de dados da ferramenta *online* Pfam (disponível no site: <https://pfam.xfam.org/>) (FINN et al., 2016) e CDD/NCBI (LU et al., 2020; MARCHLER-BAUER et al., 2015). O servidor *Phyre²* foi empregado para prever a estrutura tridimensional dos domínios conservados da proteína Shiga de *E. coli*, Rbp de *C. ulcerans* 809 e proteínas hipotéticas Shiga-like encontradas nas cepas de *C. diphtheriae*. 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 (KELLEY; STERNBERG, 2009).

A predição das porções transmembrana e o peptídeo sinal das proteínas Shiga de *E. coli*, Rbp de *C. ulcerans* 809 e as proteínas hipotéticas Shiga-like encontradas nas cepas de *C. diphtheriae* foram realizadas com os programas TMHMM 2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) e Signal P versão 6.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP>), respectivamente (KROGH et al., 2001). A análise filogenética entre diferentes espécies patogênicas de corinebactérias foi realizada utilizando o programa Mega versão X. A árvore foi construída utilizando o método de máxima verossimilhança, com 1000 réplicas de *bootstrap* e modelo de matriz de distância Jones – Taylor – Thirnton (JTT), com razão de transição/transversão de 2,0 (JONES; TAYLOR; THORNTON, 1992; KUMAR et al., 2018).

3.2.2 Detecção do gene Shiga-like pela reação em cadeia da polimerase (PCR)

O desenho de oligonucleotídeos iniciadores, apresentado na Tabela 3, foi baseado na sequência de DNA para o gene CDHC04_0155 de *C. diphtheriae* HC04, que apresentou maior similaridade com o gene *rbp* de *C. ulcerans* 809. Para o desenvolvimento dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) foi utilizada a ferramenta *online* Primer-BLAST e as reações de amplificação *in silico* foram realizadas no site <http://insilico.ehu.es/PCR/>. Foram consideradas satisfatórias temperaturas de anelamento dos pares de base em torno de 60 °C, tamanho variável entre 500 e 800 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.

Para obtenção das suspensões de DNA, foram selecionadas 3 a 5 colônias isoladas, obtidas a partir do crescimento dos cultivos bacterianos de 24 horas, conforme descrito no item 3.1. Em seguida, as colônias foram transferidas para microtubos, previamente identificados, contendo 500 µL de água Milli-Q estéril. As suspensões bacterianas resultantes foram submetidas à fervura por 10 minutos, em banho-maria, imediatamente transferidas para banho de gelo, onde foram resfriadas por 15 minutos, e posteriormente centrifugadas a 12.000g por 20 segundos. Alíquotas de 2 µL do sobrenadante foram utilizadas nas reações de amplificação. O restante do sobrenadante foi estocado a – 20 °C (PIMENTA et al., 2008b).

A mistura reacional para os ensaios de PCR foi elaborada em cabine asséptica (DNA Workstation Modelo LWS-01 - Loccus, São Paulo, Brasil), em microtubos estéreis livres de DNase, sendo composta de 14,75 µL água Milli-Q estéril, 2,5 µL tampão PCR 10X, 0,75 µL MgCl₂ [50 mM], 1,0 µL de cada oligonucleotídeo iniciador [100 mM], 0,5 µL dNTP [10 mM] e 2,5 µL enzima Taq DNA polimerase [12,5 U/µL] (Invitrogen, Life Technologies, Brasil) para um volume de 23 µL. Em seguida foram adicionados 2 µL do DNA molde extraído de cada cepa bacteriana (item 3.3.1). O controle da reação de PCR foi obtido substituindo-se o DNA molde por água Milli-Q estéril (NAKAO; POPOVIC, 1997; PIMENTA et al., 2008b).

A amplificação genômica foi realizada em termociclador Applied Biosystems™ Proflex PCR System™ (Life Technologies, EUA), com etapa inicial de desnaturação a 94 °C, por 2 minutos, seguida de 35 ciclos compostos pelas etapas de: desnaturação a 94 °C, por 60 segundos, anelamento a 60 °C, por 1 minuto, e extensão a 72 °C, por 1 minuto e 30 segundos. A etapa final de extensão foi realizada a 72 °C, por 10 minutos (NAKAO; POPOVIC, 1997; PIMENTA et al., 2008b).

Os produtos amplificados foram submetidos à separação eletroforética, a 80 V e 52 mA, por 25 minutos, em gel de agarose a 1,2 % contendo corante Syber Safe (E-Gel® CloneWell Agarose Gels with SYBR Safe™ - Invitrogen, Reino Unido), no equipamento E-Gel® iBase™ Power System (Invitrogen, Reino Unido). Ao gel, foram aplicados 10 µL do marcador de peso molecular DNA ladder 100 pb (Invitrogen, Reino Unido) ou 20 µL dos produtos de PCR obtidos em cada poço. A visualização dos produtos de amplificação foi realizada em transiluminador de luz ultravioleta (E-Gel® Safe Imager™ Real-Time Transilluminator - Invitrogen) e, posteriormente, o gel foi fotografado utilizando o programa Kodak Digital Science - Electrophoresis Documentation & Analysis System 120, para verificação da presença da banda de interesse.

3.2.3 Avaliação da expressão do gene *rbp* de *Corynebacterium diphtheriae*

O desenho de oligonucleotídeos iniciadores foi baseado nas sequências de DNA que codifica o gene *dtxR*, utilizado como normalizador da reação de RT-qPCR (*Reverse Transcriptase Quantitative PCR*). Para o desenho dos iniciadores do gene *rbp*, correspondente à proteína hipotética Shiga-like de *C. diphtheriae*, foi levado em consideração

a região nucleotídica correspondente ao maior número de aminoácidos conservados para Rbp de *C. ulcerans* 809, de acordo com o *software online Primer BLAST* (NCBI). Foram consideradas satisfatórias temperaturas de anelamento dos pares de base 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 RT-qPCR.

As cepas de *C. diphtheriae* foram cultivadas em 6 mL de meio TSB, *overnight*. 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 4 °C ou a 37 °C. O sedimento foi ressuspensão em 150 µL de água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) e agitado em vórtex 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 a 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 ressuspensão em 25µL de água contendo DEPC (ATSHAN et al., 2012).

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* TM, Ambion), de acordo com as instruções do fabricante. As quantidades de RNA total obtidas foram avaliadas em equipamento *Nanovue* (GE Helthcare), e armazenadas em freezer -80 °C até sua utilização (adaptado de ATSHAN et al., 2012).

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-qPCR (Invitrogen), de acordo com as especificações do fabricante. O anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores ao RNA molde foi realizado através da combinação de 1,0 µL de oligonucleotídeos de sequências aleatórias (50 µM), 1,0 µL de dNTP mix (10 mM cada) e do volume necessário de RNA molde - com concentração de 1000 ng - para completar 11 µL de

reação. Os tubos de reação foram incubados a 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.

As amostras de cDNA foram submetidas à amplificação por qPCR, com o uso dos pares de iniciadores listados na Tabela 4. 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 Biosystems*).

Tabela 3 - Sequências oligonucleotídicas iniciadoras para os genes normalizador e alvo

| Oligonucleotídeos | Sequência (5'→3') | Tm | GC % |
|--------------------------|-------------------------|-------|-------|
| Gene alvo | | | |
| <i>rbp</i> F | CCAGCTTGCTAGGCTTAGTGGCA | 64.93 | 56.52 |
| <i>rbp</i> R | TGAGCAACGTGCATCAGTTGGGT | 65.29 | 52.17 |
| Produto | 104 pb | | |
| Gene normalizador | | | |
| <i>dtxR</i> F | TAGCCAAACCGTTGCCATA | 59,67 | 50,00 |
| <i>dtxR</i> R | ACGCATAACTGCAGTCGCTA | 59,83 | 50,00 |
| Produto | 109 pb | | |

Legenda: Gene normalizador (*housekeeping*): escolhido para este estudo foi o gene *dtxR*, enquanto o gene *rbp*, que codifica a proteína hipotética encontrada em *C. diphtheriae* cepa HC04 com maior similaridade com a proteína Rbp de *C. ulcerans* 809, foi o gene alvo do estudo. Tm – temperatura média. GC% - conteúdo de guanina e citocina.

Fonte: A autora

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 isso utilizou-se um *pool* com os cDNA das amostras analisadas. A partir dos *cicle 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 $E = 10^{(-1/\text{slope})}$ (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; SCHMITTGEN, 2001; RASMUSSEN, 2001).

O cDNA foi submetido a reações, em triplicata, de RT-qPCR correspondentes a cada par de iniciador utilizado. As curvas de amplificação (ΔR_n versus Ciclo), plotadas em tempo real pelo *software* v2.0.1. (*Applied Biosystems™*) durante o processamento das reações no termociclador, foram utilizadas como parâmetros para a definição do *threshold* 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. 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 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.

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.

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

3.2.4 Avaliação da influência da temperatura na expressão do gene *rbp* de *Corynebacterium diphtheriae*

As cepas de *C. diphtheriae* HC01 foram cultivadas em 6 mL de meio TSB, *overnight*. Para os ensaios de expressão de *rbp*, duas alíquotas de 3 mL, retiradas a partir do mesmo tubo, foram submetidas à incubação a 4 °C e 37 °C, por 2 horas. As etapas de extração do RNA, formação do cDNA e as reações, em triplicata, de RT-qPCR correspondentes a cada par de iniciador utilizado para o gene *rbp* foram realizadas como descrito no item 3.2.3. A diferença entre o valor de ΔCt para a cepa cultivada a 4° C e o valor de ΔCt para a condição controle (37 °C), 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 pelo tratamento por baixa temperatura.

3.2.5 Ensaio de Citotoxicidade

Na pesquisa de produção de toxina *Shiga-like* foram investigados os efeitos de citotoxicidade de filtrados das culturas bacterianas não produtoras de toxina diftérica induzidas por mitomicina C (50 mg/mL) e pela observação da morte celular, após 3 horas de

infecção com as culturas bacterianas, em células VERO, conforme descrito por Pimenta (2006).

Os filtrados do sobrenadante dos cultivos bacterianos (filtros Millipore, poro de 0,45 μ m de diâmetro) foram mantidos à temperatura de 4 °C e utilizados no máximo pelo período de uma semana. As alterações produzidas no tapete celular foram observadas a fresco em microscópio invertido (MACHADO, 1989) e através de ensaios de viabilidade celular usando mitomicina C (MTT) e quantificados em espectrofotômetro.

As cepas de *C. diphtheriae* analisadas foram cultivadas em 10 mL de meio TSB, *overnight*, a 37 °C, sob agitação. Duas alíquotas de 5 mL, retiradas a partir do mesmo tubo, tiveram a DO ajustada para 0,5 e, em seguida, submetidas à incubação, sendo um tubo de cada amostra incubado a 4 °C ou a 37 °C, por 4 horas, em meio MEM acrescido de L-glutamina e 2 % de SFB. Após a incubação, as alíquotas foram passadas a microtubos e centrifugadas a 10.000 g, a 4 °C, por 2 minutos. Esse processo de lavagem foi repetido duas vezes, para clarificação dos sobrenadantes. Os sobrenadantes foram filtrados (filtros Milipore, poro 0,22 μ M de diâmetro) e utilizados no experimento. Em seguida foram realizadas diluições seriadas com os filtrados, sendo que as amostras atoxinogênicas foram diluídas 1/2 e 1/5 e as toxigenicas diluídas 1/4 e 1/10, em meio MEM com 10 % de SFB. Os filtrados bacterianos não utilizados foram mantidos a temperatura de 4 °C e utilizados durante o período máximo de uma semana (MACHADO, 1989; PIMENTA et al., 2008c).

As células VERO foram cultivadas em garrafas plásticas contendo meio de cultivo Mínimo Essencial MEMTM (Invitrogen, Brasil) suplementado com gentamicina (50 μ g/mL), fungizona (2,5 μ g/mL), L-glutamina (0,5 % p/v) e 10 % de soro fetal bovino (SFB) (Invitrogen, Brasil). As mesmas foram mantidas a 37 °C em atmosfera de 5 % CO₂. As expansões foram feitas a cada 2 - 3 dias com a dissolução das monocamadas com solução de tripsina-EDTA (0,1 % e 0,01 %) em Salina Tampão Dulbecco com 1 % de vermelho de fenol. Para confecção das placas, os tapetes celulares foram submetidos à tripsinização e ressuspensos em MEM de forma a ter 2,5 x 10⁵ células/mL. 100 μ L desta solução foram dispensados em cada poço de placas de cultura de tecidos de 96 poços. As células foram incubadas com os sobrenadantes por 24 horas, a 37 °C com 5 % de CO₂ (EFSTRATIOU; GEORGE, 1999; HIRATA et al., 2002; PIMENTA et al., 2008b).

Após o período de incubação, 20 μ L de mitomicina C [(3(4,5 – dimetiltiazol-2-il) -2,5-brometo difenil tetrazólico), Sigma – Aldrich], na concentração de 5 mg/mL, foram acrescidos aos poços e a placa foi incubada durante 2 horas, a 37 °C com 5% CO₂. Após esse

período, os sobrenadantes foram descartados e 250 µL de álcool isopropílico foram adicionados durante 15 minutos. Após a incubação, 100 µL de cada poço foram transferidos para uma microplaca estéril e realizada a leitura, em 570 nm, no leitor de Elisa.

O teste do MTT baseia-se na redução dos sais amarelos de tetrazóico por redutases mitocondriais de células metabolicamente ativas. Formam-se, intracelularmente, cristais azuis que são solubilizados e posteriormente analisados por espectrofotometria UV/visível. Deste modo, quanto menor for a viabilidade celular, menor será a redução do MTT e menor o sinal espectrofotométrico (EFSTRATIOU; GEORGE, 1999; HIRATA et al., 2002).

3.2.6 Análise estatística

Os experimentos foram realizados com, no mínimo, três ensaios independentes em triplicata. As diferenças estatísticas entre os grupos foram avaliadas 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 $p \leq 0,05$.

3.3 **Investigação de hemolisina em *Corynebacterium diphtheriae***

3.3.1 Análise da hemolisina por bioinformática

A sequência de aminoácidos da proteína TlyA (ID BLAST: WP010934866.1), codificada pelo gene DIP_RS17105, denominada “*putative cytotoxin/hemolysin*”, primeiramente descrita em *C. diphtheriae* biovar *gravis* cepa NCTC 13129, foi identificada no banco de dados do servidor NCBI *Chromosome Sequences*, e usada como base para a pesquisa (ALTSCHUL et al., 1997; CERDEÑO-TÁRRAGA et al., 2003; D’AFONSECA et al., 2012).

Sequências proteicas homólogas entre cepas de *C. diphtheriae*, espécies bacterianas diversas e em seres humanos, foram identificadas por meio do servidor NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) e comparadas, *in silico*, para verificar a porcentagem de identidade e cobertura, através da ferramenta *online* BLASTp (disponível no site: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

As sequências proteicas de TlyA em formato FASTA, encontradas em diferentes espécies de corinebactérias patogênicas, foram alinhadas pela comparação direta entre os resíduos de aminoácidos, analisados par a par, pelo programa Clustal Omega (SIEVERS et al., 2011).

A procura por domínios conservados foi realizada utilizando os bancos de dados da ferramenta *online* Pfam (disponível no site: <https://pfam.xfam.org/>) (FINN et al., 2016) e CDD/NCBI (LU et al., 2020; MARCHLER-BAUER et al., 2015). O servidor *Phyre*² foi empregado para prever a estrutura tridimensional dos domínios conservados da proteína TlyA e das proteínas hipotéticas encontradas nas demais cepas de *C. diphtheriae*. 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 (KELLEY; STERNBERG, 2009).

3.3.2 Relações filogenéticas da proteína TlyA em *Corynebacterium diphtheriae*

A análise filogenética entre diferentes espécies patogênicas de corinebactérias foi realizada utilizando o programa Mega versão X. A árvore foi construída utilizando o método de máxima verossimilhança, com 1000 réplicas de *bootstrap* e modelo de matriz de distância Jones – Taylor – Thirnton (JTT), com razão de transição/transversão de 2,0 (JONES; TAYLOR; THORNTON, 1992; KUMAR et al., 2018).

3.3.3 Deteção do gene *tlyA* pela reação em cadeia da polimerase (PCR)

O desenho de oligonucleotídeos iniciadores, apresentado na Tabela 4, foi baseado na sequência de DNA para o gene DIP_RS17105 de *C. diphtheriae* biovar *gravis* cepa NCTC

13129, considerando a que apresentava maior similaridade com os homólogos do gene encontrados nas cepas de *C. diphtheriae* utilizadas nesse estudo, após a realização de triagem *in silico* utilizando as cepas sequenciadas no banco de dados do NCBI. Para o desenvolvimento dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) foi utilizado a ferramenta *online* Primer-BLAST e as reações de amplificação *in silico* foram realizadas no site <http://insilico.ehu.es/PCR/>. Foram consideradas satisfatórias temperaturas de anelamento dos pares de base em torno de 60 °C, tamanho variável entre 500 e 800 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.

Para obtenção das suspensões de DNA, foram selecionadas 3 a 5 colônias isoladas, obtidas a partir do crescimento dos cultivos bacterianos de 24 horas, conforme descrito no item 3.1. Em seguida, as colônias foram transferidas para microtubos, previamente identificados, contendo 500 µL de água Milli-Q estéril. As suspensões bacterianas resultantes foram submetidas à fervura por 10 minutos, em banho-maria, imediatamente transferidas para banho de gelo, onde foram resfriadas por 15 minutos, e posteriormente centrifugadas a 12.000 g por 20 segundos. Alíquotas de 2 µL do sobrenadante foram utilizadas nas reações de amplificação. O restante do sobrenadante foi estocado a – 20 °C (PIMENTA et al., 2008b).

A mistura reacional para os ensaios de PCR foi elaborada em cabine asséptica (DNA Workstation Modelo LWS-01 - Loccus, São Paulo, Brasil), em microtubos estéreis livres de DNase, sendo composta de 14,75 µL água Milli-Q estéril, 2,5 µL tampão PCR 10X, 0,75 µL MgCl₂ [50 mM], 1,0 µL de cada oligonucleotídeo iniciador [100 mM], 0,5 µL dNTP [10 mM] e 2,5 µL enzima Taq DNA polimerase [12,5 U/µL] (Invitrogen, Life Technologies, Brasil) para um volume de 23 µL. Em seguida foram adicionados 2 µL do DNA molde extraído de cada cepa bacteriana). O controle da reação de PCR foi obtido substituindo-se o DNA molde por água Milli-Q estéril (NAKAO; POPOVIC, 1997; PIMENTA et al., 2008b).

A amplificação genômica foi realizada em termociclador Applied Biosystems™ Proflex PCR System™ (Life Technologies, EUA), com etapa inicial de desnaturação a 94 °C, por 2 minutos, seguida de 35 ciclos compostos pelas etapas de: desnaturação a 94 °C, por 60 segundos, anelamento a 60 °C, por 1 minuto, e extensão a 72 °C, por 1 minuto e 30 segundos. A etapa final de extensão foi realizada a 72 °C, por 10 minutos (NAKAO; POPOVIC, 1997; PIMENTA et al., 2008b).

Os produtos amplificados foram submetidos à separação eletroforética, a 80 V e 52 mA, por 25 minutos, em gel de agarose a 1,2 % contendo corante *Syber Safe* (E-Gel® CloneWell Agarose Gels with SYBR Safe™ - Invitrogen, Reino Unido), no equipamento E-Gel® iBase™ Power System (Invitrogen, Reino Unido). Ao gel, foram aplicados 10 µL do marcador de peso molecular DNA *ladder* 100 pb (Invitrogen, Reino Unido) ou 20 µL dos produtos de PCR obtidos em cada poço. A visualização dos produtos de amplificação foi realizada em transiluminador de luz ultravioleta (*E-Gel® Safe Imager™ Real-Time Transilluminator* - Invitrogen) e, posteriormente, o gel foi fotografado utilizando o programa *Kodak Digital Science - Electrophoresis Documentation & Analysis System 120*, para verificação da presença da banda de interesse.

Tabela 4 - Sequências oligonucleotídicas iniciadoras para o gene *Shiga-like* de *Corynebacterium diphtheriae*

| Oligonucleotídeos | Sequência (5'→3') | Tm | GC % |
|-------------------|----------------------|-------|-------|
| Hemolisina F | GTCCACGTACAGGGTTTCGT | 59,97 | 55,00 |
| Hemolisina R | ACCTTTCTGGACTGCTTCCG | 59,96 | 55,00 |
| Produto | 720 pb | | |

Legenda: Tm – temperatura média. GC % - conteúdo de guanina e citosina. As sequências foram definidas utilizando a ferramenta *online* Primer-BLAST. Disponível em: [HTTP://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi), acesso em 01 de junho de 2019.

Fonte: A autora

3.3.4 Construção da cepa de *Corynebacterium diphtheriae* mutante LDCIC-A1

Para a ruptura cromossômica do gene *tlyA* hipotético de *C. diphtheriae* foi utilizado o kit de clonagem TOPO® TA (Life Technologies). O DNA cromossômico extraído de acordo com o protocolo do kit *QIAamp DNA Mini Kit* – Qiagen.

A cepa *C. diphtheriae* biovar *gravis* NCTC 13129 foi selecionada como modelo e um fragmento de DNA interno de 720 pb do gene DIP_RS17105 foi amplificado pela PCR com o

seguinte par de iniciadores 5' – GTCCACGTACAGGGTTTCGT – 3', 5' – ACCTTTCTGGACTGCTTCCG – 3', descritos na Tabela 4.

A amplificação foi realizada por 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, hibridização a 60° C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minuto e 30 segundos, com o programa de amplificação iniciado com uma etapa de desnaturação de 94 °C por 2 minutos e com uma etapa final de alongamento de 72 °C por 10 minutos. Os produtos amplificados foram submetidos à separação eletroforética, utilizando gel de agarose a 1,2 % contendo corante *Syber Safe*, para recuperação da banda desejada com o sistema E-Gel®CloneWell Agarose Gels with SYBR Safe™ (Invitrogen®, Reino Unido) no equipamento E-Gel® iBase™ Power System (Invitrogen®, Reino Unido). Quando os produtos amplificados chegaram aos poços inferiores, a corrida foi parada, o material coletado e transferido para um microtubo estéril. A qualidade e quantidade do DNA obtido foram estimadas durante a eletroforese em gel de agarose e em equipamento *Nanovue*.

O fragmento de DNA foi ligado à desoxitimidina 3' (T) do vetor linearizado qPCR 2.1-TOPO (*TOPO® TA Cloning® Kit* – Invitrogen®, Reino Unido) fornecido pelo kit. O plasmídeo resultante 'qPCR2.1-TOPO::DIP_RS17105' foi amplificado em *E. coli* TOP10 Electrocomp™ de acordo com as instruções do fabricante e isolado com o kit PureLink Quick DNA Miniprep Kit (Life Technologies).

Cinco microgramas de plasmídeo não metilado isolado da cepa de *E. coli* foram usados para transformar *C. diphtheriae* usando um GenePulser II (BioRad, Alemanha) baseado em protocolos descritos por (DORELLA et al., 2006).

As células eletroporadas foram adicionadas a 1 mL de TSB e incubadas por 4 horas a 37 °C. O volume de cultura foi semeado em uma placa de ágar TSB contendo o antibiótico canamicina e mantido a 37 °C por 48 horas. Como o qPCR2.1-TOPO não pode se replicar de forma autônoma em *C. diphtheriae*. *C. diphtheriae* resistente à canamicina carregava o vetor que foi integrado via recombinação no gene cromossômico DIP_RS17105 e foi designado LDCIC-A1.

Para confirmar a inserção do plasmídeo no cromossomo da cepa *C. diphtheriae* NCTC 13129, reações de PCR empregando primers que se alinham nos códons de início e fim do gene DIP_RS17105 (5'–GTCCACGTACAGGGTTTCGT–3' e 5' – ACCTTTCTGGACTGCTTCCG – 3') e primers que se alinham dentro do plasmídeo inserido (Kan 1: 5' ATGATTGAACAAGATGGATTG-3' / Kan 2: 5'

TTAATAATTCAGAAGAACTC-3') e M13F/M13R (Life Technologies) foram realizados conforme descrito anteriormente por (DORELLA et al., 2006; PACHECO et al., 2012).

3.3.5 Ensaio de interação bacteriana com células HEp-2

As células HEp-2 (ATCC CCL23), originadas de carcinoma de laringe, foram cultivadas em garrafas plásticas contendo meio de cultivo Mínimo Essencial MEM (*Eagle's Minimal Essential Medium* - Invitrogen) suplementado com gentamicina (50 µg/mL), anfotericina B (2,5 µg/mL), L-glutamina (0,5 % p/v) e 5 % de soro fetal bovino (SFB) (Invitrogen). As células foram mantidas a 37 °C em atmosfera de 5% CO₂. As expansões foram feitas a cada 2 - 3 dias com a dissolução das monocamadas com solução de tripsina-EDTA (0,1 % e 0,01 %) em Salina Tampão Dulbecco com 1 % de vermelho de fenol. Para confecção das placas, os tapetes celulares foram submetidos a tripsinização conforme descrito anteriormente. Nova suspensão celular (2,5 x 10⁶ células/mL) foi preparada em meio MEM e 100 µL desta solução foram dispensados em cada poço da placa de cultura de tecidos, com 96 poços e, após 48 horas, as mesmas foram utilizadas nos ensaios (adaptado de (HIRATA et al., 2002).

As bactérias foram cultivadas em TSB, por um período de 48 horas, e então lavadas duas vezes com tampão fosfato-salino (PBS - 0,01 M, pH 7,4), ressuspensas em MEM a uma concentração de 10⁶ unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL) e utilizadas para infectar as monocamadas celulares contendo 2,5 x 10⁵ células HEp-2 por poço (MOI de 100). O tempo de incubação eleito para este ensaio foi de 3 horas, momento em que parte das monocamadas de células HEp-2 infectadas foram lavadas duas vezes e lisadas com 0,1 % de Triton X-100 em PBS, diluídas e plaqueadas em TSA. Para a determinação de bactérias viáveis no meio intracelular, outra parte das monocamadas foi lavada seis vezes com PBS e tratadas com 150 µg/mL de gentamicina por 1 hora. Findo este tempo, as monocamadas foram lisadas com 0,5 mL de 0,1 % de Triton X-100 em PBS, diluídas e plaqueadas em TSA (adaptado de (HIRATA et al., 2002).

3.3.6 Atividade hemolítica em cepas de diferentes biovars de *Corynebacterium diphtheriae*

A capacidade hemolítica das cepas de *C. diphtheriae* utilizadas neste estudo foi avaliada frente a presença do gene *tox*, em condições de aerofilia e de microaerofilia, com ênfase para a cepa selvagem NCTC 13129 e sua mutante LDCIC-A1. Todos os cultivos bacterianos utilizando a cepa mutante foram acrescidos do antibiótico canamicina, de forma a apresentar concentração final de 25 µg/mL.

Inicialmente, as cepas foram cultivadas em placas de meio ágar nutriente contendo 5 % de sangue de carneiro desfibrinado, conforme descrito por Mattos-Guaraldi e Formiga (1986), fazendo pequenos cortes no ágar, com a própria alça, para facilitar a visualização da hemólise. Após incubação por 24 horas, a 37 °C, a ocorrência da hemólise pôde ser observada pela alteração da coloração do meio de cultivo. As cepas de *C. diphtheriae* que apresentaram a formação de halo ao redor das colônias, com coloração esverdeada ou incolor, foram consideradas positivas para a ocorrência da hemólise, sendo classificadas como alfa-hemólise ou beta-hemólise, respectivamente. As que não apresentaram formação de halo foram consideradas negativas para atividade hemolítica (MATTOS-GUARALDI; FORMIGA, 1992).

Os cultivos também foram submetidos a crescimento em microaerofilia, usando a jarra de anaerobiose (AnaeroPack jar - Mitsubishi Gas Chemical Company) durante 24 horas, a 37 °C. A placa controle foi submetida a crescimento em condição de aerofilia.

Com o propósito de quantificar o tamanho dos halos de hemólise e, conseqüentemente, a intensidade da atividade hemolítica, as cepas de *C. diphtheriae*, após crescimento em TSB por 24 horas, a 37 °C, foram ressuspendidas a DO_{570nm} 0.8, sendo aplicado um microlitro de cada suspensão bacteriana à placa de ágar com 5 % de sangue de carneiro desfibrinado e reincubado por 24 horas, a 37 °C, em condições de aerofilia e microaerofilia (adaptado de (MURASE et al., 2012). Os halos foram medidos com o auxílio de paquímetro.

3.3.7 Avaliação da formação de biofilme em superfície de poliestireno

A capacidade das cepas de *C. diphtheriae* aderir ao substrato de poliestireno, formando biofilme, foi avaliada por uma modificação do método semiquantitativo, como

descrito por Gomes e colaboradores (2009), utilizando como controle negativo um tubo contendo meio TSB estéril.

Suspensões bacterianas em meio TSB foram incubadas por 48 horas, a 37 °C, sem agitação e em condições de aerobiose. A partir dessas, foram elaboradas novas suspensões com densidade óptica DO_{570nm} de 0.2 e alíquotas de 200 µl foram transferidas para poços de uma microplaca de poliestireno, com 96 poços de fundo reto, e incubadas por 24 horas, a 37 °C. Em seguida, os poços foram lavados, três vezes com tampão fosfato salino (PBS 0,01M, pH 7,2) estéril e acrescidos de 200 µL de metanol, por 15 minutos, para fixação das bactérias aderidas aos poços. 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 de corante cristal violeta a 2 % foram adicionadas a cada poço e, após cinco 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 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 (DO_c). Quanto aos valores de absorbância obtidos, as cepas foram classificadas como: (i) não-aderentes quando $0 < DO \leq DO_c$, (ii) fracamente aderentes quando $DO_c < DO \leq 2xDO_c$, (iii) moderadamente aderentes quando $2xDO_c < DO \leq 4xDO_c$ e (iv) fortemente aderentes quando $DO > 4xDO_c$ (GOMES et al., 2013, 2009; STEPANOVIĆ et al., 2000).

3.3.8 Avaliação da formação de biofilme em superfície de vidro

A capacidade das cepas de *C. diphtheriae* aderir ao vidro foi avaliada através da deposição de uma camada bacteriana na face interna e/ou na interface meio-ar de um tubo de ensaio estéril 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_{570nm} de 0.2, e incubadas por 48 horas, 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 horas, a 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 CDC E-8392 foram utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente, conforme descrito por Gomes e colaboradores (2009). Após secagem, foram avaliados quanto a 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).

3.3.9 Avaliação da formação de biofilme em vidro sobre condições limitantes de ferro

A limitação de ferro foi uma das condições ambientais impostas para avaliar a expressão de hemolisina. O procedimento foi realizado como descrito no item 3.3.8, porém cada cepa de *C. diphtheriae* foi cultivada em tubos contendo TSB e tubos contendo TSB acrescido do quelante de ferro, 2,2'-dipiridil (Sigma, Alemanha) na concentração de 0,5 mM. O meio de cultivo para a cepa mutante LDCIC-A1 foi também acrescido de canamicina, na concentração de 25 µg/mL, em ambas condições (MOREIRA, 1999). Ao final do experimento, os tubos foram avaliados quanto à intensidade da formação do biofilme pela 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).

3.3.10 Potencial artritogênico da hemolisina TlyA de *Corynebacterium diphtheriae*

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 certificado 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 de projeto inscrito sob PROTOCOLO nº CEUA/029/2015).

A possibilidade de desenvolver osteomielite foi analisada por métodos descritos anteriormente por Dias e colaboradores (2011b) e adaptado por Peixoto e colaboradores (2014). Camundongos foram infectados pela cepa NCTC 13129 (n=2) e pela cepa mutante LDCIC-A1 (n=2), por via intravenosa, através da veia caudal, com 0,2 mL de suspensão bacteriana preparada em solução salina a uma DO₅₇₀ 0.2. Os camundongos controle receberam somente 0,2 mL de solução salina fisiológica estéril (n=2). 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 observados. A artrite foi definida como um eritema visível e/ou inchaço de pelo menos uma articulação (DIAS et al., 2011a; PEIXOTO et al., 2014).

Os procedimentos histopatológicos para melhor avaliar as características do processo infeccioso foram baseados em métodos descritos por Dias e colaboradores (2011a). Resumidamente, os camundongos foram inoculados por via intravenosa com *C. diphtheriae* biovar *gravis* cepa NCTC 13129, ou salina estéril como controle, sendo eutanasiados em câmara de CO₂ após 30 dias. O membro com maior gravidade clínica foi removido assepticamente, fixado em 10 % v/v de formalina durante 24 horas e, em seguida, descalcificadas usando ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 10 % em PBS (0,1 M, pH 7,2), durante 7 dias. Posteriormente, os espécimes foram desidratados, embebidos em parafina, seccionados a 5-7 microns de espessura e corados com hematoxilina e eosina. Neste ponto, os espécimes foram descalcificados em ácido tricloroacético a 5 % (v/v), durante 7 dias, e, em seguida, desidratados, embebidos em parafina, seccionados a 3-4 micra e corados novamente com hematoxilina e eosina. As juntas foram examinadas quanto à presença de sinovite (definida como a espessura da membrana sinovial de mais de duas camadas de células), a extensão do infiltrado (presença de células inflamatórias na região subcutânea e/ou tecidos periarticulares), exsudado (presença de células inflamatórias na cavidade articular), danos na cartilagem e erosão óssea (DIAS et al., 2011a; PEIXOTO et al., 2014).

3.3.11 Análise estatística

Foram realizados, no mínimo, três ensaios independentes em triplicata. As diferenças estatísticas entre os grupos foram avaliadas 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 $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Toxina Shiga-like em *Corynebacterium diphtheriae*

4.1.1 Análise de Bioinformática para a proteína Rbp (Shiga-like)

Os resultados obtidos na Tabela 5 foram baseados na análise comparativa com a cepa *C. ulcerans* 809 que apresenta a proteína Rbp (CULC809_00177), denominada “*putative ribosome-binding protein*” que contém o domínio Pfam 00161, inativador de ribossomos, semelhante a toxina Shiga encontrada em *E. coli*. Diante dos dados apresentados na anotação dos genomas no banco de dados NCBI, consideramos as nomenclaturas *rbp*, para o gene, e Rbp, para a proteína Shiga-like, expressa pelas cepas de *C. diphtheriae*.

A pesquisa por proteínas homólogas entre espécies de *Corynebacterium* spp. demonstrou similaridade entre Rbp de *C. ulcerans* 809 com *C. belfantii* 2937 (cobertura 73% e identidade 35%) e *C. diphtheriae* HC04 (76% e identidade 26%). Enquanto a Rbp de *C. diphtheriae* HC04 apresentou homologia com *C. belfantii* 2937 (cobertura 79% e identidade 95%). Não foram encontradas proteínas homólogas a Rbp de *C. ulcerans* 809 e a Rbp de *C. diphtheriae* HC04 em outras cepas de *C. ulcerans* (BR AD22, FRC 11, NCTC 12077 e FRC 58) e para as espécies *C. rouxii*, *Corynebacterium striatum*, *Corynebacterium amycolatum*, *Corynebacterium mycetoides*, *Corynebacterium occultum* e *C. pseudotuberculosis*.

A partir desta análise foi observado que entre as treze cepas de *C. diphtheriae* com genomas disponíveis no banco de dados do NCBI analisadas, dez cepas apresentaram homologia com a toxina Rbp de *C. ulcerans* 809, sendo identificados cinco alinhamentos significativos, com similaridade e *e-value* superior a 70 %. As sequências homólogas encontradas estavam denominadas como proteínas hipotéticas, sem anotações relacionadas com a toxina Shiga. A cepa *C. diphtheriae* HC04 foi a que apresentou uma proteína hipotética (CDHC04_0155), com 229 aminoácidos, de maior similaridade (76%), quando comparada à proteína Rbp, com 306 aminoácidos, de *C. ulcerans* cepa 809 (Tabela 5).

A Tabela 5 demonstra que todas as cepas de *C. diphtheriae* analisadas apresentaram similaridade com a Rbp de *C. ulcerans* 809: HC01, 241, 31 A, HC02, HC03, INCA 402,

NCTC 13129, ATCC 27012 e ATCC 27010. No entanto, quando as cepas foram comparadas a Rbp de *C. diphtheriae* HC04, a porcentagem de homologia aumentou (Tabela 6).

A investigação de sequências proteicas homólogas a Rbp de *C. ulcerans* 809 e Rbp de *C. diphtheriae* HC04 entre as espécies *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Homo sapiens* não apresentaram similaridade com significância estatística.

Também foi observado que cepas de *C. diphtheriae* produtoras de TD quanto não produtoras TD apresentam gene *rbp* indicando que não há correlação entre a presença do gene *tox* e o grau de identificação da toxina Shiga-like (Tabela 5 e 6).

As sequências proteicas homólogas a toxina Rbp de *C. ulcerans* 809, apresentadas na figura 5, foram alinhadas com nove cepas de *C. diphtheriae*, através do programa online Clustal Omega. As toxinas Shiga-like das cepas de *C. diphtheriae* apresentaram 31 aminoácidos conservados, indicados por um asterisco na linha inferior do alinhamento, que apresentaram o mesmo domínio de inativação de ribossomos (*ribosome inactivating protein – Rbp*), também encontrado na cadeia A de SLT-1 de *Escherichia coli* (toxina Shiga), quando analisados no banco de dados do aplicativo Pfam (Figura 5).

Através de mecanismos de reconhecimento de proteína, homologia e analogia, foi realizada a predição da função da proteína Shiga-like encontrada na cepa *C. diphtheriae* HC04, utilizando o servidor *Phyre*². Os dois primeiros modelos com melhor alinhamento estão apresentados na Figura 6. No primeiro, foram alinhados 118 resíduos da sequência, com 97,1 % de confiança e 52 % de cobertura, com uma proteína inativadora de ribossomos encontrada em uma citotoxina de planta. Enquanto, no segundo modelo, foram alinhados 112 resíduos, com 96,95 % de confiança e 49 % de cobertura, com a proteína da cadeia A da toxina Shiga de *E. coli*.

A predição do peptídeo sinal da proteína Shiga-like revelou que as proteínas Rbp de *C. ulcerans* 809 e Shiga-like da cepa *C. diphtheriae* HC04 apresentaram sequência sinal com sítio de clivagem entre as posições 41-42 (0,97 de confiança) e 34-35 (0,94 de confiança), respectivamente (Figura 7). A análise da topologia destas proteínas indicou a presença de uma região transmembrana localizada na mesma região do peptídeo sinal, para ambas as proteínas investigadas (Figura 8). Estes dados sugerem que a proteína Rbp e Shiga-like são inicialmente clivadas e, posteriormente, secretadas.

Tabela 5 - Análise da proteína Rbp de *C. ulcerans* 809 (CULC809_00177) com diferentes cepas de *Corynebacterium diphtheriae*

| Cepas | <i>tox</i> | <i>rbp</i> | Localização | Proteína | Tamanho | Cobertura | ID | Produto |
|---|-------------|------------|----------------|----------------|---------|-----------|------|--|
| <i>C. ulcerans</i> | | | | | | | | |
| 809 | <i>tox+</i> | <i>rbp</i> | CULC809_00177 | AEG80717.1 | 306 aa | NA | NA | <i>Putative ribosome binding protein</i> |
| <i>C. diphtheriae</i> comparadas a Rbp de <i>C. ulcerans</i> 809 | | | | | | | | |
| HC04 | <i>tox-</i> | NI | CDHC04_0155 | AEX80148.1 | 229 aa | 76 % | 26 % | <i>Putative secreted protein</i> |
| HC01 | <i>tox-</i> | NI | CDHC01_0199 | AEX73452.1 | 201 aa | 73 % | 26 % | <i>Hypothetical protein</i> |
| 241 | <i>tox+</i> | NI | CD241_0197 | AEX43264.1 | 201 aa | 73 % | 26 % | <i>Hypothetical protein</i> |
| CDCE 8392 | <i>tox+</i> | NI | CDCE8392_0199 | WP_238529547.1 | 199 aa | 73 % | 25 % | <i>Hypothetical protein</i> |
| PW8 | <i>tox+</i> | NI | CDPW8_0260 | AEX68922.1 | 109 aa | 75 % | 26 % | <i>Putative secreted protein</i> |
| 31 A | <i>tox+</i> | NI | CD31A_0238 | AEX40922.1 | 187 aa | 56 % | 28 % | <i>Putative secreted protein</i> |
| HC02 | <i>tox-</i> | NI | CDHC02_0198 | AEX75694.1 | 187aa | 50 % | 29 % | <i>Putative secreted protein</i> |
| VA01 | <i>tox+</i> | NI | CDVA01_0147 | AEX82416.1 | 109 aa | 48 % | 28 % | <i>Putative secreted protein</i> |
| ATCC27010 | <i>tox-</i> | NI | CDC7B_0192 | AEX66393.1 | 176 aa | 28 % | 33 % | <i>Putative secreted protein</i> |
| ATCC27012/C7 | <i>tox+</i> | NI | CDC7B_0192 | AEX66393.1 | 176 aa | 28 % | 33 % | <i>Putative secreted protein</i> |
| HC03 | <i>tox-</i> | | CDHC03_RS00870 | WP_014307827.1 | 187 aa | 50 % | 29 % | <i>Hypothetical protein</i> |
| INCA 402 | <i>tox-</i> | | CDB402_RS00865 | WP_014302763.1 | 159 aa | 22 % | 47 % | <i>Hypothetical protein</i> |
| NCTC 13129 | <i>tox+</i> | | DIP_RS12605 | WP_010934140.1 | 159 aa | 22 % | 47 % | <i>Hypothetical protein</i> |

Legenda: NE – não encontrada semelhança com significância estatística. N.I. – não informado. NA – não se aplica. *tox* – gene *tox*, *rbp* – gene *rbp*, aa - aminoácidos, ID - identidade Dados extraídos da ferramenta *online* BLASTp. Disponível no site: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, acesso em 30 de maio de 2022.

Fonte: A autora.

Tabela 6 - Análise da proteína Rbp (CDHC04_0155) de *Corynebacterium diphtheriae* HC04 com demais cepas *Corynebacterium diphtheriae*

| Cepas | <i>tox</i> | <i>rbp</i> | Localização | Proteína | Tamanho | Cobertura | ID | Produto |
|--------------|-------------|------------|----------------|----------------|---------|-----------|-------|----------------------------------|
| HC04 | <i>tox-</i> | NI | CDHC04_0155 | AEX80148.1 | 229 aa | NA | NA | <i>Putative secreted protein</i> |
| HC01 | <i>tox-</i> | NI | CDHC01_0199 | AEX73452.1 | 201 aa | 79 % | 94 % | <i>Hypothetical protein</i> |
| 241 | <i>tox+</i> | NI | CD241_0197 | AEX43264.1 | 201 aa | 79 % | 94% | <i>Hypothetical protein</i> |
| CDCE 8392 | <i>tox+</i> | NI | CDCE8392_0199 | AEX71201.1 | 201 aa | 79 % | 93 % | <i>Hypothetical protein</i> |
| PW8 | <i>tox+</i> | NI | CDPW8_RS01340 | WP_227882325.1 | 185 aa | 79% | 86% | <i>Hypothetical protein</i> |
| 31 A | <i>tox+</i> | NI | CD31A_0238 | AEX40922.1 | 187 aa | 79 % | 87 % | <i>Putative secreted protein</i> |
| HC02 | <i>tox-</i> | NI | CDHC02_0198 | AEX75694.1 | 187aa | 79 % | 87 % | <i>Putative secreted protein</i> |
| ATCC27012/C7 | <i>tox+</i> | NI | CDC7B_0192 | AEX66393.1 | 176 aa | 73 % | 86 % | <i>Putative secreted protein</i> |
| ATCC27010 | <i>tox-</i> | NI | CDC7B_0192 | AEX66393.1 | 176 aa | 73 % | 86 % | <i>Putative secreted protein</i> |
| VA01 | <i>tox+</i> | NI | CDVA01_RS00780 | WP_235697204.1 | 185 aa | 48% | 28% | <i>Putative secreted protein</i> |
| HC03 | <i>tox-</i> | NI | CDHC03_RS00870 | WP_014307827.1 | 187 aa | 79 % | 87 % | <i>Hypothetical protein</i> |
| INCA 402 | <i>tox-</i> | NI | CDB402_0161 | AEX45473.1 | 159 aa | 49% | 90 % | <i>Putative secreted protein</i> |
| NCTC 13129 | <i>tox+</i> | NI | DIP_RS12605 | WP_010934140.1 | 159 aa | 49 % | 100 % | <i>Hypothetical protein</i> |

Legenda: NE – não encontrada semelhança com significância estatística. N.I. – não informado. NA – não se aplica. *tox* – gene *tox*, *rbp* – gene *rbp*, aa - aminoácidos ID - identidade Dados extraídos da ferramenta *online* BLASTp. Disponível no site: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, acesso em 30 de maio de 2022.

Fonte: A autora

Figura 5 - Alinhamento das sequências de aminoácidos de Rbp de *Corynebacterium diphtheriae* e *Corynebacterium ulcerans*

| | | |
|-----------------------------------|--|-----|
| C.ulcerans.809-AEG80717.1 | MLHLKTTYRKT KL RK V RSYF S VL M MAIV--TLGAF L AAP H AS A DD P EV S AV V WR L DQ H DG | 58 |
| C.diphtheriae.HC04-AEX80148.1 | -MRMKVTYNYNIQ-----CCLTAAAKAFALFLFAIPPASAQPSGITSII R WPVGTSDN | 52 |
| C.diphtheriae.C7-AEX66393.1 | -MRMKVTYNYNIQ-----CCLTAAAKAFALFGFAIPPASAQPSGITSII R GSVGTSDN | 52 |
| C.diphtheriae.HC01-AEX73452.1 | -MRMKVTYNYNIQ-----CCLTAAAKAFALFGFDIPPASAQPSGITSII R WPVGTSDN | 52 |
| C.diphtheriae.241-241AEX43264.1 | -MRMKVTYNYNIQ-----CCLTAAAKAFALFGFDIPPASAQPSGITSII R WPVGTSDN | 52 |
| C.diphtheriae.CDCE8392-AEX71201.1 | -MRMKVTYNYNIQ-----CCLTAAAKAFALFGFDIPPASAQPSGITSII R WPVGTSDN | 52 |
| C.diphtheriae.PW8-AEX68922.1 | ----- | 0 |
| C.diphtheriae.VA01-AEX82416.1 | ----- | 0 |
| C.diphtheriae.31A-AEX40922.1 | -MRMKVTYNYNIQ-----CCLTAAAKAFALS L FAIPPASAQPSGITSII R WPVGTSDN | 52 |
| C.diphtheriae.HC02-AEX75694.1 | -MRMKVTYNYNIQ-----CCLTAAAKAFALFGFAIPPASAQPSGITSII R WPVGTSDN | 52 |
| | | |
| C.ulcerans.809-AEG80717.1 | PTVAKE Y RDLLARI G NAVSHPIV N GI G AIPENTATNAR V VDIEV-LTSE G NAVTFH M LRRN | 117 |
| C.diphtheriae.HC04-AEX80148.1 | FSSAT R YRNSAWAVQ Q HL-----AGSDY L TVQLGDRQATPRV S FVMHRS D | 97 |
| C.diphtheriae.C7-AEX66393.1 | FRS A TQYRNSAWAIQ Q C-----PATPRV S FVMRR S D | 83 |
| C.diphtheriae.HC01-AEX73452.1 | FSSATQYRNSARAIQ Q RL-----AGSDY L TVQLGDRQTTPRV S FVMHRS D | 97 |
| C.diphtheriae.241-241AEX43264.1 | FSSATQYRNSARAIQ Q RL-----AGSDY L TVQLGDRQTTPRV S FVMHRS D | 97 |
| C.diphtheriae.CDCE8392-AEX71201.1 | FNSATQYRNSARAIQ Q RP-----AGSDY L TVQLGNRQATPRV S FVMHRS D | 97 |
| C.diphtheriae.PW8-AEX68922.1 | -----MRRSD | 5 |
| C.diphtheriae.VA01-AEX82416.1 | -----MRRSD | 5 |
| C.diphtheriae.31A-AEX40922.1 | FNSATQYRNSAWI Q QR-----PATPRV S FVMRR S D | 83 |
| C.diphtheriae.HC02-AEX75694.1 | FNSATQYRNSAWAI H QR-----PATPRV L FVMRR S D | 83 |
| | * * : | |
| | | |
| C.ulcerans.809-AEG80717.1 | MYIQAF T LSGTTYITSDAFGR L ISGAGLPFSSDYASLGAHNTGNI S DP T LF T VGGASLD | 177 |
| C.diphtheriae.HC04-AEX80148.1 | MYVLGFIIIDGTTYLVSDADASPLSNVHQLGFSSEYATLLQ R G--N V ESLSR----- | 146 |
| C.diphtheriae.C7-AEX66393.1 | MYVLGFIIIDGTTYLVSDADASPLSNVHQLGFSSEYATLLQ R G--N V ESLSR----- | 132 |
| C.diphtheriae.HC01-AEX73452.1 | MYVLGFIIIDGTTYLVSDADASPLSNVHQLGFSSEYATLFQ R G--N V ESLSR----- | 146 |
| C.diphtheriae.241-241AEX43264.1 | MYVLGFIIIDGTTYLVSDADASPLSNVHQLGFSSEYATLFQ R G--N V ESLSR----- | 146 |
| C.diphtheriae.CDCE8392-AEX71201.1 | MYVLGFIIIDGTTYLVSDADASPF S SNVHQLGFSSEYATLFQ R G--N V ESLSR----- | 146 |
| C.diphtheriae.PW8-AEX68922.1 | MYVLGFIIIDGTTYLVSDADASPF N NVHQLGFSSEYATLLQ R G--N V ESLSR----- | 54 |
| | | |
| C.diphtheriae.HC02-AEX75694.1 | MYVLGFIIIDGTTYLVSDADASPLSNVHQLGFSSEYATLLQ R G--N V ESLSR----- | 132 |
| | ** : * : : ** * : : ** * : : * * * : ** * : : * : : : | |

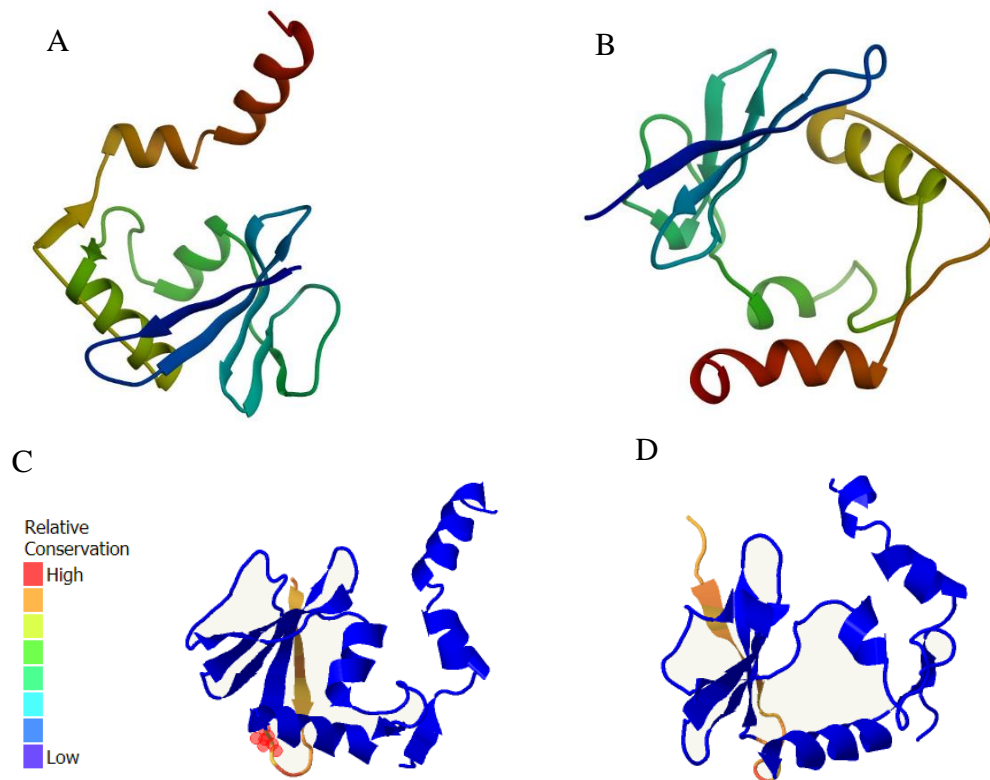
Figura 5 - Alinhamento das sequências de aminoácidos de Rbp de *Corynebacterium diphtheriae* e *Corynebacterium ulcerans* (continuação)

| | | |
|------------------------------------|--|-----|
| C. ulcerans.809-AEG80717.1 | TLLCNLFHAVENTQNFRNSAARALYAAAILFSEATRFSPSLGRNIAQAIENGHYPYNTNA | 237 |
| C. diphtheriae.HC04-AEX80148.1 | -----LPLSLASWNVAIDHAISQGRPYNF TLS | 173 |
| C. diphtheriae.C7-AEX66393.1 | -----LPLSLASWNVAIDHAISQGRPY---- | 154 |
| C. diphtheriae.HC01-AEX73452.1 | -----LPLSLASWNIAIDNAISQGRPYNF TLS | 173 |
| C. diphtheriae.241-241AEX43264.1 | -----LPLSLASWNIAIDNAISQGRPYNF TLS | 173 |
| C. diphtheriae.CDCE8392-AEX71201.1 | -----LPLSLASWNVAIDNAISQGRPYNF TLS | 173 |
| C. diphtheriae.PW8-AEX68922.1 | -----LPLSLASWNVVIDNAISQGRPYNF TLS | 81 |
| C. diphtheriae.VA01-AEX82416.1 | -----LPLSLASWNVVIDHAISQGRPYNF TLS | 81 |
| C. diphtheriae.31A-AEX40922.1 | -----LPLSLASWNVAIDRAISQGRPYNF TLS | 159 |
| C. diphtheriae.HC02-AEX75694.1 | -----LPLSLASWNVAIDNAISQGRPYNF TLS | 159 |
| | * . * .** .: ** | |
| C. ulcerans.809-AEG80717.1 | DSEMIRNWGQLSNWGRAQLQSPNQPPFQLPPHVRANREGRPDGHGVDKVKNMTTLAWLLG | 297 |
| C. diphtheriae.HC04-AEX80148.1 | DEELVRNWGTLSGWRRRISQDP T AERFHNPGHIAWTD SGR TAYEI -YTHLMIFSHW--- | 229 |
| C. diphtheriae.C7-AEX66393.1 | -----NWGTPQRLEAAHKPSPNRGTI--P----- | 176 |
| C. diphtheriae.HC01-AEX73452.1 | DEELIRNWGTPQRLEAAHKPGPNRGTI--P----- | 201 |
| C. diphtheriae.241-241AEX43264.1 | DEELIRNWGTPQRLEAAHKPGPNRGTI--P----- | 201 |
| C. diphtheriae.CDCE8392-AEX71201.1 | DEELIRNWGTPQRLEAAHKPGPNRGTI--P----- | 201 |
| C. diphtheriae.PW8-AEX68922.1 | DEELIRNWGTPQQLLEAAHKPSPNRGTI--P----- | 109 |
| C. diphtheriae.VA01-AEX82416.1 | DEELIRNWGTPQRLEAAHKPRPNLGTI--P----- | 109 |
| C. diphtheriae.31A-AEX40922.1 | DEELIRNWGTPQRLEAAHKPGPNRGTI--P----- | 187 |
| C. diphtheriae.HC02-AEX75694.1 | DEELIRNWGTPQRLEAAHKPRPNRGTI--P----- | 187 |
| | *** . * . : | |
| C. ulcerans.809-AEG80717.1 | VLAIK VSG | 306 |
| C. diphtheriae.HC04-AEX80148.1 | ----- | 229 |
| C. diphtheriae.C7-AEX66393.1 | ----- | 176 |
| C. diphtheriae.HC01-AEX73452.1 | ----- | 201 |
| C. diphtheriae.241-241AEX43264.1 | ----- | 201 |
| C. diphtheriae.CDCE8392-AEX71201.1 | ----- | 201 |
| C. diphtheriae.PW8-AEX68922.1 | ----- | 109 |
| C. diphtheriae.VA01-AEX82416.1 | ----- | 109 |
| C. diphtheriae.31A-AEX40922.1 | ----- | 187 |
| C. diphtheriae.HC02-AEX75694.1 | ----- | 187 |

Legenda: As sequências de aminoácidos dos homólogos de Rbp de corinebactérias foram alinhados por Clustal Omega. Na linha inferior do alinhamento: um asterisco indica que os aminoácidos são 100 % conservados em todas as sequências analisadas; um ponto (.) indica alteração em um resíduo de aminoácidos; e dois pontos indicam alterações em dois resíduos de aminoácidos. A ausência de símbolos na linha inferior de cada série indica a presença de pelo menos três aminoácidos diferentes entre as sequências analisadas. Disponível no site: <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>. Acesso em 01/05/2022.

Fonte: A autora.

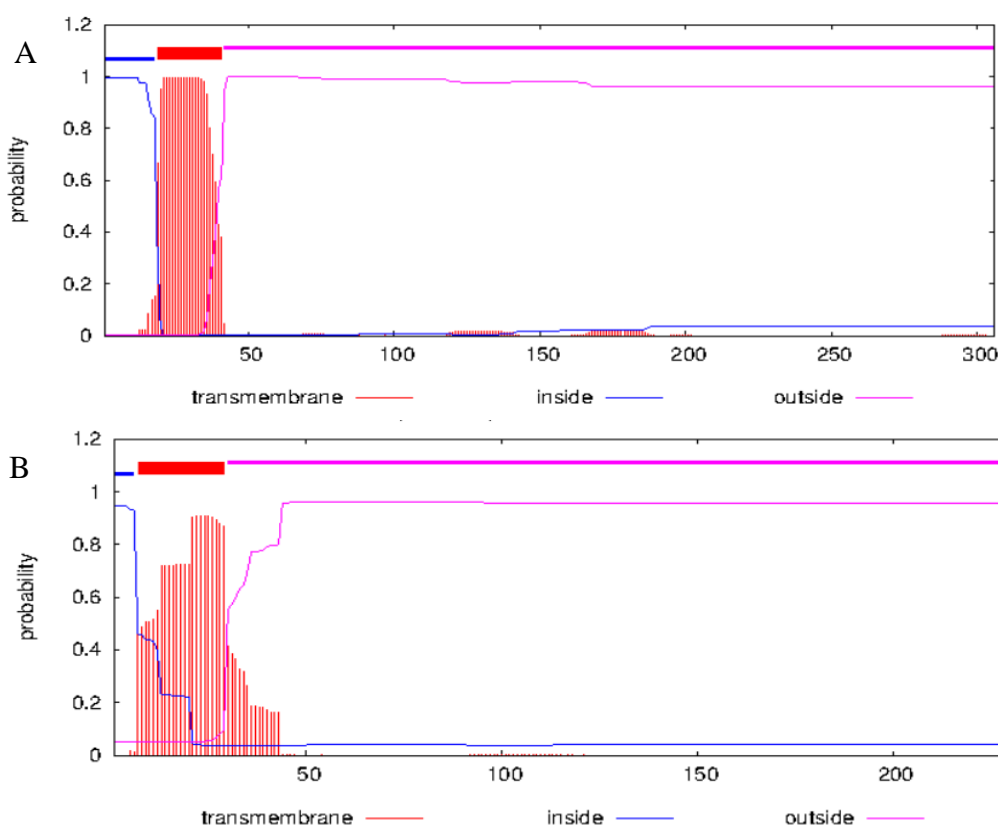
Figura 6 - Modelos tridimensionais análogos a proteína Shiga-like encontrada em cepa de *Corynebacterium diphtheriae* HC04



Legenda: Modelos tridimensionais análogos à proteína Shiga-like de *C. diphtheriae* cepa HC04. **A)** Estrutura tridimensional da citotoxina, com domínio proteico inativador de ribossomos, encontrada em plantas. **B)** Estrutura tridimensional da cadeia A da toxina Shiga de *E. coli*. Região com maior quantidade de resíduos conservados encontrados: **C)** na citotoxina de planta; **D)** na cadeia A da toxina Shiga de *E. coli*. A diferença de cores no modelo tridimensional mostra a região que contém resíduos conservados. Quanto mais próximo do vermelho maior a quantidade de resíduos conservados, importantes para conferir a estrutura e a função da proteína.

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 2018.

Figura 8 - Predição das regiões transmembranas das proteínas Rbp de *Corynebacterium ulcerans* cepa 809 e de Shiga-like de *Corynebacterium diphtheriae* cepa HC04



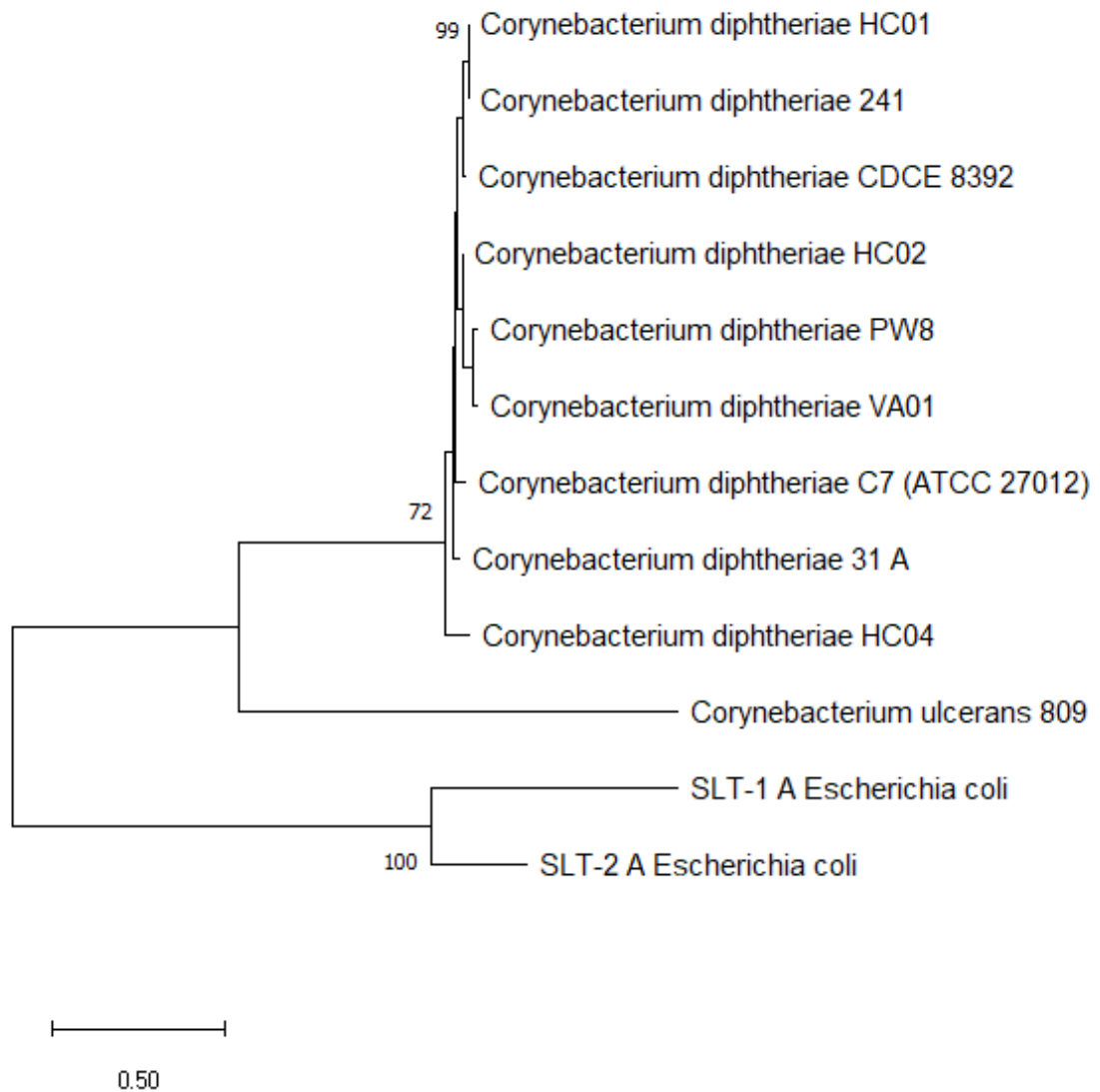
Legenda: **A)** Região transmembrana da proteína Rbp de *C. ulcerans* cepa 809; **B)** Região transmembrana da proteína Shiga-like de *C. diphtheriae* cepa HC04.

Fonte: Dados fornecidos pelo aplicativo online TMHMM 2. Disponível no site: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>, acesso em 15 de junho de 2022.

4.1.2 Relações filogenéticas da proteína Rbp de *Corynebacterium diphtheriae*

A análise filogenética da proteína Rbp (toxina Shiga-like), demonstrou uma possível ancestralidade comum entre as cepas patogênicas de *C. diphtheriae*, uma vez que foram agrupadas no mesmo clado. As proteínas apresentam diferenças entre *C. diphtheriae* e *C. ulcerans* 809, agrupadas separadamente por espécies. Além disso, parecem não possuir relação com a toxina diftérica, uma vez que são agrupadas independente da presença do gene *tox*. Os valores de *bootstrap* indicam a confiabilidade do *cluster* descendente. Percentuais acima de 70 % são considerados confiáveis. Os ensaios experimentais envolveram a análise de 12 sequências de aminoácidos em um total de 370 posições (Figura 9).

Figura 9 - Análise filogenética das proteínas Rbp de *Corynebacterium ulcerans* 809 e cepas de *Corynebacterium diphtheriae*



Legenda: Árvore filogenética baseada nas sequências de aminoácidos do gene *rbp*, utilizando o método de máxima verossimilhança e matriz de distância Jones-Taylor-Thirnton. Valores de *bootstrap* com 1000 réplicas. Barra de escala indica 0.5% de divergência. Para a construção desta árvore foram utilizadas as sequências de aminoácidos do gene *rbp* de nove cepas de *C. diphtheriae*, uma cepa de *C. ulcerans*, uma proteína SLT-1 A (número de acesso no GenBank: GI:134536) e uma proteína SLT-2 A (número de acesso no GenBank: GI:93760) de *E. coli*.

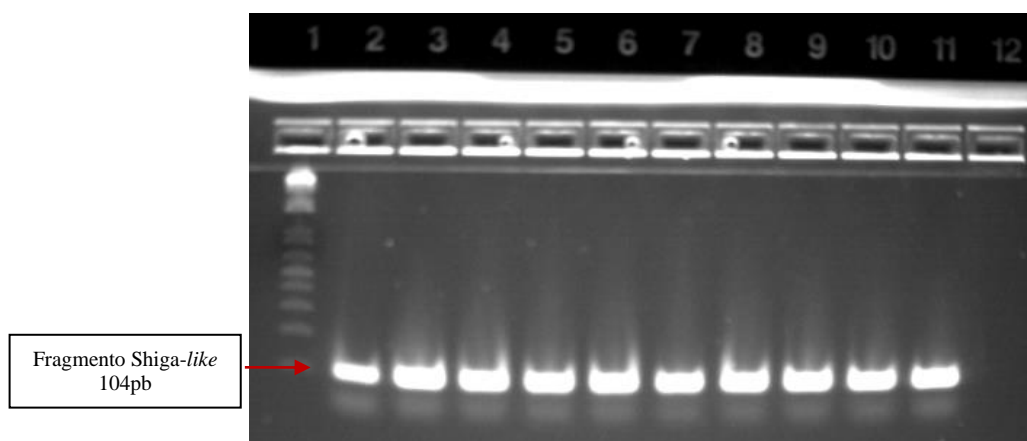
Fonte: A autora.

4.1.3 Detecção do gene *rbp* (Shiga-like) por PCR

Os ensaios de PCR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores para o gene *rbp* nas cepas de *C. diphtheriae* foram desenvolvidos durante o presente estudo utilizando o *software online Primer BLAST* (NCBI). O normalizador escolhido para a reação de RT-qPCR foi o gene *dtxR*, enquanto a sequência do gene correspondente à proteína hipotética Shiga-like de *C. diphtheriae* cepa HC04, com maior número de aminoácidos conservados para Rbp de *C. ulcerans* cepa 809, foi o gene-alvo, conforme Tabela 4 (item 3.2.3).

Para confirmar a efetividade dos oligonucleotídeos confeccionados e verificar se as cepas de *C. diphtheriae*, com sequenciamento no NCBI utilizadas neste estudo, apresentariam bandas equivalentes ao gene alvo, foram realizadas reações de PCR convencional. As reações de amplificação da PCR indicaram, conforme apresentado na Figura 10, que todas as cepas de *C. diphtheriae* utilizadas, independente da presença ou ausência da TD, representada pelo gene *tox*, apresentaram produto de amplificação com 104 pb.

Figura 10 - Eletroforese em gel de agarose 1,2% com o produto da amplificação do gene codificador da proteína Shiga-like de *C. diphtheriae*



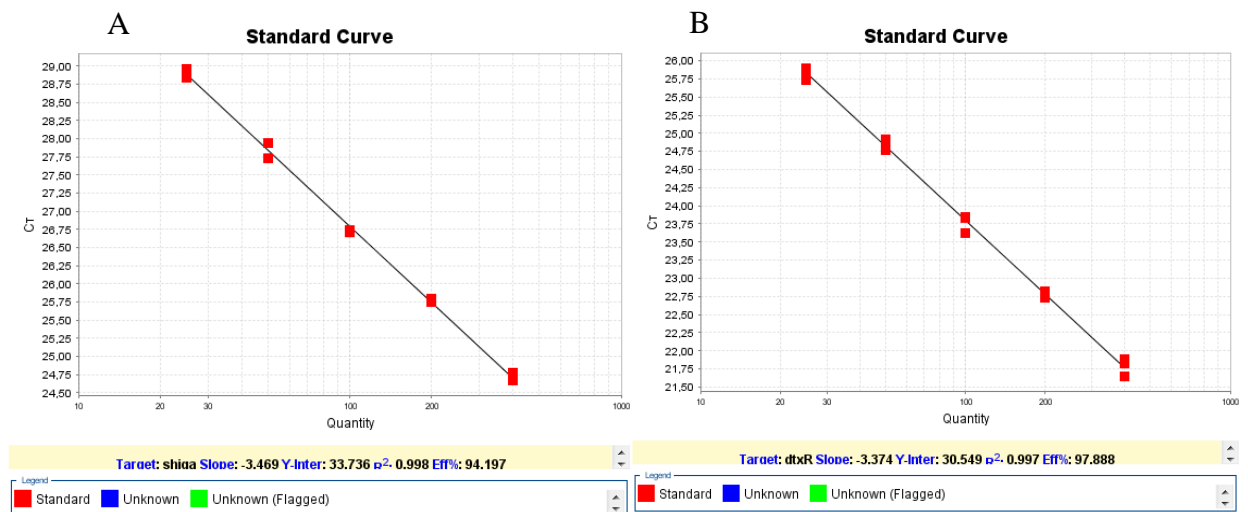
Legenda: 1) PM (peso molecular) 2) HC04, 3) 241, 4) CDC-E-8392, 5) HC02 6) HC01, 7) ATCC27012 8) 814, 9) PW8, 10) VA01, 11) *C. ulcerans* 809, 12) Controle negativo.

Fonte: A autora

4.1.4 Avaliação da expressão do gene *rbp* de *Corynebacterium diphtheriae*

A eficiência de amplificação para cada par de iniciadores utilizado no qPCR foi demonstrada na Figura 11. De acordo com os ensaios realizados, a eficiência de amplificação obtida para os genes codificador da proteína Shiga-like e *dtxR* foi de aproximadamente 0,998 (94,2 %) e 0,997 (97,8 %), respectivamente. Foi observada eficiência de amplificação satisfatória para todos os iniciadores utilizados, uma vez que valores de eficiência entre 0,9 e 1,1, correspondente a eficiência da reação entre 90-110 %, são recomendados para validação dos ensaios de qPCR. Além disso, deve-se considerar que diferença entre a eficiência do gene-alvo e do *housekeeping* não ultrapasse 10%.

Figura 11 - Curva padrão da eficiência de amplificação dos iniciadores utilizados nos ensaios de RT-qPCR



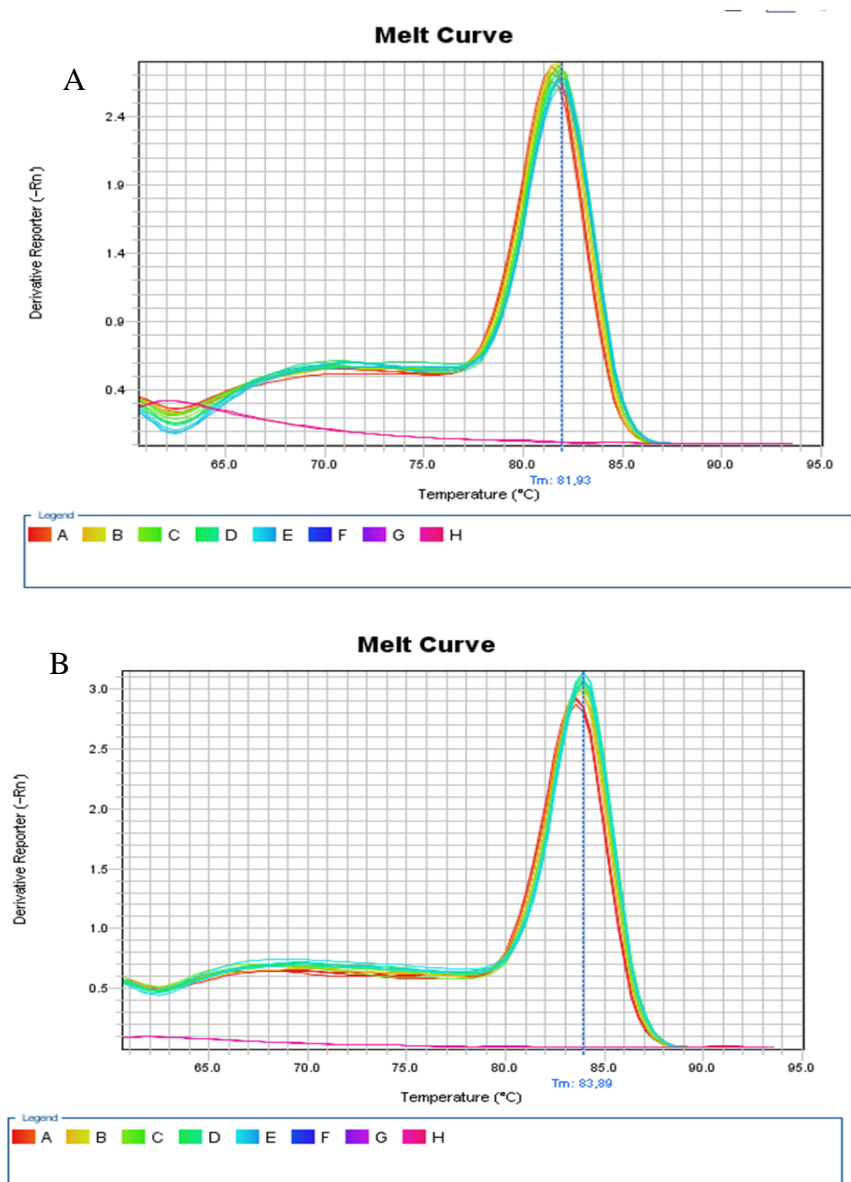
Legenda: Curva padrão da eficiência de amplificação dos iniciadores utilizados nos ensaios de RT-qPCR: A) gene codificador da proteína hipotética Shiga-like de *C. diphtheriae* cepa HC04, gene alvo. B) gene *dtxR*, normalizador da reação de RT-qPCR. Foram realizadas cinco diluições seriadas de amostra de cDNA, obtido pela transcrição reversa do RNA extraído de *C. diphtheriae* HC01. O gráfico é representativo de 3 experimentos independentes em triplicata.

Fonte: A autora.

As curvas geradas na Figura 12, indicam os picos máximos de fluorescência relativos à temperatura média de dissociação do DNA, com uma diferença menor que 0,5 grau entre os transcritos, indicando a presença de um fragmento de DNA amplificado específico. A

temperatura média de dissociação foi de 81,93 °C para o gene alvo e 83,89 °C para o gene normalizador.

Figura 12 - Curvas de dissociação contínua obtidas para os produtos amplificados relativos aos transcritos do gene alvo e do gene normalizador

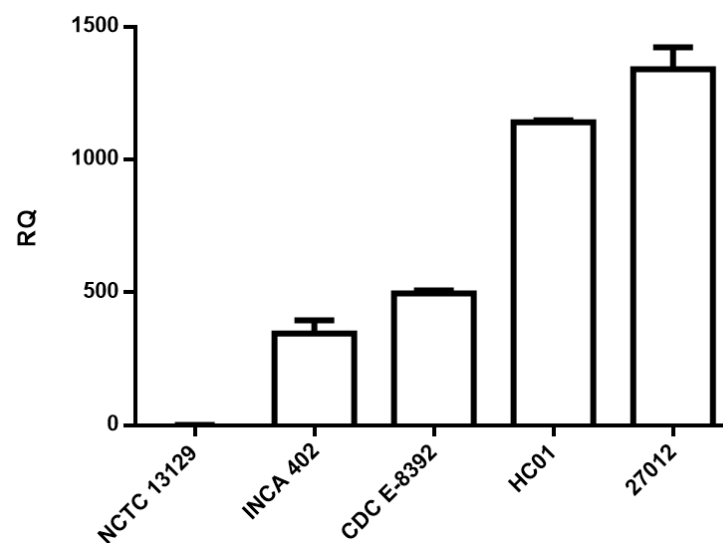


Legenda: Curvas de dissociação contínua obtidas para os produtos amplificados relativos aos transcritos do gene alvo e do gene normalizador. É possível observar picos aproximados de fluorescência entre as reações, cuja média da temperatura de dissociação é de 81,93°C para o gene alvo e 83,89 °C para o gene normalizador. O gráfico é representativo de 3 experimentos independentes em triplicata.

Fonte: A autora.

A expressão do gene *dtxR* está sujeita a variações entre as espécies por ser um gene regulatório, não sendo uma escolha adequada para gene normalizador das reações de RT-qPCR. Devido a este fato, as reações do RT-qPCR estão sendo reanalisadas utilizando o gene *rpoB* como gene normalizador, para que comparações entre a intensidade da expressão diferencial do gene *rbp* possam ser realizadas entre as diferentes cepas de *C. diphtheriae* (experimentos em andamento devido a pandemia de COVID-19). No entanto, os resultados apresentados permitem observar que as cepas ATCC 27012 e HC01, que apresentam maior homologia com a Rbp de *C. ulcerans* 809, parecem expressar o gene, enquanto as cepas NCTC 13129 e INCA 402, com baixa similaridade com a Rbp, parecem não expressar ou tem sua expressão diminuída (Figura 13).

Figura 13 - Quantificação relativa da expressão do gene *rbp* codificador da toxina Shiga-like em cepas de *Corynebacterium diphtheriae* após incubação a 37°C



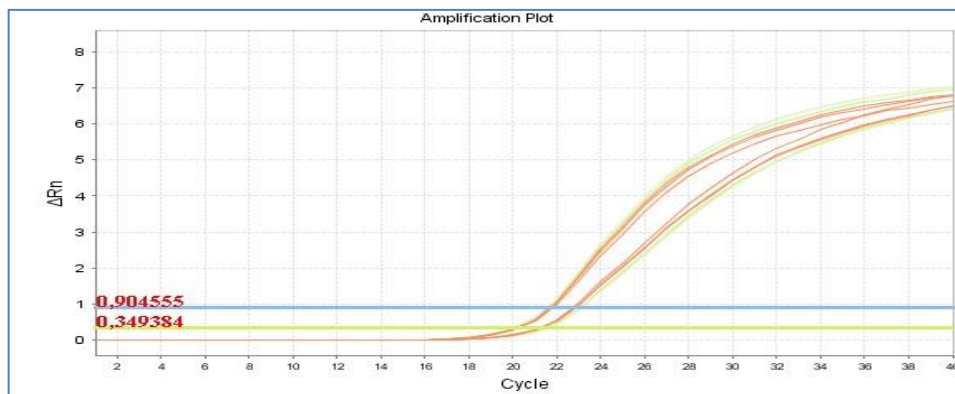
Legenda: Análise da expressão do gene *rbp* em cepas de *C. diphtheriae* durante crescimento a 37°C. Os dados apresentados representam as médias \pm SD de três experimentos independentes, em triplicata, onde $p \leq 0,05$ quando as cepas são comparadas entre si.

Fonte: A autora.

4.1.5 Avaliação da influência da temperatura na expressão do gene *rbp* de *Corynebacterium diphtheriae*

Para avaliar a expressão do gene codificador da toxina Shiga-like em *C. diphtheriae* cepa HC01, submetidas a diferentes condições de temperatura, foi realizada a quantificação relativa (Ct comparativo) por RT-qPCR. Os valores de Ct foram normalizados pelo cálculo da diferença entre os Cts do gene de interesse e os Cts do gene normalizador. Através da diferença do ΔCt da cepa à 4 °C em relação à média do ΔCt na condição controle (37 °C), foi determinado o $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$, que corresponde a variação dos níveis transcricionais em ambas as condições. A Figura 14 apresenta as curvas de amplificação para cada gene.

Figura 14 - Curva de amplificação para os genes analisados

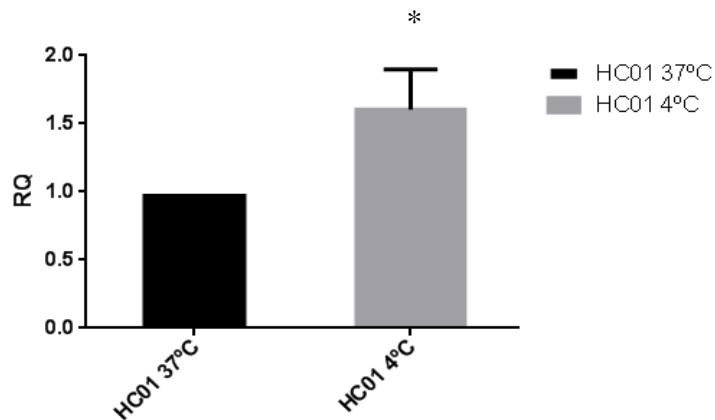


Legenda: Amplificação da curva para os genes *dtxR* e o gene codificador da toxina Shiga-like em *C. diphtheriae* cepa HC01 após submetido a diferenças de temperatura: 4 °C e 37 °C. O gráfico é representativo de 3 experimentos independentes em triplicata.

Fonte: A autora.

A quantificação relativa evidenciou um aumento significativo na expressão do gene codificador da toxina Shiga-like quando *C. diphtheriae* HC01 foi submetida a 4 °C, comparado ao controle (37 °C), mostrando a influência da baixa temperatura na expressão deste gene (Figura 15).

Figura 15 - Quantificação relativa da expressão do gene codificador da toxina Shiga-like em *Corynebacterium diphtheriae* cepa HC01 após incubação em diferentes temperaturas



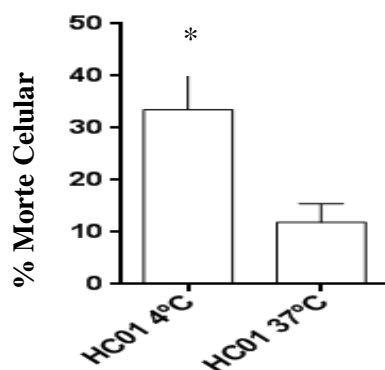
Legenda: Aumento da expressão do gene codificador da toxina Shiga-like em *C. diphtheriae* HC01 durante crescimento a 4°C, em comparação ao crescimento a 37 °C. Os dados apresentados representam as médias \pm SD de três experimentos independentes, em triplicata, onde $p \leq 0,05$ quando a cepa HC01 a 37 °C é comparada com a mesma cepa à 4 °C.

Fonte: A autora.

4.1.6 Citotoxicidade da toxina Shiga-like em *Corynebacterium diphtheriae*

Na pesquisa de produção de toxina Shiga-like, foram investigados os efeitos da citotoxicidade de filtrados das culturas de *C. diphtheriae* cepa HC01 induzidas por mitomicina C (50mg/mL). A morte celular foi quantificada após 3 horas de infecção das células bacterianas em células Vero. Foi observado que a cepa analisada induz uma elevada mortalidade das células Vero a 37 °C, porém a mortalidade é ainda maior a 4 °C (Figura 16). Como a cepa HC01 não apresenta o gene *tox*, a citotoxicidade observada não se refere à ação da toxina diftérica, mas sim a outro possível fator de virulência, que sofre interferência da temperatura.

Figura 16 - Análise da citotoxicidade de *Corynebacterium diphtheriae* cepa HC01 após variações de temperatura



Legenda: Aumento da citotoxicidade de *C. diphtheriae* cepa HC01 cultivada a 4°C. O gráfico mostra que a o percentual de morte de células Vero após infecção com a cepa HC01 de *C. diphtheriae* cepa HC01 cultivada a 4°C ou a 37°C. *Os dados apresentados representam as médias \pm SD de três experimentos independentes, em triplicata, onde $p \leq 0,05$ quando a cepa HC01 a 37°C é comparada com a mesma cepa à 4°C.

Fonte: A autora.

4.2 Hemolisina TlyA em *Corynebacterium diphtheriae*

4.2.1 Análise de Bioinformática para a Hemolisina (TlyA)

Os resultados obtidos foram baseados na análise comparativa com a cepa de *C. diphtheriae* biótipo *gravis* NCTC 13129 que sugeriram a possibilidade de gene(s) codificante(s) de hemolisina(s). Diante dos dados apresentados na anotação dos genomas no banco de dados NCBI, passamos a considerar as nomenclaturas *tlyA*, para o gene, e TlyA, para a proteína da hemolisina, expressa pelas cepas de *Corynebacterium* spp. (n = 29) analisadas.

Homólogos das sequências nucleotídicas e proteicas de TlyA de *C. diphtheriae* NCTC 13129 foram encontrados em diferentes espécies de *Corynebacterium* potencialmente produtoras e não produtoras de toxina diftérica: *C. ulcerans*, *C. rouxii*, *C. belfantii*, *C. striatum*, *C. pseudotuberculosis*, *C. mycetoides*, *C. urealyticum*, *C. occultum*, dentre outras (Tabela 7). Os alinhamentos comparativos dos resíduos de aminoácidos da proteína TlyA

entre as diferentes espécies de corinebactérias, identificaram homologia com alto grau de conservação e similaridade superior a 98%, com *e-value* igual a 0.0. O programa identificou os genes correspondentes como codificadores de uma proteína hipotética com atividade de hemolisina e citotoxina.

Os dados também demonstraram que a proteína TlyA de *C. diphtheriae* NCTC 13129 também apresenta homologia com hemolisinas de diferentes espécies, apresentando 56 % de identidade com *M. tuberculosis* H37Rv; 47 % de identidade com *S. aureus* e 42 % de identidade com *E. coli*, mas não apresenta homologia, com significância estatística, com a espécie humana. Além disso, também foram identificadas sequências homólogas em diferentes espécies de corinebactérias, apresentando percentual de identidade superior a 68 % (Tabela 7).

Tabela 7 - Microrganismos que apresentaram similaridade com a sequência proteica de TlyA de *C. diphtheriae* NCTC 13129

| Identificação gênica | Nome | Função | Identidade de sequência (a nível de proteína) |
|----------------------|---------------|--------------------------------|---|
| DIP_RS17105 | Não informado | citocina/hemolisina hipotética | <i>Corynebacterium belfantii</i> 2937 – 95,60% <i>Corynebacterium rouxii</i> FRC0190– 93,41% <i>Corynebacterium occultum</i> 2039– 77,29% <i>Corynebacterium ulcerans</i> 809 – 75,09% <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> 316 – 74,73% <i>Corynebacterium mycetoides</i> DSM20632– 72,96%* <i>Corynebacterium striatum</i> 215– 71,48%* <i>Corynebacterium amycolatatum</i> FDAARGOS 1107 - 68,13%* <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv – 56,56% <i>Staphylococcus aureus</i> SA201501 – 47,76%* <i>Escherichia coli</i> – 42,42%* <i>Homo sapiens</i> – não teve significância estatística |

Legenda: * Espécies com menos de 100% de cobertura (“query cover”) apresentada no BLASTp. Cobertura apresentada: *C. mycetoides* (98%); *C. striatum* (98%); *C. amycolatatum* (98%); *E. coli* (72%); *S. aureus* (24%); *M. tuberculosis* H37Rv (97%). As demais espécies apresentaram 100% de cobertura.

Fonte: A autora.

O resultado da análise *in silico* de genes codificantes de possíveis hemolisinas demonstrou a presença em 15 cepas de *C. diphtheriae* de diferentes biovars. As proteínas encontradas foram anotadas como proteínas hipotéticas ou pelo nome “*TlyA family RNA methyltransferase*”, ou ainda como “*16S/23S rRNA (cytidine-2'-O) -methyltransferase TlyA*”, pois foi a denominação derivada da análise computacional automatizada, utilizando o “método de predição de gene: homologia de proteínas”, anotada no servidor NCBI, indicando que as sequências ainda não foram identificadas (Tabela 8).

O alinhamento das sequências proteicas consideradas hemolisinas TlyA, foi realizado em 15 cepas de *C. diphtheriae*, apresentando 121 aminoácidos conservados, indicados por um asterisco na linha inferior do alinhamento, inclusive entre as cepas de *C. diphtheriae* subespécie *lausannense* (Figura 17).

A análise *in silico* permitiu verificar que a presença do gene *tlyA* nas cepas de *C. diphtheriae* independe da presença do gene *tox*, uma vez que tanto cepas produtoras quanto cepas não produtoras de TD, apresentaram similaridade com o gene (Tabela 8).

A análise da sequência proteica da TlyA e das hemolisinas hipotéticas encontradas nas demais cepas de *C. diphtheriae*, no banco de dados de proteínas (Pfam), destacou dois domínios conservados, um pertencente à família das metiltransferases dependentes de S-adenosilmetionina (SAM ou AdoMet-MTase) de classe I e outro pertencente ao domínio S4, além de indicar alta similaridade com hemolisinas de diversos organismos, inclusive algumas espécies do gênero *Streptococcus*.

Através de mecanismos de reconhecimento de proteína, homologia e analogia, foi realizada a predição da função da proteína TlyA utilizando o servidor *Phyre*². O domínio conservado com melhor alinhamento está apresentado na Figura 18A. Primeiramente, foram alinhados 273 resíduos da sequência com 100% de confiança e 97% de cobertura com uma hemolisina presente em *Streptococcus thermophilus* (Figura 18B). Análise similar foi realizada com as sequências das proteínas homólogas encontradas em *C. diphtheriae* INCA 814 e *C. diphtheriae* HC01 e o melhor domínio conservado selecionado pelo servidor *Phyre*² foi apresentado na Figura 18 (C e D, respectivamente).

A predição da localização e a quantidade de hélices transmembranares da proteína TlyA foi realizada pelo software TMHMM versão 2.0, demonstrou ausência de regiões transmembrana, sugerindo tratar-se de uma proteína secretada (Figura 19).

A pesquisa *in silico* para a hemolisina TlyA encontrou três genes adicionais cujas anotações nos genomas das cepas investigadas indicava a relação das proteínas codificadas

com hemolisinas. Assim, a cepa *C. diphtheriae* NCTC 13129 foi utilizada como precursor nas pesquisas dos genes e das proteínas homólogas às hemolisinas pesquisadas. A nomenclatura utilizada neste estudo para os genes encontrados foi baseada na família de domínios conservados das proteínas codificadas. Desta forma, os genes foram denominados *tlyC*, *ygfA* e *hlyD* e esta nomenclatura foi inferida a todos os genes codificantes de proteínas homólogas nas cepas analisadas, apresentadas na Tabela 9.

De acordo com os domínios proteicos especificados nas anotações genômicas das cepas analisadas, as proteínas TlyC estão relacionados hemolisinas. O domínio proteico YgfA pertence a superfamília HlyIII, cujos membros são proteínas integrais formadoras de canais de membrana, relacionada com passagem intracelular, secreção e transporte vesicular, inclusive proteínas com atividade hemolítica, como descrito para *Bacillus cereus*. O domínio HlyD está relacionado com a proteína de secreção HlyD, pertencente aos sistemas de secreção de proteínas do tipo 1, mais frequentemente encontrado em bactérias Gram-negativas (LU et al., 2020).

A presença dos quatro genes investigados sugere que o modelo secretor de hemolisina em *C. diphtheriae* seja semelhante ao sistema secretor do tipo 1, com o operon *hlyCABD*, encontrado em *E. coli*.

4.2.2 Análise filogenética das proteínas TlyA em *Corynebacterium spp.*

A análise filogenética da proteína TlyA de *C. diphtheriae* NCTC 13129, com possível atividade de hemolisina, entre as demais cepas de *C. diphtheriae*, demonstrou uma ancestralidade comum, independentes da presença do gene *tox*, uma vez que se agrupam em um clado distinto (Clado A). A análise da TlyA da cepa modelo com as demais espécies de corinebactérias demonstrou um agrupamento em clados distintos para cada espécie, *C. ulcerans*, *C. striatum*, *C. amycolatum*, *C. rouxii* e *C. urealyticum*. Os ensaios experimentais envolveram a análise de 30 sequências de aminoácidos em um total de 280 posições. Os valores de *bootstrap* indicam a confiabilidade do *cluster* descendente. Percentuais acima de 70 % são considerados confiáveis (Figura 20).

Tabela 8 - Análise da proteína TlyA entre as diferentes cepas de *Corynebacterium diphtheriae*

| Cepas | <i>tox</i> | <i>tlyA</i> | Localização | Proteína | Tamanho | % ID | Produto |
|-----------------------|-------------|-------------|----------------|----------------|---------|-------|---|
| <i>C. diphtheriae</i> | | | | | | | |
| NCTC 13129 | <i>tox+</i> | NI | DIP_RS17105 | WP_010934866.1 | 273aa | 100 | Putative cytotoxin/hemolysin |
| BQ11 | <i>tox+</i> | <i>tlyA</i> | B11Q_01245 | AWR15929.1 | 273aa | NI | Putative cytotoxin/hemolysin |
| TH 1526 | <i>tox+</i> | NI | E4651_04905 | QBY11274.1 | 273aa | NI | TlyA family RNA methyltransferase |
| NCTC 3529 | <i>tox+</i> | <i>tlyA</i> | NCTC3529_00417 | VEJ65475.1 | 273aa | NI | Putative cytotoxin/hemolysin |
| NCTC 7838 | <i>tox+</i> | <i>tlyA</i> | NCTC7838_00964 | VEJ63722.1 | 273aa | NI | Putative cytotoxin/hemolysin |
| HC01 | <i>tox-</i> | NI | CDHC01_1109 | AEX74360.1 | 273aa | 99,27 | Putative cytotoxin/hemolysin |
| HC02- | <i>tox-</i> | NI | CDHC02_1090 | AEX76582 | 273aa | 97,80 | Putative cytotoxin/hemolysin |
| HC03 | <i>tox-</i> | NI | CDHC03_1084 | AEX78815.1 | 273aa | 99,27 | Putative cytotoxin/hemolysin |
| HC04 | <i>tox-</i> | NI | CDHC04_1094 | AEX81087.1 | 273aa | 99,27 | Putative cytotoxin/hemolysin |
| INCA 402 | <i>tox-</i> | NI | CDB402_1090 | CDB402_1090 | 273aa | 97,80 | Putative cytotoxin/hemolysin |
| 241 | <i>tox+</i> | NI | CD241_1111 | AEX44176.1 | 273aa | 99,27 | Putative cytotoxin/hemolysin |
| VA01 | <i>tox+</i> | NI | CDVA01_1051 | AEX83320.1 | 273aa | 99,27 | Putative cytotoxin/hemolysin |
| CDCE 8392 | <i>tox+</i> | NI | CDCE8392_1081 | AEX72074.1 | 273aa | 97,44 | Putative cytotoxin/hemolysin |
| PW8 | <i>tox+</i> | NI | CDPW8_1159 | AEX69814 | 273aa | 98,90 | Putative cytotoxin/hemolysin |
| 31 A | <i>tox+</i> | NI | CD31A_1192 | AEX41867.1 | 273aa | 97,80 | Putative cytotoxin/hemolysin |
| 402 (BH8) | <i>tox-</i> | NI | CDBH8_1162 | AEX48685.1 | 273aa | 98,53 | Putative cytotoxin/hemolysin |
| 27010 (C7 (beta)) | <i>tox+</i> | NI | CDC7B_1176 | AEX67372.1 | 273aa | 97,80 | Putative cytotoxin/hemolysin |
| Lausannese CMCNS703 | <i>tox-</i> | NI | E4653_11675 | QBZ30374.1 | 273aa | 95,24 | TlyA family RNA methyltransferase |
| Lausannese CHUV2995 | <i>tox-</i> | <i>tlyA</i> | CHUV2995_01466 | SPJ40664.1 | 273aa | 95,60 | 16S/23S rRNA (cytidine-2'-O)-methyltransferase TlyA |

Legenda: Todas as cepas de *C. diphtheriae* apresentadas na tabela apresentaram cobertura (“query cover”) de 100% para TlyA. N.I. – não informado. Dados extraídos do aplicativo online BLASTp. Disponível no site: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, acesso em 30 de maio de 2022.

Fonte: A autora.

Figura 17 - Alinhamento das seqüências de aminoácidos da proteína TlyA das diferentes espécies de corinebactérias

| | | | | | |
|---------------------------------|--|-----|---------------------------------|--|-----|
| C.amycolatumFDAARGOS_991 | -MAKKAPKRRLLDAELVRRMIARSREAAVDMIKAGRVEVGGFVASKPATAVTGDVSI | 59 | C.amycolatumFDAARGOS_991 | VGYGQLIWRLLQDDPRVWVLDRTNVRTLTPETLGGTAAMVGDLSFISLKLVLPAIVSCLD | 179 |
| C.amycolatumFDAARGOS_938 | -MAKKAPKRRLLDAELVRRMIARSREAAVDMIKAGRVEVGGFVASKPATAVTGDVSI | 59 | C.amycolatumFDAARGOS_938 | VGYGQLIWRLLQDDPRVWVLDRTNVRTLTPETLGGTAAMVGDLSFISLKLVLPAIVSCLD | 179 |
| C.amycolatumFDARGOS_1107.1 | -MAKKAPKRRLLDAELVRRMIARSREAAVDMIKAGRVEVGGFVASKPATAVTGDVSI | 59 | C.amycolatumFDARGOS_1107.1 | VGYGQLIWRLLQDDPRVWVLDRTNVRTLTPETLGGTAAMVGDLSFISLKLVLPAIVSCLD | 179 |
| C.amycolatumFDARGOS_1108 | -MAKKAPKRRLLDAELVRRMIARSREAAVDMIKAGRVEVGGFVASKPATAVTGDVSI | 59 | C.amycolatumFDARGOS_1108 | VGYGQLIWRLLQDDPRVWVLDRTNVRTLTPETLGGTAAMVGDLSFISLKLVLPAIVSCLD | 179 |
| C.striatum215 | ---MPPQRRRLDAELVRRKIARSREQAVEMIKGGRVTVGGFKASKPATVVEPEVSIKVEA | 57 | C.striatum215 | VGYGQLLWRLQDDRVKVMDRTNIRNLTELETGQCDAMVGDLSFISLKLVLPAIVDMA | 173 |
| C.striatumFDAARGOS_1115 | ---MPPQRRRLDAELVRRKIARSREQAVEMIKGGRVTVGGFKASKPATVVEPEVSIKVEA | 57 | C.striatumFDAARGOS_1115 | VGYGQLLWRLQDDRVKVMDRTNIRNLTELETGQCDAMVGDLSFISLKLVLPAIVDMA | 173 |
| C.striatumFDAARGOS_1197.1 | ---MPPQRRRLDAELVRRKIARSREQAVEMIKGGRVTVGGFKASKPATVVEPEVSIKVEA | 57 | C.striatumFDAARGOS_1197.1 | VGYGQLLWRLQDDRVKVMDRTNIRNLTELETGQCDAMVGDLSFISLKLVLPAIVDMA | 173 |
| C.urealyticumFDAARGOS_996 | MAKKGQRLQLDAELVRRKIARSREAAQMKIKRGRVQVNGMLAQKPAVGNVAEVSIRVAE | 60 | C.urealyticumFDAARGOS_996 | VGYGQLIWRLLQDDPRVWVLDRTNVRTLTPETLGGTAAMVGDLSFISLKLVLPAIVDMA | 179 |
| C.ulceransFRC58 | ---MASRKRLLDAELVRRKIARSREHAVDMIRGGQVYVQGLATKPAQVPEASIRVEE | 56 | C.ulceransFRC58 | VGYGQLLWRLQDDRVKVMDRTNIRNLTELETGQCDAMVGDLSFISLKLVLPAIVDMA | 173 |
| C.ulcerans210931 | ---MASRKRLLDAELVRRKIARSREHAVDMIRGGQVYVQGLATKPAQVPEASIRVEE | 56 | C.ulcerans210931 | VGYGQLLWRLQDDRVKVMDRTNIRNLTELETGQCDAMVGDLSFISLKLVLPAIVDMA | 173 |
| C.ulceransBRAD22 | ---MASRKRLLDAELVRRKIARSREHAVDMIRGGQVYVQGLATKPAQVPEASIRVEE | 56 | C.ulceransBRAD22 | VGYGQLLWRLQDDRVKVMDRTNIRNLTELETGQCDAMVGDLSFISLKLVLPAIVDMA | 173 |
| C.ulcerans0102 | ---MASRKRLLDAELVRRKIARSREHAVDMIRGGQVYVQGLATKPAQVPEASIRVEE | 56 | C.ulcerans0102 | VGYGQLLWRLQDDRVKVMDRTNIRNLTELETGQCDAMVGDLSFISLKLVLPAIVDMA | 173 |
| C.ulcerans809 | ---MASRKRLLDAELVRRKIARSREHAVDMIRGGQVYVQGLATKPAQVPEASIRVEE | 56 | C.ulcerans809 | VGYGQLLWRLQDDRVKVMDRTNIRNLTELETGQCDAMVGDLSFISLKLVLPAIVDMA | 173 |
| C.rouxii | ---MQPKRRRLDAELVRRKIARSREQAVEMIKGGRVTVGGFKASKPATVVEPEVSIKVEA | 56 | C.rouxii | VGYGQLLWRLQDDRVKVMDRTNIRNLTELETGQCDAMVGDLSFISLKLVLPAIVDMA | 173 |
| C.diphtheriaeausannenseCMCNS703 | ---MQPKRRRLDAELVRRKIARSREQAVEMIKGGRVTVGGFKASKPATVVEPEVSIKVEA | 56 | C.diphtheriaeausannenseCMCNS703 | VGYGQLIWRLLQDDRVKVMDRTNIRNLTELETGQCDAMVGDLSFISLKLVLPAIVDMA | 173 |
| C.diphtheriaeausannenseCHUV2995 | ---MQPKRRRLDAELVRRKIARSREQAVEMIKGGRVTVGGFKASKPATVVEPEVSIKVEA | 56 | C.diphtheriaeausannenseCHUV2995 | VGYGQLIWRLLQDDRVKVMDRTNIRNLTELETGQCDAMVGDLSFISLKLVLPAIVDMA | 173 |
| C.diphtheriaeHC02 | ---MQPKRRRLDAELVRRKIARSREQAVEMIKGGRVTVGGFKASKPATVVEPEVSIKVEA | 56 | C.diphtheriaeHC02 | VGYGQLIWRLLQDDRVKVMDRTNIRNLTELETGQCDAMVGDLSFISLKLVLPAIVDMA | 173 |
| C.diphtheriaeINCA402 | ---MQPKRRRLDAELVRRKIARSREQAVEMIKGGRVTVGGFKASKPATVVEPEVSIKVEA | 56 | C.diphtheriaeINCA402 | VGYGQLIWRLLQDDRVKVMDRTNIRNLTELETGQCDAMVGDLSFISLKLVLPAIVDMA | 173 |
| C.diphtheriae31A | ---MQPKRRRLDAELVRRKIARSREQAVEMIKGGRVTVGGFKASKPATVVEPEVSIKVEA | 56 | C.diphtheriae31A | VGYGQLIWRLLQDDRVKVMDRTNIRNLTELETGQCDAMVGDLSFISLKLVLPAIVDMA | 173 |
| C.diphtheriaeC7(beta) | ---MQPKRRRLDAELVRRKIARSREQAVEMIKGGRVTVGGFKASKPATVVEPEVSIKVEA | 56 | C.diphtheriaeC7(beta) | VGYGQLIWRLLQDDRVKVMDRTNIRNLTELETGQCDAMVGDLSFISLKLVLPAIVDMA | 173 |
| C.diphtheriaeCDC8392 | ---MQPKRRRLDAELVRRKIARSREQAVEMIKGGRVTVGGFKASKPATVVEPEVSIKVEA | 56 | C.diphtheriaeCDC8392 | VGYGQLIWRLLQDDRVKVMDRTNIRNLTELETGQCDAMVGDLSFISLKLVLPAIVDMA | 173 |
| C.diphtheriaeBH8 | ---MQPKRRRLDAELVRRKIARSREQAVEMIKGGRVTVGGFKASKPATVVEPEVSIKVEA | 56 | C.diphtheriaeBH8 | VGYGQLIWRLLQDDRVKVMDRTNIRNLTELETGQCDAMVGDLSFISLKLVLPAIVDMA | 173 |
| C.diphtheriarPW8 | ---MQPKRRRLDAELVRRKIARSREQAVEMIKGGRVTVGGFKASKPATVVEPEVSIKVEA | 56 | C.diphtheriarPW8 | VGYGQLIWRLLQDDRVKVMDRTNIRNLTELETGQCDAMVGDLSFISLKLVLPAIVDMA | 173 |
| C.diphtheriaeNCT13129CAE49703.1 | ---MQPKRRRLDAELVRRKIARSREQAVEMIKGGRVTVGGFKASKPATVVEPEVSIKVEA | 56 | C.diphtheriaeNCT13129CAE49703.1 | VGYGQLIWRLLQDDRVKVMDRTNIRNLTELETGQCDAMVGDLSFISLKLVLPAIVDMA | 173 |
| C.diphtheriaeHC01 | ---MQPKRRRLDAELVRRKIARSREQAVEMIKGGRVTVGGFKASKPATVVEPEVSIKVEA | 56 | C.diphtheriaeHC01 | VGYGQLIWRLLQDDRVKVMDRTNIRNLTELETGQCDAMVGDLSFISLKLVLPAIVDMA | 173 |
| C.diphtheriaeHC03 | ---MQPKRRRLDAELVRRKIARSREQAVEMIKGGRVTVGGFKASKPATVVEPEVSIKVEA | 56 | C.diphtheriaeHC03 | VGYGQLIWRLLQDDRVKVMDRTNIRNLTELETGQCDAMVGDLSFISLKLVLPAIVDMA | 173 |
| C.diphtheriaeHC04 | ---MQPKRRRLDAELVRRKIARSREQAVEMIKGGRVTVGGFKASKPATVVEPEVSIKVEA | 56 | C.diphtheriaeHC04 | VGYGQLIWRLLQDDRVKVMDRTNIRNLTELETGQCDAMVGDLSFISLKLVLPAIVDMA | 173 |
| C.diphtheriae241 | ---MQPKRRRLDAELVRRKIARSREQAVEMIKGGRVTVGGFKASKPATVVEPEVSIKVEA | 56 | C.diphtheriae241 | VGYGQLIWRLLQDDRVKVMDRTNIRNLTELETGQCDAMVGDLSFISLKLVLPAIVDMA | 173 |
| C.diphtheriaeVA01 | ---MQPKRRRLDAELVRRKIARSREQAVEMIKGGRVTVGGFKASKPATVVEPEVSIKVEA | 56 | C.diphtheriaeVA01 | VGYGQLIWRLLQDDRVKVMDRTNIRNLTELETGQCDAMVGDLSFISLKLVLPAIVDMA | 173 |
| | ***** ** * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * | | | ***** ** * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * | |
| C.amycolatumFDAARGOS_991 | LEEDENWASRGAHKLLGALFAEFQGLDLKGRKVLDAAGSTGGFTDVCLRRDVTNYYAVD | 119 | C.amycolatumFDAARGOS_991 | DGADLLPMVKPQFEVKGKRLGSGGVRSDALRQEVQVEAEYARTLGSFRAAVASPLPG | 239 |
| C.amycolatumFDAARGOS_938 | LEEDENWASRGAHKLLGALFAEFQGLDLKGRKVLDAAGSTGGFTDVCLRRDVTNYYAVD | 119 | C.amycolatumFDAARGOS_938 | DGADLLPMVKPQFEVKGKRLGSGGVRSDALRQEVQVEAEYARTLGSFRAAVASPLPG | 239 |
| C.amycolatumFDARGOS_1107.1 | LEEDENWASRGAHKLLGALFAEFQGLDLKGRKVLDAAGSTGGFTDVCLRRDVTNYYAVD | 119 | C.amycolatumFDARGOS_1107.1 | DGADLLPMVKPQFEVKGKRLGSGGVRSDALRQEVQVEAEYARTLGSFRAAVASPLPG | 239 |
| C.amycolatumFDARGOS_1108 | LEEDENWASRGAHKLLGALFAEFQGLDLKGRKVLDAAGSTGGFTDVCLRRDVTNYYAVD | 119 | C.amycolatumFDARGOS_1108 | DGADLLPMVKPQFEVKGKRLGSGGVRSDALRQEVQVEAEYARTLGSFRAAVASPLPG | 239 |
| C.striatum215 | DA-ADDWASRGAHKLLGALFAFD---VDVKDRVLDAGASTGGFTDVCLRRGAREVLSVD | 113 | C.striatum215 | DGAWLLPMVKPQFEVKGKRLGSGGVRSDALRQEVQVEAEYARTLGSFRAAVASPLPG | 239 |
| C.striatumFDAARGOS_1115 | DA-ADDWASRGAHKLLGALFAFD---VDVKDRVLDAGASTGGFTDVCLRRGAREVLSVD | 113 | C.striatumFDAARGOS_1115 | DGAWLLPMVKPQFEVKGKRLGSGGVRSDALRQEVQVEAEYARTLGSFRAAVASPLPG | 239 |
| C.striatumFDAARGOS_1197.1 | DA-ADDWASRGAHKLLGALFAFD---VDVKDRVLDAGASTGGFTDVCLRRGAREVLSVD | 113 | C.striatumFDAARGOS_1197.1 | DGAWLLPMVKPQFEVKGKRLGSGGVRSDALRQEVQVEAEYARTLGSFRAAVASPLPG | 239 |
| C.urealyticumFDAARGOS_996 | SE-EDHWASRGAHKLLGALFAEFQGLSLEGRKVLDAAGSTGGFTDVALLDRGASEVLAVD | 119 | C.urealyticumFDAARGOS_996 | DGAWLLPMVKPQFEVKGKRLGSGGVRSDALRQEVQVEAEYARTLGSFRAAVASPLPG | 239 |
| C.ulceransFRC58 | SA-IDDWASRGAHKLLGALFAEFQPKGLVVEGKKALDAGASTGGFTDVLLRRKASQVAVD | 115 | C.ulceransFRC58 | DGADLLPMVKPQFEVKGKRLGSGGVRSDALRQEVQVEAEYARTLGSFRAAVASPLPG | 239 |
| C.ulcerans210931 | SA-IDDWASRGAHKLLGALFAEFQPKGLVVEGKKALDAGASTGGFTDVLLRRKASQVAVD | 115 | C.ulcerans210931 | DGADLLPMVKPQFEVKGKRLGSGGVRSDALRQEVQVEAEYARTLGSFRAAVASPLPG | 239 |
| C.ulceransBRAD22 | SA-IDDWASRGAHKLLGALFAEFQPKGLVVEGKKALDAGASTGGFTDVLLRRKASQVAVD | 115 | C.ulceransBRAD22 | DGADLLPMVKPQFEVKGKRLGSGGVRSDALRQEVQVEAEYARTLGSFRAAVASPLPG | 239 |
| C.ulcerans0102 | SA-IDDWASRGAHKLLGALFAEFQPKGLVVEGKKALDAGASTGGFTDVLLRRKASQVAVD | 115 | C.ulcerans0102 | DGADLLPMVKPQFEVKGKRLGSGGVRSDALRQEVQVEAEYARTLGSFRAAVASPLPG | 239 |
| C.ulcerans809 | SA-IDDWASRGAHKLLGALFAEFQPKGLVVEGKKALDAGASTGGFTDVLLRRKASQVAVD | 115 | C.ulcerans809 | DGADLLPMVKPQFEVKGKRLGSGGVRSDALRQEVQVEAEYARTLGSFRAAVASPLPG | 239 |
| C.rouxii | AG-LDDWASRGAHKLLGALFEFKSKGLNIVSGRRALDAGASTGGFTDVLLRESASEVAVD | 115 | C.rouxii | DGADLLPMVKPQFEVKGKRLGSGGVRSDALRQEVQVEAEYARTLGSFRAAVASPLPG | 239 |
| C.diphtheriaeausannenseCMCNS703 | AG-LDDWASRGAHKLLGALFEFKSKGLNIVSGRRALDAGASTGGFTDVLLRESASEVAVD | 115 | C.diphtheriaeausannenseCMCNS703 | DGADLLPMVKPQFEVKGKRLGSGGVRSDALRQEVQVEAEYARTLGSFRAAVASPLPG | 239 |
| C.diphtheriaeausannenseCHUV2995 | AG-LDDWASRGAHKLLGALFEFKSKGLNIVSGRRALDAGASTGGFTDVLLRESASEVAVD | 115 | C.diphtheriaeausannenseCHUV2995 | DGADLLPMVKPQFEVKGKRLGSGGVRSDALRQEVQVEAEYARTLGSFRAAVASPLPG | 239 |
| C.diphtheriaeHC02 | AG-LDDWASRGAHKLLGALFEFKSKGLNIVSGRRALDAGASTGGFTDVLLRESASEVAVD | 115 | C.diphtheriaeHC02 | DGADLLPMVKPQFEVKGKRLGSGGVRSDALRQEVQVEAEYARTLGSFRAAVASPLPG | 239 |
| C.diphtheriaeINCA402 | AG-LDDWASRGAHKLLGALFEFKSKGLNIVSGRRALDAGASTGGFTDVLLRESASEVAVD | 115 | C.diphtheriaeINCA402 | DGADLLPMVKPQFEVKGKRLGSGGVRSDALRQEVQVEAEYARTLGSFRAAVASPLPG | 239 |
| C.diphtheriae31A | AG-LDDWASRGAHKLLGALFEFKSKGLNIVSGRRALDAGASTGGFTDVLLRESASEVAVD | 115 | C.diphtheriae31A | DGADLLPMVKPQFEVKGKRLGSGGVRSDALRQEVQVEAEYARTLGSFRAAVASPLPG | 239 |
| C.diphtheriaeC7(beta) | AG-LDDWASRGAHKLLGALFEFKSKGLNIVSGRRALDAGASTGGFTDVLLRESASEVAVD | 115 | C.diphtheriaeC7(beta) | DGADLLPMVKPQFEVKGKRLGSGGVRSDALRQEVQVEAEYARTLGSFRAAVASPLPG | 239 |
| C.diphtheriaeCDC8392 | AG-LDDWASRGAHKLLGALFEFKSKGLNIVSGRRALDAGASTGGFTDVLLRESASEVAVD | 115 | C.diphtheriaeCDC8392 | DGADLLPMVKPQFEVKGKRLGSGGVRSDALRQEVQVEAEYARTLGSFRAAVASPLPG | 239 |
| C.diphtheriaeBH8 | AG-SDDWASRGAHKLLGALFEFKSKGLNIVSGRRALDAGASTGGFTDVLLRESASEVAVD | 115 | C.diphtheriaeBH8 | DGADLLPMVKPQFEVKGKRLGSGGVRSDALRQEVQVEAEYARTLGSFRAAVASPLPG | 239 |
| C.diphtheriarPW8 | AG-LDDWASRGAHKLLGALFEFKSKGLNIVSGRRALDAGASTGGFTDVLLRESASEVAVD | 115 | C.diphtheriarPW8 | DGADLLPMVKPQFEVKGKRLGSGGVRSDALRQEVQVEAEYARTLGSFRAAVASPLPG | 239 |
| C.diphtheriaeNCT13129CAE49703.1 | AG-LDDWASRGAHKLLGALFEFKSKGLNIVSGRRALDAGASTGGFTDVLLRESASEVAVD | 115 | C.diphtheriaeNCT13129CAE49703.1 | DGADLLPMVKPQFEVKGKRLGSGGVRSDALRQEVQVEAEYARTLGSFRAAVASPLPG | 239 |
| C.diphtheriaeHC01 | AG-LDDWASRGAHKLLGALFEFKSKGLNIVSGRRALDAGASTGGFTDVLLRESASEVAVD | 115 | C.diphtheriaeHC01 | DGADLLPMVKPQFEVKGKRLGSGGVRSDALRQEVQVEAEYARTLGSFRAAVASPLPG | 239 |
| C.diphtheriaeHC03 | AG-LDDWASRGAHKLLGALFEFKSKGLNIVSGRRALDAGASTGGFTDVLLRESASEVAVD | 115 | C.diphtheriaeHC03 | DGADLLPMVKPQFEVKGKRLGSGGVRSDALRQEVQVEAEYARTLGSFRAAVASPLPG | 239 |
| C.diphtheriaeHC04 | AG-LDDWASRGAHKLLGALFEFKSKGLNIVSGRRALDAGASTGGFTDVLLRESASEVAVD | 115 | C.diphtheriaeHC04 | DGADLLPMVKPQFEVKGKRLGSGGVRSDALRQEVQVEAEYARTLGSFRAAVASPLPG | 239 |
| C.diphtheriae241 | AG-LDDWASRGAHKLLGALFEFKSKGLNIVSGRRALDAGASTGGFTDVLLRESASEVAVD | 115 | C.diphtheriae241 | DGADLLPMVKPQFEVKGKRLGSGGVRSDALRQEVQVEAEYARTLGSFRAAVASPLPG | 239 |
| C.diphtheriaeVA01 | AG-LDDWASRGAHKLLGALFEFKSKGLNIVSGRRALDAGASTGGFTDVLLRESASEVAVD | 115 | C.diphtheriaeVA01 | DGADLLPMVKPQFEVKGKRLGSGGVRSDALRQEVQVEAEYARTLGSFRAAVASPLPG | 239 |
| | :***** * : : : : ***** : : : : * : * | | | :***** * : : : : ***** : : : : * : * | |

Figura 17 - Alinhamento das seqüências de aminoácidos da proteína TlyA das diferentes espécies de corinebactérias (continuação).

```

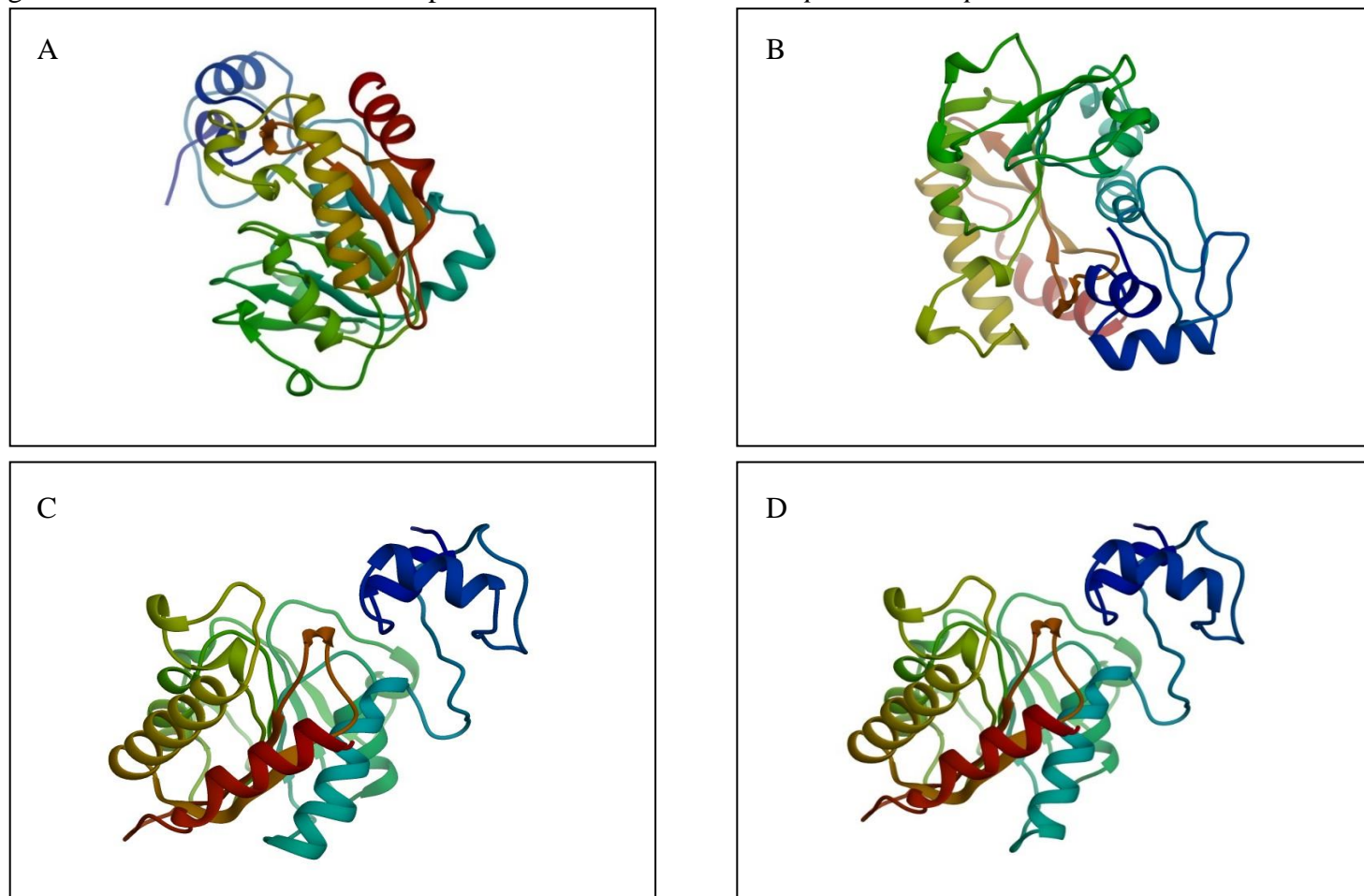
C.amycolatumFDAARGOS_991      PSGNVEFFLWLVKDGGASDIGDEAMAAAIKAVEEGPHND 279
C.amycolatumFDAARGOS_938      PSGNVEFFLWLVKDGGASDIGDEAMAAAIKAVEEGPHND 279
C.amycolatumFDARGOS_1107.1    PSGNVEFFLWLVKDGGASDIGDEAMAAAIKAVEEGPHND 279
C.amycolatumFDARGOS_1108      PSGNVEFFLWLVKDGGASDIGDEAMAAAIKAVEEGPHND 279
C.striatum215                  PSGNVEYFLWLVKDGRVTS--EEDIEDMVRVAIEEGPQ-- 269
C.striatumFDAARGOS_1115       PSGNVEYFLWLVKDGGQVTS--EEDIEDMVRVAIEEGPQ-- 269
C.striatumFDAARGOS_1197.1     ----- 225
C.urealyticumFDAARGOS_996     PSGNVEYFLWLKSDGGKQAPTMDTLEAMVSTAVKEGPQ-- 277
C.ulceransFRC58                PSGNVEFFLWLKRDGGKAAADPDLRAMVHKAVMEGPQ-- 273
C.ulcerans210931              PSGNVEFFLWLKRDGGKAAADPDLRAMVHKAVMEGPQ-- 273
C.ulceransBRAD22              PSGNVEFFLWLKRDGGKAAADPDLRAMVHKAVMEGPQ-- 273
C.ulcerans0102                PSGNVEFFLWLKRDGGKAAADPDLRAMVHKAVMEGPQ-- 273
C.ulcerans809                 PSGNVEFFLWLKRDGGKAAADPDLRAMVHKAVMEGPQ-- 273
C.rouxii                      PSGNVEYFLWLKSDAGRSARSLQEIKEKVAEAVQKGPQ-- 273
C.diphtheriaeausannenseCMCN5703 PSGNVEYFLWLKSDSGRSKAGVQEIHEKVAEAVQKGPQ-- 273
C.diphtheriaeausannenseCHUV2995 PSGNVEYFLWLKSDSGRSKAGVQEIHEKVAEAVQKGPQ-- 273
C.diphtheriaeHC02             PSGNVEYFLWLKSDSGRSKAGLQEIHEKVAEAVQKGPQ-- 273
C.diphtheriaeINCA402         PSGNVEYFLWLKSDSGRSKAGLQEIHEKVAEAVQKGPQ-- 273
C.diphtheriae31A              PSGNVEYFLWLKSDSGRSKAGLQEIHEKVAEAVQKGPQ-- 273
C.diphtheriaeC7(beta)        PSGNVEYFLWLKSDSGRSKAGLQEIHEKVAEAVQKGPQ-- 273
C.diphtheriaeCDCE8392        PSGNVEYFLWLKSDSGRSKAGLQEIHEKVAEAVQKGPQ-- 273
C.diphtheriaeBH8              PSGNVEYFLWLKSDSGRSKAGLQEIHEKVAEAVQKGPQ-- 273
C.diphtheriarPW8             PSGNVEYFLWLKSDSGRSKAGLQEIHEKVAEAVQKGPQ-- 273
C.diphtheriaeNCTC13129CAE49703.1 PSGNVEYFLWLKSDSGRSKAGLHEIKEKVAEAVQKGPQ-- 273
C.diphtheriaeHC01            PSGNVEYFLWLKSDSGRSKAGLHEIKEKVAEAVQKGPQ-- 273
C.diphtheriaeHC03            PSGNVEYFLWLKSDSGRSKAGLHEIKEKVAEAVQKGPQ-- 273
C.diphtheriaeHC04            PSGNVEYFLWLKSDSGRSKAGLHEIKEKVAEAVQKGPQ-- 273
C.diphtheriae241             PSGNVEYFLWLKSDSGRSKAGLHEIKEKVAEAVQKGPQ-- 273
C.diphtheriaeVA01            PSGNVEYFLWLKSDSGRSKAGLHEIKEKVAEAVQKGPQ-- 273

```

Legenda: As seqüências de aminoácidos dos homólogos de TlyA de corinebactérias foram alinhados por Clustal Omega. Na linha inferior do alinhamento: um asterisco indica que os aminoácidos são 100% conservados em todas as seqüências analisadas; um ponto (.) indica alteração em um resíduo de aminoácidos; e dois pontos indicam alterações em dois resíduos de aminoácidos. A ausência de símbolos na linha inferior em cada série indica a presença de pelo menos três aminoácidos diferentes entre as seqüências analisadas. Disponível no site: <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>. Acesso em 01/05/2022.

Fonte: A autora.

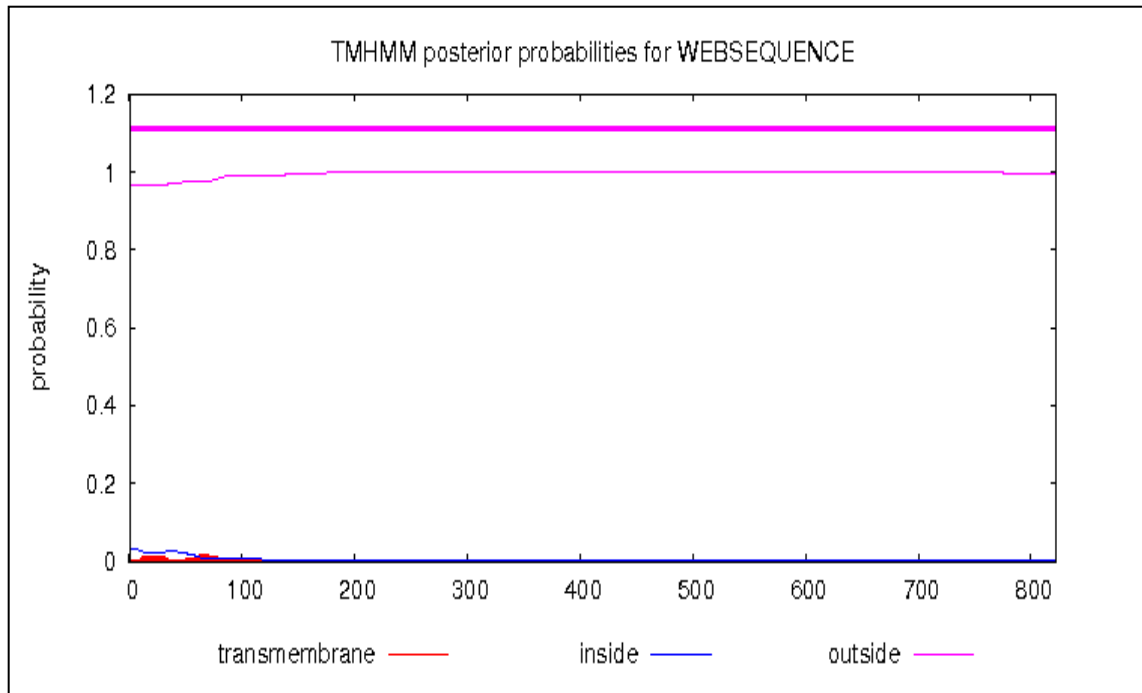
Figura 18 - Modelos tridimensionais para a hemolisina em *S. thermophilus* e *C. diphtheriae*



Legenda: Modelos tridimensionais: A) Estrutura 3D para a proteína TlyA de *C. diphtheriae* biovar *gravis* cepa NCTC 13129; B) Estrutura 3D para a hemolisina de *S. thermophilus*; C) e D) Estruturas 3D para a hemolisina/citotoxina hipotética encontrada das cepas de *C. diphtheriae* INCA 814 e HC01, respectivamente. Dados fornecidos pelo servidor *Phyre*².

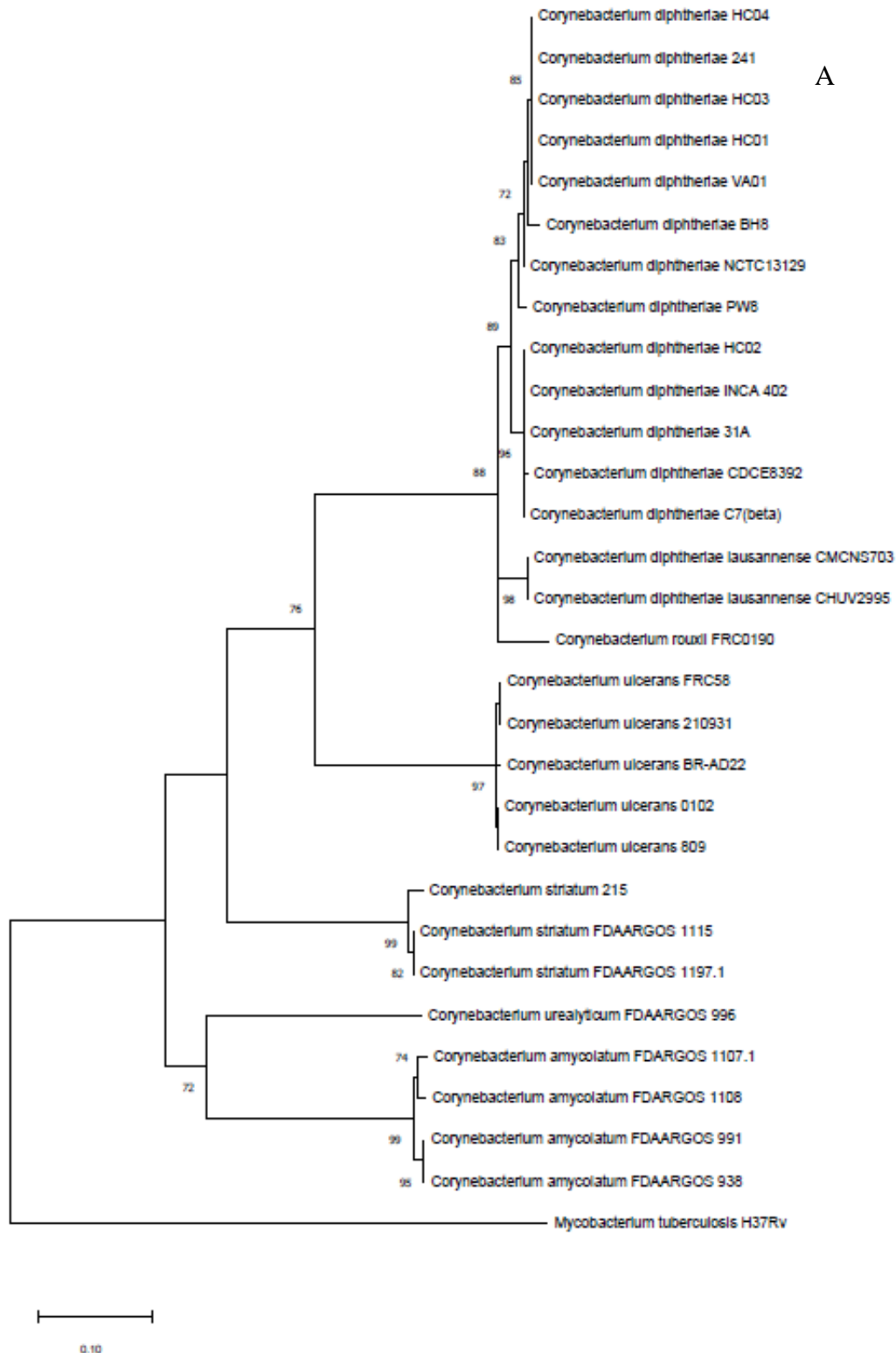
Fonte: A autora

Figura 19 - Ausência de hélices transmembranares para a TlyA de *Corynebacterium diphtheriae*



Fonte: Aplicativo *online* TMHMM versão 2.0. Disponível no site:
<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>, acesso em 01 de maio de 2022.

Figura 20 - Árvore filogenética da família de proteínas TlyA de corinebactérias



Legenda: Árvore filogenética baseada nas sequências de aminoácidos do gene *tlyA*, utilizando o método de máxima verossimilhança e matriz de distância Jones-Taylor-Thirnton. Valores de *bootstrap* com 1000 réplicas. Barra de escala indica 0.10 % de divergência. Para a construção desta árvore foram utilizadas as sequências de aminoácidos do gene *tlyA* de quinze cepas de *C. diphtheriae*, cinco cepas de *C. ulcerans*, três cepas de *C. striatum*, quatro cepas de *C. amycolatum*, uma cepa de *C. urealyticum*, uma cepa de *C. rouxii* e com *M. tuberculosis* H37Rv (grupo externo). O clado A agrupa todas as cepas de *C. diphtheriae* analisadas indicando uma possível ancestralidade comum em relação a proteína TlyA.

Tabela 9 – Identificação de outros genes relacionados a hemolisina em *Corynebacterium diphtheriae*

| Cepas | <i>tlyC</i> | Localização | aa | % ID | <i>yqfA</i> | Localização | aa | % ID | <i>HlyD</i> | Localização | aa | % ID |
|------------------------|-------------|-----------------|-----|-------|-------------|------------------|-----|-------|-------------|------------------|-----|-------|
| NCTC 13129 | + | DIP1211* | 464 | 100 | + | DIP_RS20815 | 262 | 100 | + | DIP_RS13750 | 545 | 100% |
| BQ11 | + | B11Q_01277 | 464 | NI | + | B11Q_01982 | 261 | 98,47 | | NI | NI | NI |
| TH 1526 | + | NI | NI | NI | + | NI | NI | NI | + | E4651_RS01465 | 545 | 99,27 |
| NCTC 3529 | + | NCTC3529_00450 | 464 | 99,78 | + | UUY_RS0109130 | 262 | 99,24 | + | NI | NI | NI |
| NCTC 11397 | + | ERS451417_01210 | 464 | 99,78 | + | ERS451417_01942 | 261 | 98,47 | + | NI | NI | NI |
| NCTC 7838 | + | NCTC7838_00996 | 464 | 99,78 | + | NI | NI | NI | + | EL333_RS01435 | 545 | 99,27 |
| HC01 | + | CDHC01_1139* | 464 | 99,78 | + | CDHC01_RS09225 | 261 | 98,08 | + | CDHC01_RS02075 | 545 | 99,08 |
| HC02 | + | CDHC02_1119* | 464 | 99,78 | + | CDHC02_RS09310 | 261 | 98,85 | + | CDHC02_RS02175 | 545 | 99,27 |
| HC03 | + | CDHC03_1113* | 464 | 100 | + | CDHC03_RS09085 | 261 | 98,47 | + | CDHC03_RS02055 | 545 | 99,08 |
| HC04 | + | CDHC04_1124* | 464 | 100 | + | CDHC04_RS09190 | 262 | 98,09 | + | CDHC04_RS01980 | 545 | 99,27 |
| INCA 402 | + | CDB402_1120* | 464 | 99,78 | + | CDB402_RS09175 | 262 | 98,47 | + | CDB402_RS02065 | 545 | 99,08 |
| 241 | + | CD241_1141* | 464 | 99,78 | + | CD241_RS09200 | 261 | 98,08 | + | CD241_0423 | 459 | 99,07 |
| VA01 | + | CDVA01_1081* | 464 | 100 | + | CDVA01_1768 | 202 | 99,50 | + | CDVA01_RS01900 | 545 | 99,45 |
| CDCE 8392 | + | CDCE8392_1111* | 464 | 100 | + | CDCE8392_RS09175 | 262 | 99,24 | + | CDCE8392_RS02210 | 545 | 99,08 |
| PW8 | + | CDPW8_1189* | 464 | 99,57 | + | CDPW8_RS09560 | 262 | 99,62 | + | CDPW8_RS02435 | 532 | 99,87 |
| 31 A | + | CD31A_1222* | 464 | 100 | + | CD31A_RS09555 | 262 | 100 | + | CD31A_RS02410 | 545 | 98,90 |
| 402 (BH8) | + | CDBH8_1192* | 464 | 100 | + | CDBH8_RS09515 | 261 | 98,47 | + | CDBH8_RS02130 | 545 | 98,90 |
| ATCC 27010 (C7 (beta)) | + | CDC7B_1207* | 464 | 99,78 | + | CDC7B_RS09610 | 261 | 98,47 | + | CDC7B_RS02175 | 532 | 98,87 |
| Lausannese CMCNS703+ | + | E4653_11460* | 464 | 99,78 | + | BUE64_05815 | 262 | 97,71 | + | BUE64_07250 | 545 | 93,76 |
| Lausannese CHUV2995+ | + | CHUV2995_01510* | 464 | 99,78 | + | CHUV2995_02494 | 262 | 98,09 | + | CHUV2995_00558 | 545 | 93,76 |

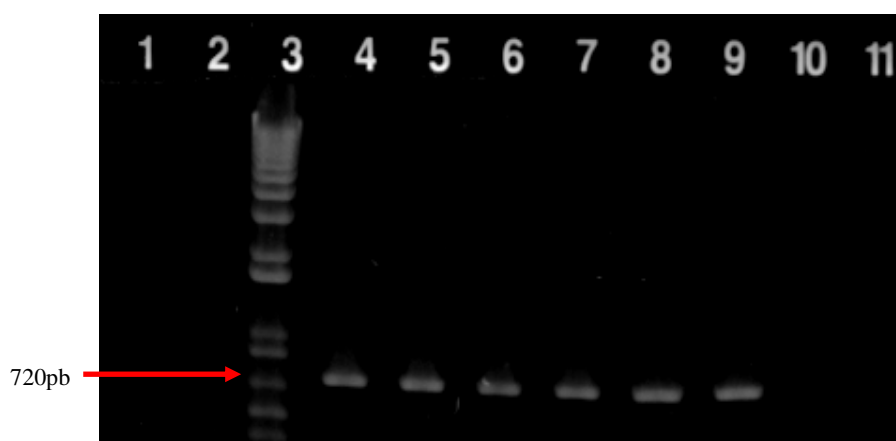
Legenda: N.I. – não informado. * cepas sequenciadas (NCBI 2022). Dados extraídos do aplicativo *online* BLASTp. Disponível no site: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, acesso em 30 de maio de 2022.

Fonte: A autora

4.2.3 Detecção do gene *tlyA* por PCR

Os ensaios de PCR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores para o gene *tlyA* foram desenvolvidos durante o presente estudo. As reações de amplificação da PCR indicaram que todas as cepas de *C. diphtheriae*, com sequenciamento no NCBI utilizadas nesse estudo, independente da presença ou ausência de TD, representada pelo gene *tox*, apresentaram bandas com tamanhos entre 700 pb a 800 pb. Entre as cepas TD-negativas que ainda não tiveram seus genomas sequenciados, foi observada amplificação para *C. diphtheriae* HC06, enquanto para a cepa MA 136 não ocorreu amplificação. Os produtos amplificados por PCR podem ser visualizados nas Figuras 21 e 22.

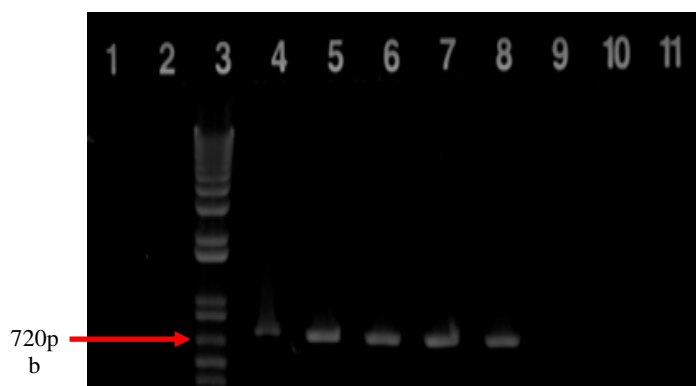
Figura 21 - Eletroforese em gel de agarose 1,2 % com o produto da amplificação do gene *tlyA* de cepas de *C. diphtheriae* não produtoras de toxina diftérica



Legenda: Gel de agarose 1,2%: 1) vazio; 2) vazio; 3) Peso molecular; 4) HC01 (+); 5) HC04 (+); 6) HC06 (+); 7) INCA 814 (+); 8) 402 (+); 9) 27010 (+); 10) MA 136 (-); 11) Controle (-).

Fonte: A autora

Figura 22 - Eletroforese em gel de agarose 1,2 % com o produto da amplificação do gene *tlyA* de cepas de *C. diphtheriae* produtoras de toxina diftérica



Legenda: Gel de agarose 1,2 %: 1)Vazio; 2) vazio; 3) Peso molecular; 4) 27012 (+); 5) NCTC (+); 6) CDC (+); 7) 241 (+); 8) VA01 (+); 9) *C. ulcerans* 809 (-); 10) *C. ulcerans* FRC11 (-); 11) Controle (-).

Fonte: A autora

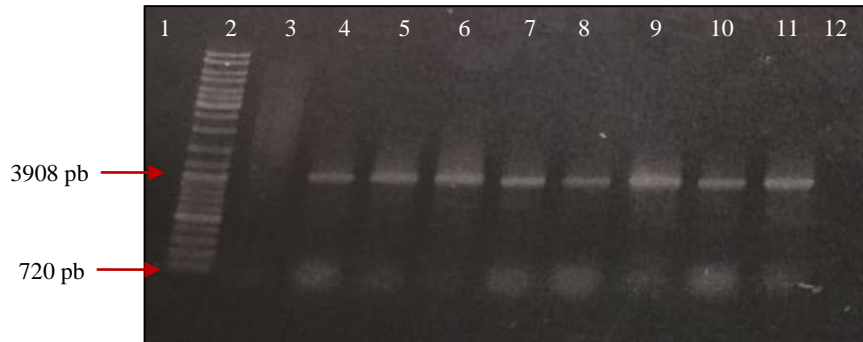
4.2.4 Interrupção do gene *tlyA* na cepa mutante LDCIC-A1

A presença do inserto nos clones selecionados de *E. coli* foi confirmada através de reações de PCR e digestão enzimática com a endonuclease de restrição *EcoRI* (Invitrogen®, Reino Unido), de acordo com a Figura 23.

As cepas recombinantes foram submetidas à técnica de PCR multiplex para a confirmação da espécie e presença do gene *tox* (Figura 23), uma vez que a cepa selvagem é produtora de toxina diftérica.

A cepa mutante LDCIC-A1 também teve suas características fenotípicas confirmadas através da utilização da coloração de Gram e do sistema semiautomático miniaturizado *API® Coryne*, apresentando as mesmas características observadas para a cepa selvagem NCTC 13129, conforme visualizado nas Figuras 23 e 24, respectivamente.

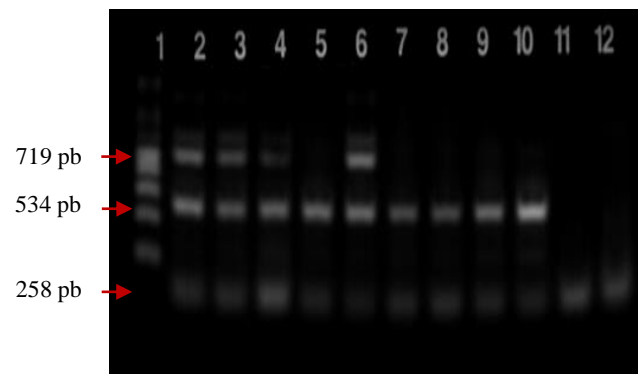
Figura 23 - Eletroforese em gel de agarose 1,2% com o produto da PCR



Legenda: Coluna 2 - PM (peso molecular); Coluna 3 – Controle negativo; Colunas 4 a 11 – produtos da PCR do vetor TOPO:: DIP_RS17105 dos oito clones selecionados. Fragmento de 720pb referentes a Rbp e fragmento de 3908 pb referentes ao plasmídeo inserido.

Fonte: A autora.

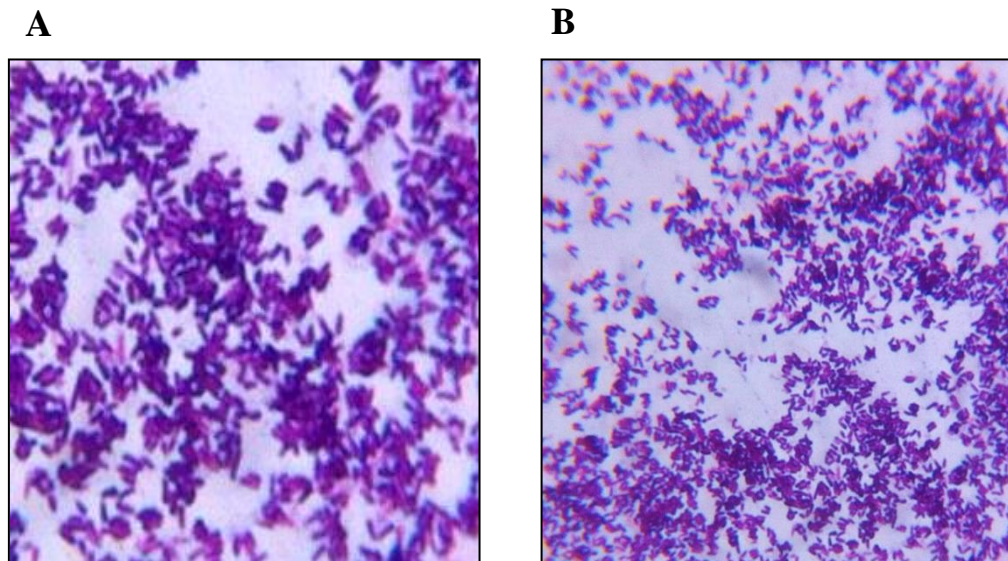
Figura 24 - Avaliação da presença dos genes *tox* e *dtxR* na cepa mutante LDCIC-A1



Legenda: A) PCR *multiplex* para confirmação dos fragmentos de TD (fração A - 719pb e fração B - 534pb) e fragmento dTXR (258pb). Cepas: 1) PM; 2) LDCIC-A1; 3) LDCIC-A1; 4) LDCIC-A1; 5) HC01; 6) NCTC 13129; 7) HC02; 8) HC03; 9) HC04; 10) HC06; 11) Controle; 12) Controle. Conforme descrito por Pimenta e colaboradores (2008).

Fonte: A autora.

Figura 25 - Análise morfo-tintorial de cepas de *C. diphtheriae*



Legenda: Coloração de Gram para cepa de *C. diphtheriae* NCTC 13129 (A) e para cepa mutante LDCIC-A1(B) em aumento de 100X - imersão.

Fonte: A autora.

Figura 26 – Caracterização fenotípica pelo sistema API®Coryne das cepas de *C. diphtheriae* NCTC 13129 e LDCIC-A1



Legenda: Sistema API®Coryne realizado para a cepa selvagem NCTC 13129 (A) e LDCIC-A1 (B). Código numérico referente ao perfil bioquímico a ser utilizado para identificação pelo programa APIweb (BIOMERIEUX). Perfil 1010326 corresponde a identificação excelente para *C. diphtheriae* biovar *gravis*.

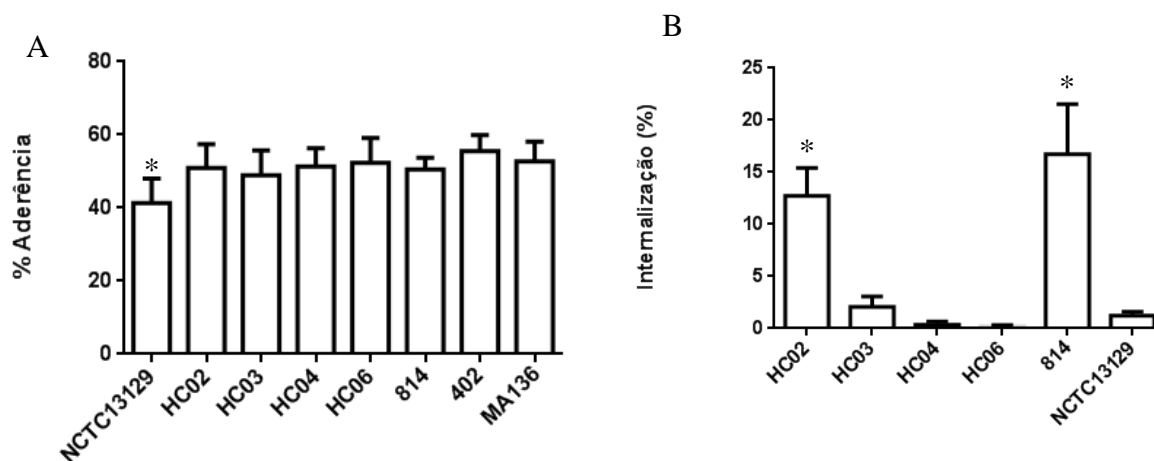
Fonte: A autora.

4.2.5 Ensaio de interação bacteriana com células epiteliais HEp-2

Todas as oito cepas de *C. diphtheriae* analisadas foram capazes de aderir às células epiteliais HEp-2 após 3 horas de incubação, a 37 °C, com percentuais de interação elevados (> 40 %) (Figura 27A). As cepas HC02 e INCA 814, não produtoras de TD, apresentaram os percentuais de viabilidade intracelular mais elevados (Figura 27B) quando comparados às cepas produtoras de TD. Embora as cepas HC03, HC04 e HC06 tenham sido isoladas a partir de infecções invasivas, estas apresentaram baixos percentuais de viabilidade intracelular.

A cepa mutante LDCIC-A1 não apresentou crescimento no meio de cultura utilizado nos ensaios de interação com célula HEp-2, independente da presença das células epiteliais.

Figura 27 - Percentuais de aderência e internalização a células HEp-2 de *Corynebacterium diphtheriae*



Legenda: Cepas de *C. diphtheriae* não produtoras (HC02, HC03, HC04, HC06, INCA 814, 402 e MA 136) e cepa produtora (NCTC 13129) de TD foram comparadas quanto à capacidade de aderência (A) e internalização (B) em células HEp-2 após 3 horas de incubação. As diferenças estatísticas foram determinadas pelo teste ANOVA, seguido do teste de comparação múltipla de Tukey. *Os dados apresentados são valores médios \pm SD de 3 experimentos independentes, onde $p \leq 0,05$ quando NCTC 13129 foi comparada a cada uma das demais cepas (A) e quando 814 e HC02 foram comparadas com as demais cepas analisadas (B).

Fonte: A autora

4.2.6 Atividade hemolítica em cepas de diferentes biovars de *Corynebacterium diphtheriae*

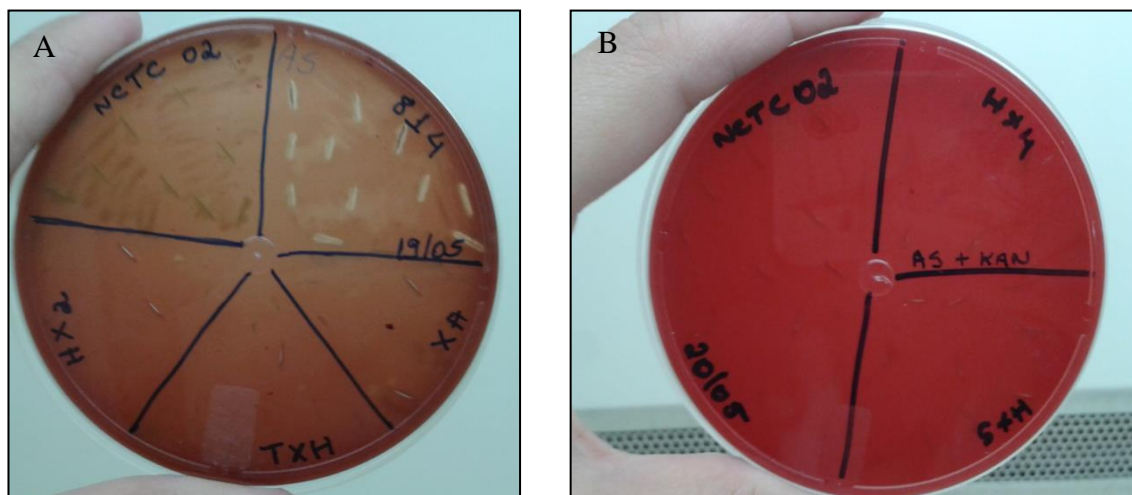
Os resultados apresentados na Tabela 9 demonstraram que as onze cepas *C. diphtheriae* cultivadas em placas de meio ágar sangue de carneiro a 5 %, nos quais foram realizados pequenos cortes para facilitar a visualização da hemólise, apresentaram capacidade de produzir hemólise, exceto a cepa TD-negativa *C. diphtheriae* biovar *intermedius* MA 136 (Tabela 10). Amostras isoladas de casos de difteria e de endocardite produziram hemólise, independente da capacidade de produção da toxina diftérica e de fermentação de sacarose. A amostra *C. diphtheriae* biovar *belfantii* cepa 402 apresentou atividade hemolítica.

A cepa selvagem NCTC 13129 apresentou atividade hemolítica, enquanto a cepa mutante LDCIC-A1, resultante da recombinação homóloga para o gene *tlyA*, não foi capaz de produzir hemólise, sugerindo que esta atividade seja dependente da expressão deste gene (Figura 28 e 29).

Tabela 10 - Origem e caracterização de cepas de *Corynebacterium diphtheriae* quanto ao potencial de produção de TD e atividade hemolítica (AH)

| Cepa /País | Biovar | Quadro Clínico | <i>tox</i> | AH |
|----------------------------|--------------------|---------------------|------------|-----|
| NCTC 13129/UK | <i>gravis</i> | Difteria | + | Sim |
| TR241/BR | <i>mitis</i> | Difteria | + | Sim |
| CDC E-8392/EUA | <i>mitis</i> | Difteria | + | Sim |
| ATCC 27012 | <i>mitis</i> | Difteria | + | Sim |
| ATCC 27010 | <i>mitis</i> | Difteria | - | Sim |
| HC01/BR | <i>mitis</i> | Endocardite | - | Sim |
| HC04/BR | <i>gravis</i> | Endocardite | - | Sim |
| INCA 814/BR | <i>mitis</i> | Pneumonia/Neoplasia | - | Sim |
| HC06/BR | <i>gravis</i> | Endocardite | - | Sim |
| <i>C. belfantii</i> 402/BR | NA | Pneumonia/Neoplasia | - | Sim |
| MA 136 | <i>intermedius</i> | Difteria | - | Não |
| LDCIC-A1 | <i>gravis</i> | Cepa mutante | + | Não |

Figura 28 - Comparação da capacidade hemolítica entre as cepas *C. diphtheriae* NCTC 13129 e a cepa mutante LDCIC-A1



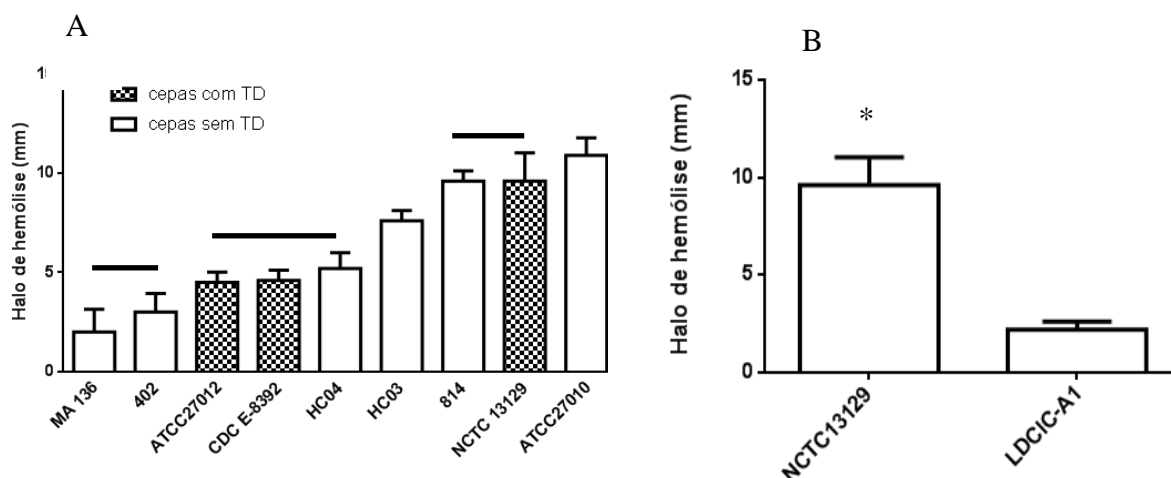
Legenda: Atividade hemolítica de cepas de *C. diphtheriae* em ágar sangue. A) a cepa selvagem NCTC 13129/UK apresentou hemólise do tipo alfa, enquanto três cultivos da cepa mutante LDCIC-A1 (HX, HX1 e HX2) não apresentaram atividade hemolítica e a cepa INCA 814, não produtora de TD, apresentou hemólise do tipo beta. B) quando semeadas em placa com canamicina (25 µg/mL) apenas a cepa mutante cresceu e não foi capaz de hemolisar o meio.

Fonte: A autora.

Conforme apresentado no Figura 29A, as cepas de *C. diphtheriae* não produtoras de TD (ATCC 27010, INCA 814, HC03, HC04, INCA 402) apresentaram atividade hemolítica mais intensa do que a hemólise observada em algumas cepas produtoras de TD (ATCC 27012, CDC E-8392, NCTC 13129).

A cepa mutante LDCIC-A1 apresentou atividade hemolítica significativamente reduzida quando comparada a cepa selvagem, apesar de continuar expressando atividade hemolítica (Figura 29B). Interessantemente, a cepa TD-negativa ATCC 27010 produziu uma atividade hemolítica muito superior a cepa homóloga TD-positiva ATCC 27012.

Figura 29 - Quantificação da atividade hemolítica por *Corynebacterium diphtheriae*



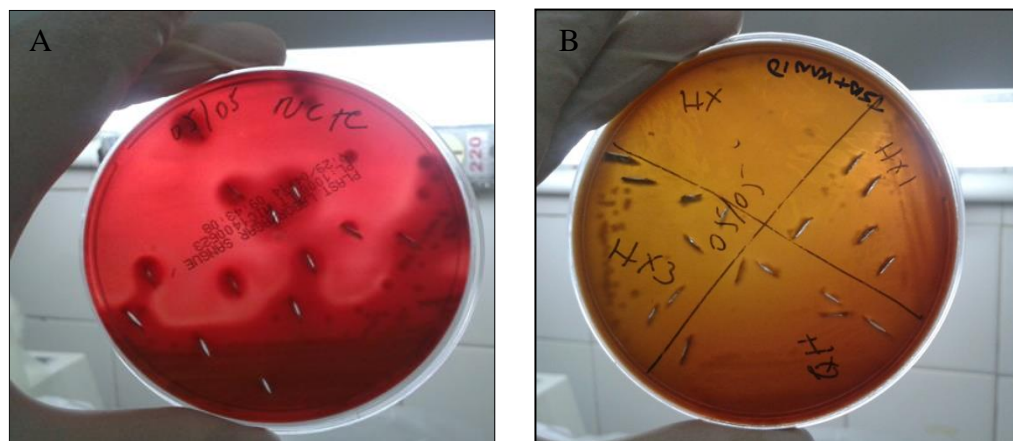
Legenda: Tamanhos dos halos de hemólise gerados pelos *spots* de cepas de *C. diphtheriae* em ágar acrescido de 5% de sangue de carneiro. A) Comparação entre as zonas de hemólise de cepas produtoras e não produtoras de TD. Cepas não produtoras de TD foram capazes de produzir hemólise. As diferenças estatísticas foram determinadas pelo teste ANOVA, seguido do teste de comparação múltipla de *Tukey*. As cepas representadas com um traço não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si: MA136 e INCA 402; ATCC27012, CDCE8392 e HC04; 814 e NCTC 13129, mas consideramos $p \leq 0,05$ quando as cepas foram comparadas individualmente com as demais. B) Comparação das zonas de lise entre cepas mutante LDCIC-A1 e selvagem. A cepa selvagem apresentou atividade hemolítica muito superior quando comparada a cepa mutante. As diferenças estatísticas foram determinadas pelo teste ANOVA, seguido do teste de comparação múltipla de *Tukey*, onde consideramos $p \leq 0,05$ quando NCTC 13129 foi comparada a cepa mutante (LDCIC-A1).

Fonte: A autora.

4.2.7 Influência das condições ambientais na expressão de hemolisina (TlyA)

Para avaliar a influência do ambiente sobre atividade hemolítica das cepas estudadas, os mesmos ensaios foram realizados em microaerofilia. Essa condição favoreceu a expressão da atividade hemolítica em todas as cepas capazes de produzir hemólise em hemácias de carneiro, conforme apresentado na Figura 30, representada pela cepa padrão *C. diphtheriae* NCTC 13129. Contudo, a microaerofilia não induziu a produção de atividade hemolítica nas cepas MA 136 e da mutante LDCIC-A1.

Figura 30 – Atividade hemolítica favorecida em ambiente de microaerofilia de *Corynebacterium diphtheriae*, representada pela cepa NCTC 13129

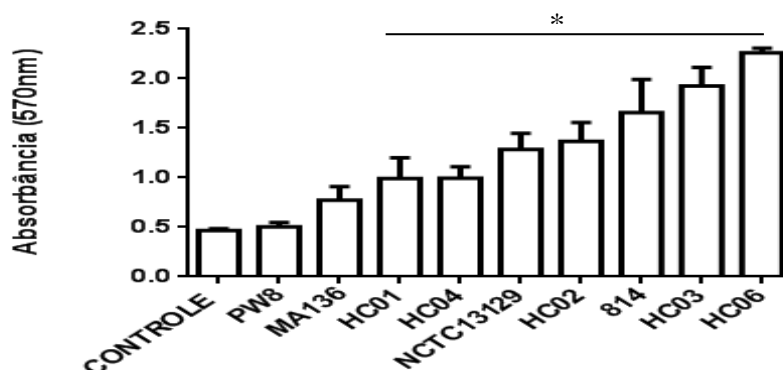


Legenda: A) cepa selvagem NCTC 13129/UK apresentou hemólise mais expressiva quando submetida a crescimento em microaerofilia. B) A cepa mutante não apresentou hemólise quando submetida à condição de microaerofilia.

Fonte: A autora.

As cepas de *C. diphtheriae* que possuem o gene *tlyA* para hemolisina também demonstraram capacidade de formar biofilme em superfícies abióticas. Os dados das cepas de *C. diphtheriae*, produtoras e não produtoras de TD, avaliados quantitativamente quanto à capacidade de formar biofilme em poliestireno foram demonstrados na Figura 31. A maioria das cepas foi capaz de aderir ao substrato em diferentes intensidades, sendo classificadas como: (i) não-aderentes as cepas PW8 e MA 136; (ii) fracamente aderentes as cepas HC01 e HC04, (iii) moderadamente aderentes as cepas NCTC 13129, HC02, HC03 e INCA 814 e (iv) fortemente aderente a cepa HC06. Deste modo, as cepas analisadas produziram biofilme em poliestireno independente do gene *tlyA*.

Figura 31 - Formação de biofilme em poliestireno por cepas de *C. diphtheriae*, produtoras e não produtoras toxina diftérica



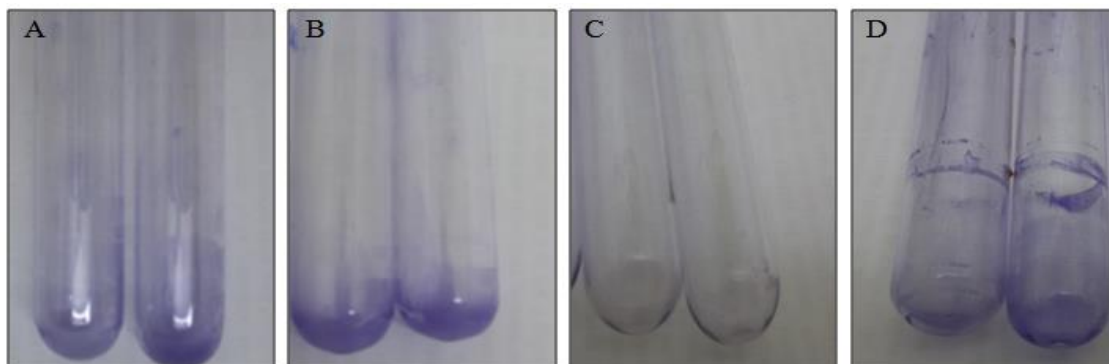
Legenda: Cepas de *C. diphtheriae* não produtoras (HC01, HC02, HC03, HC04, HC06, INCA 814 e MA 136) e cepas produtoras (PW8, NCTC 13129) de TD. *As diferenças estatísticas foram determinadas pelo teste ANOVA, seguido do teste de comparação múltipla de *Tukey*, onde $p \leq 0,05$ quando as cepas HC01, HC04, NCTC 13129, HC02, 814, HC03 e HC06 foram comparadas ao controle negativo. As cepas PW8 e MA 136 não apresentaram diferença estatística significativa entre si e quando comparadas ao controle negativo.

Fonte: A autora.

Com o propósito de avaliar a influência do *gene tlyA* na formação de biofilme, foram realizados ensaios em superfícies abióticas distintas (hidrofílica - vidro e hidrofóbica – poliestireno). O ensaio qualitativo para formação de biofilme em vidro demonstrou que a cepa NCTC 13129, produtora de hemolisina, possui padrão de aderência do tipo II (Figura 32).

O truncamento do *gene tlyA* promoveu a redução no potencial de produção do padrão de aderência no vidro para o tipo III na cepa mutante (LDCIC-A1), corroborando com a hipótese de que a hemolisina influenciou nos mecanismos de formação de biofilme em superfície hidrofílica do vidro em cepas de *C. diphtheriae*.

Figura 32 - Padrão de aderência e formação de biofilme em vidro por cepas de *Corynebacterium diphtheriae*

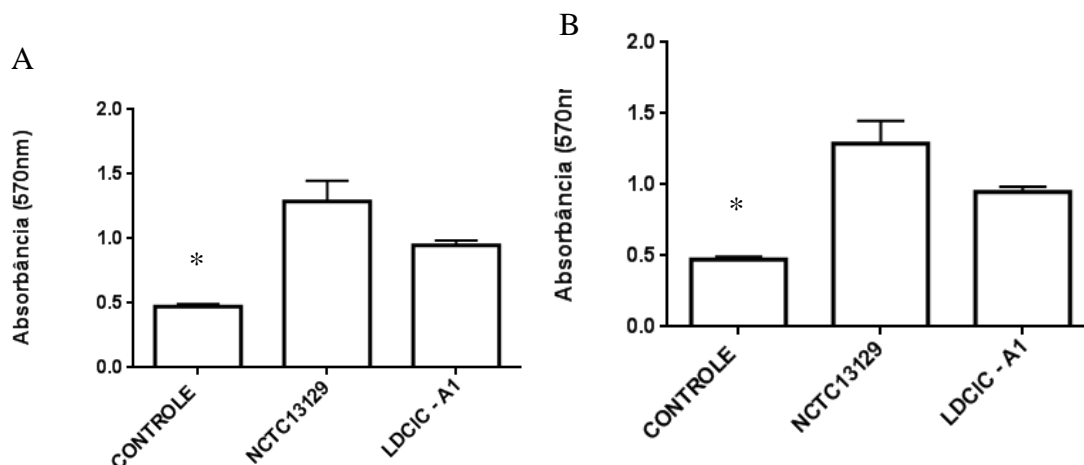


Legenda: Formação de biofilme em vidro. A) cepa NCTC 13129 - padrão de aderência II; B) cepa mutante LDCIC-A1 - padrão de aderência III; C) cepa CDC E-8392 - padrão de aderência IV (controle negativo); D) cepa 241 - padrão de aderência I (controle positivo). Observa-se diminuição no potencial de formação de biofilme na cepa mutante LDCIC-A1 quando comparada à cepa selvagem NCTC 13129. Experimento representativo de 3 ensaios independentes em triplicata. O padrão de aderência em vidro de acordo com MATTOS-GUARALDI e FORMIGA, (1991) e GOMES e colaboradores (2009).

Fonte: A autora.

Na avaliação quantitativa e comparativa de formação de biofilme, em superfície hidrofóbica de poliestireno e hidrofílica de vidro, a cepa selvagem NCTC 13129 e a cepa mutante LDCIC-A1 permaneceram capazes de aderir aos substratos abióticos em intensidades diferentes. O truncamento do gene *tlyA* promoveu uma redução significativa da aderência tanto ao poliestireno quanto ao vidro em relação à cepa selvagem, corroborando com a hipótese de que a expressão do gene *tlyA* favoreça a formação de biofilme, cepa-dependente (Figura 33).

Figura 33 - Análise quantitativa da formação de biofilme por *Corynebacterium diphtheriae* em poliestireno e vidro



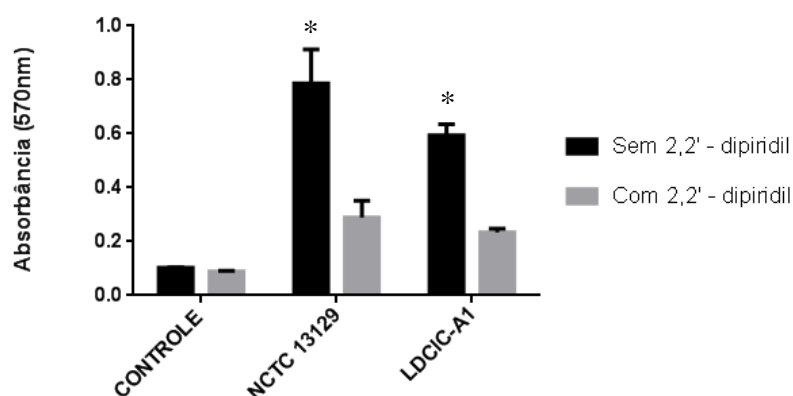
Legenda: A) Formação de biofilme em poliestireno. B) Formação de biofilme em vidro. *Os dados apresentados são valores médios \pm SD de 3 experimentos independentes. As diferenças estatísticas foram determinadas pelo teste ANOVA, seguido do teste de comparação múltipla de Tukey, onde $p \leq 0,05$ quando a cepa parental NCTC 13129 foi comparada à cepa mutante LDCIC-A1.

Fonte: A autora.

Para avaliar a influência do ferro na capacidade de formação de biofilme em *C. diphtheriae*, as cepas selvagem e mutante para o gene *tlyA* foram cultivadas na presença e ausência de quelante deste íon.

Na ausência do quelante de ferro, ou seja, quando as cepas bacterianas analisadas tinham acesso ao ferro, a formação de biofilme foi maior 75,4% na cepa parental quando comparada a cepa mutante nas mesmas condições. Ocorreu expressiva redução na capacidade de aderência ao vidro, observada para ambas as cepas quando cultivadas na presença do quelante de ferro, porém a redução observada na cepa mutante (30%) foi mais expressiva. O resultado indica que o gene *tlyA* sofre influência na ausência do ferro, verificada com a diminuição da formação do biofilme no vidro (Figura 34).

Figura 34 - Influência do ferro na formação de biofilme em vidro em *Corynebacterium diphtheriae*



Legenda: 2,2'-dipiridil (quelante de ferro); NCTC 13129 (cepa selvagem); LDCIC-A1 (cepa mutante).
 *Os dados apresentados são valores médios \pm SD de 5 experimentos independentes. As diferenças estatísticas foram determinadas pelo teste ANOVA, seguido do teste de comparação múltipla de *Tukey*, com $p \leq 0,05$ quando a cepa parental NCTC 13129 foi comparada à cepa mutante LDCIC – A1 na ausência do quelante de ferro. Na presença do quelante de ferro a diferença entre as cepas não foi significativa estatisticamente.

Fonte: A autora.

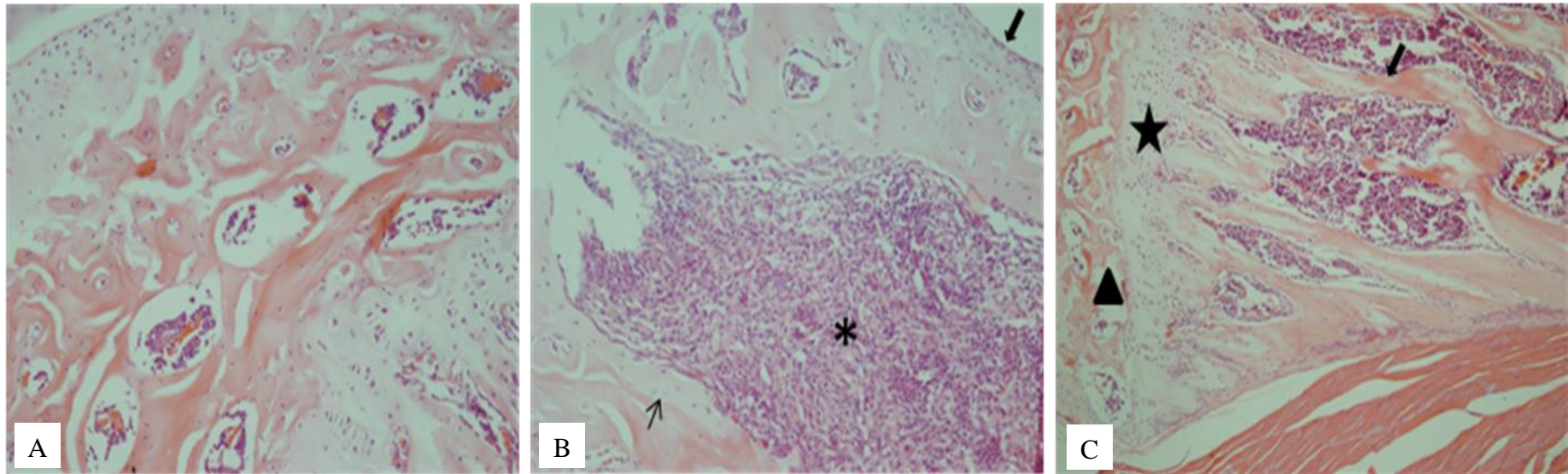
4.2.8 Potencial artritogênico da hemolisina TlyA de *Corynebacterium diphtheriae*

Os ensaios utilizando o modelo experimental *in vivo* com camundongos inoculados com as cepas NCTC 13129 e LDCIC-A1 demonstraram que a hemolisina TlyA é capaz de influenciar na habilidade de *C. diphtheriae* causar infecção hematogênica e no osso desses animais. A disseminação hematogênica e sinais clínicos de artrite foram percebidos a partir do sexto dia nos camundongos infectados com a cepa selvagem NCTC 13129. As articulações mais frequentemente afetadas foram joelho e calcanhar. Os dados apresentados na Figura 35 mostram um potencial artritogênico maior para a cepa selvagem quando em comparação com a cepa mutante LDCIC-A1.

Micrografias das características histopatológicas das articulações de camundongos infectados durante 30 dias confirmaram os sinais clínicos de artrite e osteomielite por *C. diphtheriae*. O joelho do grupo controle permaneceu livre de sintomas e pode ser observado na Figura 35A. Na Figura 35B, observa-se características histopatológicas do joelho de camundongos infectados pela cepa selvagem NCTC 13129. Alterações como cartilagem reduzida, extenso infiltrado difuso no osso subcondral e área de remodelação do tecido

(Figura 35B) foram observadas, além de extenso infiltrado inflamatório difuso que envolve e penetra no tecido ósseo. Os sinais histopatológicos observados em tecidos do joelho de camundongos infectados com o mutante LDCIC-A1 apresentaram hiperplasia da membrana e redução da cartilagem articular com destruição do osso subcondral (Figura 35C). Estas lesões causadas pelo mutante LDCIC-A1 foram menos agressivas do que as causadas pela cepa selvagem.

Figura 35 - Micrografias histopatológicas de articulações de membros posteriores de camundongos infectados experimentalmente pela veia caudal com cepas de *C. diphtheriae* NCTC 13129 e LDCIC-A1



Legenda: Modelo experimental do potencial artrítico bacteriano em camundongos por *C. diphtheriae* NCTC 13129 e seu respectivo mutante (LDCIC-A1). Características histopatológicas de joelho esquerdo observadas após 30 dias de inoculação. Em (A), o joelho do grupo controle permaneceu livre de sintomas. Articulações de camundongos infectados com *C. diphtheriae* NCTC 13129 (B) apresentavam: cartilagem do joelho esquerdo reduzida (B, seta grossa), extenso infiltrado difuso no osso subcondral (B, *) e remodelação de tecidos (B, seta fina). Os sinais artríticos visualizados no grupo de camundongos infectados por LDCIC-A1 foram menos agressivos não apresentando hiperplasia da membrana (C, estrela) nem alteração no osso subcondral do joelho (C, ▲).

Fonte: A autora.

5 DISCUSSÃO

Apesar da difteria ser uma doença com vacina desenvolvida e amplamente distribuída na população, o número de casos isolados e de surtos aumentaram em diferentes países, inclusive no Brasil. O epítipo vacinal é a toxina diftérica, fator de virulência mais bem caracterizado de *C. diphtheriae*, principal agente patológico da difteria. Atualmente, a falta de infraestrutura sanitária adequada, a elevada resistência aos antimicrobianos, a diminuição da cobertura vacinal, a crescente migração de pessoas no mundo devido a crises econômicas e conflitos armados e as consequências da pandemia de COVID-19, sugerem uma elevação no ressurgimento de doenças imunopreveníveis a nível mundial (AKSEER et al., 2020; CUCINELLI et al., 2021; DOOCY et al., 2019; TRUELOVE et al., 2020).

Os principais sintomas da difteria clássica são consequência da ação da toxina diftérica. No entanto, manifestações atípicas da doença e quadros de infecções invasivas tem sido reportados mesmo em pacientes completamente imunizados para a difteria. Além da espécie *C. diphtheriae*, outras duas espécies produtoras de TD, *C. ulcerans* e *C. pseudotuberculosis*, podem causar infecções em humanos (DIAS et al., 2011c; MATTOS-GUARALDI et al., 2011; OKAMOTO et al., 2018; WAGNER et al., 2010a). A ocorrência de difteria e outros tipos de infecções causadas por *C. ulcerans* tem superado os casos por *C. diphtheriae* em diversos países (HACKER et al., 2016; MOORE et al., 2015; OTSHUDIEMA et al., 2021; OTSUJI et al., 2019). Estes fatos sugerem um mecanismo multifatorial na patogenicidade das corinebactérias (HIRATA-JUNIOR. et al., 2008; MATTOS-GUARALDI et al., 2008; VIEIRA et al., 2022).

Tecnologias modernas de análise genômica como o sequenciamento, a técnica de sequência multiloco (MLST) e a tecnologia de edição de genes denominada CRISPR têm auxiliado os estudos moleculares sobre diferentes microrganismos. Inclusive, em *C. diphtheriae* foi relatada a existência de três sistemas CRISPR-Cas, sendo que a cepa NCTC 13129 apresenta dois sistemas distintos. Além disso, a toxina diftérica é transportada por um bacteriófago podendo infectar outras espécies de corinebactérias (SANGAL; HOSKISSON, 2014; SANGAL; FINERAN; HOSKISSON, 2013). A análise do pangenoma de *C. diphtheriae* identificou a presença de 57 ilhas genômicas, indicando que a transferência horizontal de genes é uma estratégia frequentemente utilizada pelas corinebactérias para estabelecer diferenças nas interações patógeno-hospedeiro (CERDEÑO-TÁRRAGA et al.,

2003; CZAJKA et al., 2018; D'AFONSECA et al., 2012; SOARES et al., 2012; TROST et al., 2012).

Diversos trabalhos demonstraram que genes codificadores de importantes fatores de virulência, como toxina Shiga e hemolisinas, tem sido adquiridos entre espécies bacterianas distintas. Esses fatos confirmam a importância de entender os mecanismos de transferência gênica entre espécies bacterianas (BIEN; SOKOLOVA; BOZKO, 2012; DEVAL et al., 2016; HUANG et al., 2022; JOSEPH et al., 2020; LECLERCQ et al., 2016; RAHMAN et al., 2010).

As toxinas Shiga pertencem à família das proteínas inativadoras de ribossomos (rbp), classificadas como toxinas da classe AB₅, que também incluem as toxinas da difteria, coqueluche e cólera, com as quais a toxina Shiga parece compartilhar uma relação evolutiva (HUNT, 2010; JOSEPH et al., 2020; LING et al., 1998; STEIN et al., 1992; WALSH; DODD; HAUTBERGUE, 2013).

O nosso grupo de pesquisa descobriu o gene *rbp* (CULC809_00177) como sendo um possível fator de virulência de *C. ulcerans* cepa 809. O gene *rbp* codifica uma proteína hipotética (Rbp) cuja função é inativar ribossomos, sugerindo tratar-se de uma toxina Shiga-like (MARCHLER-BAUER et al., 2011; TROST et al., 2011; WEERASEKERA et al., 2019). Porém, ainda não foi determinado se o gene *rbp* faz parte de um corinefago ou se está associado a um elemento transponível adjacente (TROST et al., 2011).

A Rbp encontrada em *C. ulcerans* cepa 809 apresenta em seu genoma apenas 24 % de similaridade com a cadeia A da toxina Shiga de *E. coli*, mas compreende todos os resíduos de aminoácidos altamente conservados necessários para a atividade catalítica da N-glicosidase (TROST et al., 2011). No presente estudo, homólogos de Rbp foram investigados entre espécies de *Corynebacterium* e foi encontrada similaridade com *C. diphtheriae* e *C. belfantii*. Dentre as cepas de *C. diphtheriae* analisadas, dez apresentaram homologia com a toxina Rbp. A cepa *C. diphtheriae* HC04, isolada de paciente com endocardite, foi a que apresentou uma proteína hipotética (CDHC04_0155), com 229 aminoácidos, de maior similaridade (76 %), quando comparada à proteína Rbp, com 306 aminoácidos, de *C. ulcerans* cepa 809, semelhante ao observado no trabalho, desenvolvido pela nossa equipe que identificou e analisou *C. ulcerans* 809 (TROST et al., 2011; WEERASEKERA et al., 2019).

As bactérias são capazes de secretar proteínas que estão associadas a diversas funções. Entre essas proteínas, as secretadas e as transmembranas constituem possíveis fatores de virulência. Sendo assim, indicar a localização celular de uma determinada proteína pode facilitar na compreensão sobre a sua função. A sequência primária de aminoácidos de uma

proteína, ao se inserir na membrana, forma uma estrutura secundária, denominada alfa-hélice, que irá promover a sua estabilização na camada lipídica. Os programas para a identificação de domínios transmembrana são baseados na predição da formação de alfa-hélices, podendo ainda predizer os domínios citoplasmáticos e extracelulares de tais proteínas (KROGH et al., 2001). A análise da topologia de Rbp de *C. diphtheriae* HC04 demonstrou que esta é uma proteína transmembrana com sítios de clivagem na mesma região, indicando que as proteínas Rbp inicialmente são clivadas e posteriormente secretadas. Resultados similares foram encontrados para a cepa *C. ulcerans* 809 (CERDEÑO-TÁRRAGA et al., 2003; WEERASEKERA et al., 2019). A análise filogenética da proteína Rbp demonstrou uma possível ancestralidade comum entre as cepas patogênicas de *C. diphtheriae*. Além disso, sugere que a toxina Shiga-like seja espécie-específico. A toxigenicidade para a TD não influenciou o agrupamento das espécies de corinebactérias, sugerindo não haver relação entre o gene *tox* e o gene *rbp*.

Os ensaios de PCR demonstraram que todas as cepas de *C. diphtheriae* analisadas apresentaram produto de amplificação do gene *rbp*, com 104 pb. Além disso, foi demonstrado que não há correlação com a presença do gene *tox* uma vez que cepas de *C. diphtheriae* produtoras e não produtoras de toxina diftérica apresentam o gene *rbp*.

A análise da expressão gênica demonstrou que as cepas com maior similaridade proteica com a Rbp de *C. ulcerans* 809 parecem expressar níveis mais elevados, enquanto as cepas de *C. diphtheriae* com menor homologia não expressam, ou expressam níveis mais baixos, da proteína Shiga-like (Rbp). No entanto, a expressão do gene *dtxR*, utilizado como normalizador destas reações, parece apresentar variações entre as espécies por ser um gene regulatório, não sendo uma escolha adequada para gene normalizador das reações de RT-qPCR. Assim, os ensaios estão sendo reanalisados utilizando o gene *rpoB* como gene normalizador para que comparações entre a intensidade da expressão diferencial do gene *rbp* possam ser realizadas entre as diferentes cepas de *C. diphtheriae* (experimentos em andamento devido a pandemia de COVID-19).

Estudos anteriores demonstraram que diferentes condições ambientais podem influenciar na expressão dos fatores de virulência de *C. diphtheriae* e *C. ulcerans* (CAPPELLI et al., 2022; SANTOS et al., 2015b). A variação de temperatura pode influenciar espécies de *Corynebacterium*, inclusive na expressão da reação de CAMP-reverso, decorrente da expressão de fosfolipase D, da cepa *C. ulcerans* 809, neste caso sendo favorecido em temperaturas mais elevadas (37° C e 40° C) (MÖLLER et al., 2020). O crescimento de *C.*

diphtheriae em regiões e/ou em épocas do ano com temperaturas mais amenas foi observado (ACOSTA et al., 2021). No presente trabalho foi demonstrado que a influência da temperatura na expressão da produção de toxina Shiga-like (Rbp), em *C. diphtheriae* HC01, foi aumentada quando a cepa foi cultivada a 4° C, quando comparada com a cepa cultivada a 37° C. Além disso, os resultados dos ensaios de interação com células Vero corroboraram com os resultados do RT-qPCR, demonstrando fenotipicamente a influência da temperatura na viabilidade e na atividade citotóxica da Shiga-like. Trabalhos recentes demonstraram a presença de *E. coli* produtoras de toxina Shiga em alimentos refrigerados, indicando que a temperatura baixa pode favorecer a expressão da toxina Shiga, inclusive favorecendo a formação de biofilme em temperaturas mais baixas (BARANZONI et al., 2016; SEGURA et al., 2018). Estudos adicionais permanecerão em andamento uma vez que genes que codificam a toxina Shiga-like foram encontrados em cepas de *C. diphtheriae* causadoras de difteria e de infecções invasivas, além da cepa vacinal PW8, ressaltando a importância desta toxina no mecanismo de virulência desta espécie.

Adicionalmente, diversas espécies bacterianas são produtoras de hemolisinas que utilizam a lise de células sanguíneas como um relevante fator de virulência: *E. coli*, *S. aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Treponema hyodysenteriae*, *Helicobacter pylori*, *Serratia marcescens*, *Vibrio parahemolyticus*, além de diferentes espécies de *Mycobacterium* spp., provocando infecções diversas, incluindo infecções do trato urinário, peritonites, apendicites, septicemia e meningite neonatal. A expressão de genes codificadores de hemolisinas é capaz de causar lesão celular através da formação de poros nas membranas celulares bacterianas. Os genes da alfa hemolisina (HlyA) de *E. coli* e, de outras espécies bacterianas, também são passíveis de transferência horizontal (BIEN; SOKOLOVA; BOZKO, 2012; DEVAL et al., 2016; GEBISA; GERASU; LEGGESE, 2019; HUANG et al., 2022; RAHMAN et al., 2010).

Classicamente, na caracterização das cepas de *C. diphtheriae* em biovars *gravis*, *mitis* e *intermedius* são utilizados os aspectos morfológicos, bioquímicos e de atividade hemolítica. Contudo, nenhum estudo foi realizado até o presente momento quanto a produção de hemolisinas específicas em *Corynebacterium* spp., inclusive *C. diphtheriae* (ACOSTA et al., 2021; TRABULSI; ALTERTHUM, 2015). Entretanto, o sequenciamento do genoma total da cepa de *C. diphtheriae* biovar *gravis* NCTC 13129 (CERDEÑO-TÁRRAGA et al., 2003), alertou a comunidade científica sobre a possibilidade da presença de gene(s) codificador(es) de hemolisina(s) em cepas de *C. diphtheriae*. A anotação no gene DIP_RS17105, no NCBI, inicialmente descrito como DIP1180, informa que a proteína hipotética (ID Blast

AAK46002.1) codificada por este gene, possui atividade de citosina/hemolisina, contendo 56,56% de similaridade com a proteína (ID Blast AE007035), de 268 aa, codificada pelo gene *tlyA* (MT1733) de *Mycobacterium tuberculosis* cepa CDC1551 e 42,27% de similaridade com a hemolisina A (ID Blast AAK23305.1), de 243 aa, codificada pelo gene CC_1324, de *Caulobacter crescentus* cepa CB15.

Os resultados obtidos no presente estudo para o gene DIP_RS17105 de *C. diphtheriae* cepa NCTC 13129, foram semelhantes ao observado para o gene *tlyA* (Rv1694) de *M. tuberculosis* cepa H37Rv, cujo produto foi anotado como homólogo a uma citosina/hemolisina hipotética no genoma desta bactéria (COLE et al., 1998; RAHMAN et al., 2010). Posteriormente, a hemolisina TlyA de *M. tuberculosis* foi caracterizada molecularmente (CAMUS et al., 2002) e manteve a anotação do genoma, sem definir a função exata de hemolisina e/ou de citotoxina. A dupla funcionalidade desta proteína foi confirmada em 2010, quando um estudo demonstrou que a proteína TlyA de *M. tuberculosis*, ao mesmo tempo que apresenta e exerce a função de uma hemolisina formadora de poros, também exerce a função de uma RNA metil transferase ribossomal, que metila ribossomos para conferir algumas vantagens de sobrevivência ao patógeno (RAHMAN et al., 2010). Uma dessas vantagens, relatadas no estudo de Rahman e colaboradores (2010), foi a de que a hemolisina apresenta uma hemólise de contato semelhante ao verificado em *E. coli* (BIEN; SOKOLOVA; BOZKO, 2012; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Além disso, a metilação ribossomal confere uma maior susceptibilidade da *M. tuberculosis* ao antibiótico capreomicina, semelhante ao observado em *E. coli* (RAHMAN et al., 2010).

Apesar dos avanços tecnológicos poucas amostras de *Corynebacterium* spp. foram sequenciadas. O gene codificador da proteína alvo deste estudo teve seu genoma sequenciado em 2003 (CERDEÑO-TÁRRAGA et al., 2003) e nove anos depois foi reanotado (D'AFONSECA et al., 2012), proporcionando uma melhoria nas informações genômicas desta espécie. No entanto, assim como observado para *M. tuberculosis*, a reanotação gênica não alterou as informações referentes ao gene DIP_RS17105 (antigo DIP_1180) em estudo, elevando a possibilidade de que realmente codifique uma proteína com atividade hemolítica.

O presente estudo não avalia outras possíveis funcionalidades da proteína TlyA entre as diferentes espécies de *Corynebacterium*. No entanto, foi observado que os genes *tlyA* de algumas corinebactérias foram anotados, no banco de dados do NCBI, como codificadores de proteínas pertencentes a família de RNA metil transferases, indicando que esta dupla funcionalidade também pode estar presente entre corinebactérias. Adicionalmente, a anotação

para TlyA de diferentes espécies de corinebactérias a classifica como membro do grupo dos ortólogos de proteína COG1189, que foram previstos como enzimas metilantes de rRNA. A mesma anotação foi relatada para a hemolisina Rv1694 de *M. tuberculosis*, reforçando a possibilidade da dupla funcionalidade desta proteína também entre corinebactérias (RAHMAN et al., 2010).

A análise dos aminoácidos conservados apresentou posições idênticas em todas as espécies, indicando que não foram observadas quaisquer alterações de natureza química dos aminoácidos e, portanto, importantes para a patogenicidade e virulência destas espécies. Resultado semelhante foi relatado em trabalhos com micobactérias, demonstrando que os genes da hemolisina, costumam ser bem conservados entre as diferentes espécies bacterianas. Adicionalmente, foi observado que TlyA é distribuída evolutivamente entre as corinebactérias, assim como entre as micobactérias, por um fluxo vertical (DEVAL et al., 2016; RAHMAN et al., 2010). A análise de filogenia da proteína TlyA indica uma possível ancestralidade comum entre as cepas de *C. diphtheriae*, independentes da presença do gene *tox*, uma vez que ficaram agrupadas em um único clado.

A localização celular de determinada proteína facilita na compreensão sobre a sua função (KLEE; ELLIS, 2005). A análise da topologia de membrana e do peptídeo sinal da proteína TlyA demonstrou ausência de regiões transmembranares, sugerindo tratar-se de uma proteína secretada.

A pesquisa *in silico* para a hemolisina TlyA encontrou três genes adicionais, que passaram a ser denominados de *tlyC*, *ygfA* e *hlyD*, cujas anotações nos genomas das cepas investigadas indicava relação com proteínas codificantes ou relacionadas a hemolisinas. De acordo com os domínios proteicos especificados nas anotações genômicas das cepas analisadas, as proteínas TlyC estão relacionados com hemolisinas. O domínio proteico YgfA pertence a superfamília HlyIII, cujos membros são proteínas integrais formadoras de canais de membrana, relacionadas com passagem intracelular, secreção e transporte vesicular, inclusive proteínas com atividade hemolítica, como descrito para *Bacillus cereus*. O domínio HlyD está relacionado com a proteína de secreção HlyD, pertencente aos sistemas de secreção de proteínas do tipo 1, mais frequentemente encontrado em bactérias Gram-negativas (LU et al., 2020). A presença dos quatro genes investigados sugere que o modelo secretor de hemolisina em *C. diphtheriae* seja semelhante ao sistema secretor do tipo 1, sugerindo a presença de um operon *hlyCABD*, semelhante ao encontrado em *E. coli*. O T1SS, constituído pelas proteínas HlyD, HlyB e TolC, é conhecido por secretar toxinas, proteases e lipases, sendo responsável

pelo transporte de proteínas diretamente do citoplasma para o meio extracelular (GEBISA; GERASU; LEGGESE, 2019; SILBERGLEIT et al., 2020; WELLS; HENDERSON, 2013). Sistema semelhante também foi encontrado em hemolisinas de *M. tuberculosis* (RAHMAN et al., 2010) e *M. leprae* (DEVAL et al., 2016).

Ensaio de aderência a monocamadas de células HEp-2 são considerados modelos úteis para o estudo de interações bacterianas de cepas de *C. diphtheriae* com a superfície do hospedeiro. Todas as cepas investigadas que apresentaram o gene *tlyA* foram capazes de interagir com HEp-2, porém somente algumas conseguiram sobreviver mais no interior das células. A influência direta do gene *tlyA* não pode ser observada uma vez que a cepa mutante LDCIC-A1 não cresceu no meio de cultura desses ensaios de interação com as células HEp-2. Estudos adicionais serão realizados para verificar se ocorreu a morte das células epiteliais e/ou através de apoptose ou necrose, além da dosagem de hemolisinas produzidas pelas cepas de *C. diphtheriae* estudadas.

Uma ampla variedade de hemolisinas já foi identificada em diferentes espécies. No entanto, pouco se sabe a respeito deste fator em cepas de *C. diphtheriae*, justificando-se, assim, a importância de estudar a atividade hemolítica destas cepas. As cepas de *C. diphtheriae* apresentaram atividade hemolítica em hemácias de carneiro em intensidades variadas, exceto a cepa de biovar *intermedius* MA136. A cepa mutante LDCIC-A1 também apresentou hemólise reduzida em comparação a cepa selvagem, indicando que o gene *tlyA* está relacionado com esta atividade. No entanto, as amostras TD-negativas ATCC 27010, e a homóloga TD-positiva ATCC 27012 apresentaram diferentes intensidades de hemólise, sugerindo que outros fatores de virulência, inclusive a toxina diftérica ou mesmo a toxina Shiga-like podem também causar hemólise em hemácias de carneiro. Adicionalmente, em *S. aureus* foi demonstrado a existência de quatro tipos de hemolisinas, sendo que a beta-hemolisina exerce atividade em concomitância com a alfa-hemolisina, levando a instabilidade da membrana sem a formação de poro (GUAN et al., 2021; VANDENESCH; LINA; HENRY, 2012), o que poderia explicar a produção de hemólise diminuída na cepa mutante LDCIC-A1. Análises quantitativas e qualitativas das atividades hemolíticas de outros fatores de virulência serão realizadas futuramente.

As condições ambientais investigadas exerceram influência nas atividades hemolíticas das cepas de *C. diphtheriae*. Em condições de estresse geradas pela limitação de ferro ocorreu inibição da formação de biofilme na superfície hidrofóbica do vidro, indicando que a expressão do gene *tlyA* dependente da presença de ferro. Interessantemente a cepa mutante para o gene

da hemolisina também teve a sua capacidade de produção de biofilme reduzida, correlacionando os dois mecanismos de virulência. As cepas analisadas produziram biofilme em superfície hidrofóbica de poliestireno, independente do gene *tlyA*. Resultados semelhantes foram observadas em *E. coli* cepa MC2 relacionando a capacidade de produzir hemólise com a capacidade de transportar heme da hemoglobina, resultando em um mecanismo eficiente de aquisição de ferro para patógenos responsáveis por lesões hemolíticas (SEGURA et al., 2018). Em *S. aureus* foi demonstrado que hemolisinas podem favorecer a formação de biofilme (GUAN et al., 2021).

Adicionalmente condições limitantes de oxigênio favoreceu a expressão da atividade hemolítica em hemácias de carneiro em todas as cepas analisadas. Entretanto não induziu a atividade hemolítica na nas cepas MA 136 do biovar *intermedius* e da mutante LDCIC-A1.

A formação de biofilme é influenciada por fatores genéticos e ambientais. A regulação da formação de biofilme no hospedeiro pode ser uma estratégia eficiente na proteção de bactérias patogênicas contra defesas do hospedeiro. Participam deste processo, interações físico-químicas, como carga e hidrofobicidade, e interações moleculares específicas, por meio de adesinas fimbriais e não-fimbriais. Cepas de *C. diphtheriae* são capazes de aderir com intensidades variadas às superfícies abióticas do vidro e do poliestireno (ANTUNES et al., 2015; GOMES et al., 2009; SABBADINI et al., 2010). As cepas de *C. diphtheriae* que possuem o gene *tlyA* para hemolisina também demonstraram capacidade de formar biofilme em superfícies abióticas. As cepas analisadas produziram biofilme em poliestireno independente do gene *tlyA*. No entanto, o truncamento do gene *tlyA* influenciou nos mecanismos de formação de biofilme em superfície hidrofílica do vidro em cepas de *C. diphtheriae*, indicando a participação da hemolisina na formação de biofilme.

Independente da capacidade de produção de toxina diftérica (TD), foram descritos diversos casos de artrite relacionados com *C. diphtheriae* (ANTUNES et al., 2015; CAPPELLI et al., 2022; PEIXOTO et al., 2017). A habilidade de cepas de *C. diphtheriae* induzirem artrite por via hematogênica foi demonstrada utilizando modelo *in vivo* em camundongos. No presente trabalho, foi avaliada a capacidade da cepa selvagem NCTC 13129 e da cepa mutante LDCIC-A1 de causarem artrite em camundongos. Além disso, foi investigada a influência da hemolisina TlyA nesse processo. Sinais clínicos de artrite e osteomielite foram observados para ambas as cepas. Análises histológicas das articulações dos membros posteriores de camundongos demonstraram que camundongos infectados com a cepa mutante LDCIC-A1 apresentaram um processo inflamatório local reduzido quando

comparado à cepa selvagem, sugerindo que a hemolisina TlyA leva a uma maior agressividade dessas cepas.

CONCLUSÕES

Neste trabalho, a investigação de genes *rbp* e *tlyA*, codificadores de homólogos da toxina Shiga e de hemolisina respectivamente, foram encontrados, *in silico*, em *C. diphtheriae* e outras espécies do gênero *Corynebacterium*. Fenotipicamente, também foi demonstrado que condições de temperaturas mais baixas exercem influência positiva nos mecanismos citotóxicos de virulência e de expressão da toxina Shiga-like.

Em relação a hemolisina TlyA foi concluído que as condições de microaerofilia exercem influência positiva na expressão do gene *tlyA*, enquanto em condições de limitação de ferro a expressão deste gene foi desfavorecida. Além disso, o gene *tox* não exerceu influência na expressão dos genes investigados. Também foi observado efeito citotóxico em hemácias, nas células epiteliais e na formação de biofilme de *C. diphtheriae*. A hemolisina TlyA demonstrou importante participação nos processos inflamatórios uma vez que a cepa mutante apresentou diminuição da capacidade de induzir lesões características de processos artrítogênicos e de osteomielite, observados em modelos animais de murinos. Desta forma, estudos adicionais sobre a caracterização funcional da toxina Shiga-like e da hemolisina TlyA e seus mecanismos de regulação são necessários para melhor elucidar o papel destas toxinas na patogenicidade de *C. diphtheriae* e de outras corinebactérias de relevância clínica.

REFERÊNCIAS

ACOSTA, A. M.; MORO, P. L.; HARIRI, S. e TIWARI, T. S. P. **Diphtheria**. In: Pink book. p. 97–110, 2021.

AHN, S.; CHUNG, H. Y.; LIM, S.; KIM, K.; KIM, S.; NA, E. J.; CAETANOANOLLES, K.; LEE, J. H.; RYU, S.; CHOI, S. H.; KIM, H. Complete genome of *Vibrio parahaemolyticus* FORC014 isolated from the toothfish. **Gut Pathogens**, v. 8, n. 1, p. 59, 2016.
DOI: 10.1186/s13099-016-0134-0.

AKSEER, N.; WRIGHT, J.; TASIC, H.; EVERETT, K.; SCUDDER, E.; AMSALU, R.; BOERMA, T.; BENDAVID, E.; KAMALI, M.; BARROS, A. J. D.; SILVA, I. C.; BHUTTA, Z. A. Women, children, and adolescents in conflict countries: an assessment of inequalities in intervention coverage and survival. **BMJ Global Health**, v. 5, n. 1, p. e002214, 2020.
DOI: 10.1136/bmjgh-2019-002214.

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. **Journal Clinical Microbiology**, v. 50, p. 160–163, 2012.
DOI: 10.1128/JCM.05889-11.

ALEXANDER, D. Splenic Abscess Caused by *Corynebacterium diphtheriae*. **Clinical Pediatrics**, v. 23, n. 10, p. 591–592, 1984.
DOI: 10.1177/000992288402301013.

ALI, S. G.; ANSARI, M. A.; KHAN, H. M.; JALAL, M.; MAHDI, A. A.; CAMEOTRA, S. S. *Crataeva nurvala* nanoparticles inhibit virulence factors and biofilm formation in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 57, n. 3, p. 193–203, 2017.
DOI: 10.1002/jobm.201600175.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, M. A.; ZHANG, J.; ZHANG, W.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389–3402, 1997.
DOI: 10.1093/nar/25.17.3389.

ANDREOLI, S. P.; TRACHTMAN, H.; ACHESON, D. W.; SIEGLER, R. L.; OBRIG, T. G. Hemolytic uremic syndrome: epidemiology, pathophysiology, and therapy. **Pediatric Nephrology**, v. 17, p. 293–298, 2002.
DOI: 10.1007/s00467-001-0783-0

ANTUNES, C. A.; SANTOS, L. S.; HACKER, E.; KOHLER, S.; BOSL, K.; OTT, L.; LUNA, M. G.; HIRATA, R. J.; AZEVEDO, V. A. C.; MATTOS-GUARALDI, A. L.; BURKOVSKI, A. Characterization of DIP0733, a multi-functional virulence factor of *Corynebacterium diphtheriae*. **Microbiology**, v. 161, n. 3, p. 639–647, 2015.
DOI: 10.1099/mic.0.000020.

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.
DOI: 10.1016/j.gene.2011.12.010.

- BAASKE, R.; RICHTER, M.; MÖLLER, N.; ZIESEMER, S.; EIFFLER, I.; MÜLLER, C.; HILDEBRANDT, J. P. ATP Release from Human Airway Epithelial Cells Exposed to *Staphylococcus aureus* Alpha-Toxin. **Toxins**, v. 8, n. 12, p. 365, 2016.
DOI: 10.3390/toxins8120365.
- BADELL, E.; HENNART, M.; RODRIGUES, C.; PASSET, V.; DAZAS, M.; PANUNZI, L.; BOUCHEZ, V.; CARMÍ-LEROY, A.; TOUBIANA, J.; BRISSE, S. *Corynebacterium rouxii* sp. nov., a novel member of the diphtheriae species complex. **Research in Microbiology**, v. 171, n. 3–4, p. 122–127, 2020.
DOI: 10.1016/j.resmic.2020.02.003.
- BADELL, E.; ALHARAZI, A.; CRISCUOLO, A.; ALMOAYED, K. A. A.; LEFRANCQ, N.; BOUCHEZ, V.; GUGLIELMINI, J.; HENNART, M.; CARMÍ-LEROY, A.; ZIDANE, N.; PASCAL-PERRIGAULT, M.; LEBRETON, M.; MARTINI, H.; SALJE, H.; TOUBIANA, J.; DUREAB, F.; DHABAAN, G.; BRISSE, S.; RAWAH, A. A.; ALDAWLA, M. A.; AL-AWDI, E. M.; AL-MOALMY, N. M.; AL-SHAMI, H. Z.; AL-SOMAINY, A. A. Ongoing diphtheria outbreak in Yemen: a cross-sectional and genomic epidemiology study. **The Lancet Microbe**, v. 2, n. 8, p. e386–e396, 2021.
DOI: 10.1016/S2666-5247(21)00094-X.
- BANSAL, Y.; KOMBADE, S.; NAG, V.; PATRO, S. Case of Ludwig’s angina due to *Corynebacterium diphtheriae* from western Rajasthan, India—A case report of an uncommon presentation. **Journal of Family Medicine and Primary Care**, v. 8, n. 9, p. 3061, 2019.
DOI: 10.4103/jfmpc.jfmpc_684_19.
- BARANZONI, G. M.; FRATAMICO, P. M.; GANGIREDLA, J.; PATEL, I.; BAGI, L.; DELANNOY, S.; FACH, P.; BOCCIA, F.; ANASTASIO, A.; PEPE, T. Characterization of Shiga Toxin Subtypes and Virulence Genes in Porcine Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016.
DOI: 10.3389/fmicb.2016.00574.
- BESA, N. C.; COLDIRON, M. E.; BAKRI, A.; RAJI, A.; NSUAMI, M. J.; ROUSSEAU, C.; HURTADO, N.; K, PORTEN. Diphtheria outbreak with high mortality in northeastern Nigeria. **Epidemiol Infect**, v. 142, n. 4, p. 797–802, 2014.
- BEUTIN, L.; KRAUSE, G.; ZIMMERMANN, S.; KAULFUSS, S.; GLEIER, K. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany over a 3-year period. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 1099–1108, 2004.
- BIEN, J.; SOKOLOVA, O.; BOZKO, P. Role of Uropathogenic *Escherichia coli* Virulence Factors in Development of Urinary Tract Infection and Kidney Damage. **International Journal of Nephrology**, v. 2012, p. 1–15, 2012.
DOI: 10.1155/2012/681473.
- BOLT, F.; CASSIDAY, P.; TONDELLA, M. L.; DEZOYSA, A.; EFSTRATIOU, A.; SING, A.; ZASADA, A.; BERNARD, K.; GUIISO, N.; BADELL, E.; ROSSO, M. L.; BALDWIN, A.; DOWSON, C. Multilocus Sequence Typing Identifies Evidence for Recombination and Two Distinct Lineages of *Corynebacterium diphtheriae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 11, p. 4177–4185, 2010.
DOI: 10.1128/JCM.00274-10.
- BRASIL. **Nota técnica no 25.000.140.269/2010-39**. Informe sobre a difteria no Brasil. 2010.
- BRENNER, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 77, n. 1, p. 71–94, 1974.

- BURKOVSKI, A. Diphtheria and its etiological agents. In: SPRINGER (org.). *Corynebacterium diphtheriae* and related toxigenic species. Dordrecht. p. 1–14.
- CAMUS, J. C.; PRYOR, M. J.; MÉDIGUE, C.; COLE, S. T. Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. **Microbiology**, v. 148, n. 10, p. 2967–2973, 2002.
DOI: 10.1099/00221287-148-10-2967.
- CAPPELLI, E. A.; CUCINELLI, A. E. S.; SIMPSON-LOUREDO, L.; CANELLAS, M. E. F.; ANTUNES, C. A.; BURKOVSKI, A.; SILVA, J. F. R.; MATTOS-GUARALDI, A. L.; SALIBA, A. M.; SANTOS, L. S. Insights of OxyR role in mechanisms of host–pathogen interaction of *Corynebacterium diphtheriae*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 583–594, 2022.
DOI: 10.1007/s42770-022-00710-8.
- CASAGRANDE, S.T.; GARBELLOTTI, M.; KOBATA, A. M.; MELLO, M. L. R.; HIDALGO, N. T. Diagnóstico laboratorial da difteria e a prática da coleta de material de comunicantes como estratégia da vigilância epidemiológica - São Paulo, 1987 a 1996. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 14, n. 3, p. 181–190, 2005.
DOI: 10.5123/s1679-49742005000300006.
- CATANI, F. C. Purificação e caracterização de enterohemolisina produzida por *Escherichia coli* enteropatogênica. 1999. Universidade Estadual de Campinas, 1999.
- CDC. Travelers' Health - **Yellow Book** - Prevention of Specific Infectious Diseases - Diphtheria. 2015.
- CDC. **Health Information for International Travel**. Atlanta. U.S. 2017.
- 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 diphtheriae* NCTC13129. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 22, p. 6516–6523, 2003.
DOI: 10.1093/nar/gkg874.
- CHAN, Y. S.; NG, T. B. Shiga toxins: from structure and mechanism to applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 4, p. 1597–1610, 2016.
DOI: 10.1007/s00253-015-7236-3.
- CIANCIOTTO, N.; RAPPUOLI, R.; GROMAN, N. Detection of homology to the beta bacteriophage integration site in a wide variety of *Corynebacterium* spp. **Journal of Bacteriology**, v. 168, p. 103–108, 1986.
- 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. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 11, p. 3900–3902, 2013.
DOI: 10.1128/JCM.01403-13.
- COLE, S. T.; BROSCHE, R.; PARKHILL, J.; GARNIER, T.; CHURCHER, C.; HARRIS, D.; GORDON, S. V.; EIGLMEIER, K.; GAS, S.; BARRY, C. E.; TEKAIA, F.; BADCOCK, K.;

BASHAM, D.; BROWN, D.; CHILLINGWORTH, T.; CONNOR, R.; DAVIES, R.; DEVLIN, K.; FELTWELL, T.; GENTLES, S.; HAMLIN, N.; HOLROYD, S.; HORNSBY, T.; JAGELS, K.; KROGH, A.; MCLEAN, J.; MOULE, S.; MURPHY, L.; OLIVER, K.; OSBORNE, J.; QUAIL, M. A.; RAJANDREAM, M.-A.; ROGERS, J.; RUTTER, S.; SEEGER, K.; KELTON, J.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; SULSTON, J. E.; TAYLOR, K.; WHITEHEAD, S.; BARRELL, B. G. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature**, v. 393, n. 6685, p. 537–544, 1998.
DOI: 10.1038/31159.

COID. Committee on Infectious Diseases, American Academy of Pediatrics. **Red book: 2018–2021 report of the Committee on Infectious Diseases**. 2018

COLOMBO, A. *Corynebacterium diphtheriae* surface proteins as adhesins to human erythrocytes. **FEMS Microbiology Letters**, v. 197, n. 2, p. 235–239, 2001.
DOI: 10.1016/S0378-1097(01)00113-6.

CROXEN, M. A. e FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nature reviews microbiology**, v. 8, p. 26–38, 2010.

CROXEN, M. A.; ROBYN, J.; LAW, R. J.; SCHOLZ, R.; KRISTIE, M.; WLODARSKA, M.; FINLAY, B. B. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Clinical microbiology reviews**, v. 26, p. 822–880, 2013.

CUCINELLI, A. E. S. Doenças reemergentes e vigilância epidemiológica: fatores que favorecem novas epidemias no contexto da COVID-19 no Brasil. In: ASENSI, Felipe (org.). **Conhecimento de Multidisciplinaridade**. 1ª. ed. Rio de Janeiro: Pembroke Collins, v. 2p. 69–91. 2020

CUCINELLI, A. E. S.; CAPPELLI, E. A.; GARCIA, B. S.; MAIA, C. O.; SOUZA, C.; SIMPSON-LOUREDO, L.; SANT'ANNA, L. S. S.; FERREIRA, P. E. N.; SALIBA, A. M.; MATTOS-GUARALDI, A. L. Intratonsillar abscess caused non-diphtheria toxin producing *Corynebacterium diphtheriae* confirmed by multiplex PCR: case report and literature review of atypical infections caused by diphtheria pathogens. In: SILVA, Carliane Rebeca Coelho e Igor Luiz Vieira da Lima (org.). **Genética a serviço da sociedade**. 1. ed. Campina Grande/Pernambuco: Editora Science, p. 549. 2021.

CYRIL, G.; RATHISH, B.; WILSON, A.; WARRIER, A.; VISWAM, V. A Case of Diphtheria and Infectious Mononucleosis Co-Infection in a Partially Vaccinated Boy. **Cureus**, v. 690, n. 10, p. 10–13, 2020.
DOI: 10.7759/cureus.11227.

CZAJKA, U.; WIATRZYK, A.; MOSIEJ, E.; FORMIŃSKA, K.; ZASADA, A. A. Changes in MLST profiles and biotypes of *Corynebacterium diphtheriae* isolates from the diphtheria outbreak period to the period of invasive infections caused by nontoxigenic strains in Poland (1950–2016). **BMC Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. 121, 2018.
DOI: 10.1186/s12879-018-3020-1.

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-JUNIOR, 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. **Open Access Bioinformatics**, v. 4, n. 1, p. 1–13, 2012.

DOI: 10.2147/OAB.S25500.

DANGEL, A.; BERGER, A.; KONRAD, R.; BISCHOFF, H.; SING, A. Geographically Diverse Clusters of Nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae* Infection, Germany, 2016–2017.

Emerging Infectious Diseases, v. 24, n. 7, p. 1239–1245, 2018.

DOI: 10.3201/eid2407.172026.

DAZAS, M.; BADELL, E.; CARMI-LEROY, A.; CRISCUOLO, A.; BRISSE, S. Taxonomic status of *Corynebacterium diphtheriae* biovar *belfanti* and proposal of *Corynebacterium belfantii* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 68, n. 12, p. 3826–3831, 2018.

DOI: 10.1099/ijsem.0.003069.

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. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 223–228, 2005.

DOI: 10.1128/JCM.43.1.223-228.2005.

DEVAL, H.; KATOCH, K.; CHAUHAN, D. S.; TYAGI, A. K.; GUPTA, R. K.; KAMAL, R.; KUMAR, A.; YADAV, V. S.; KATOCH, V. M.; HUSSAIN, T. TlyA protein of *Mycobacterium leprae*: a probable biomarker of active infection. **Leprosy Review**, v. 87, n. 4, p. 501–515, 2016.

DOI: 10.47276/lr.87.4.501.

DIAS, A. A. S. O.; SILVA, F. C.; SANTOS, L. S.; RIBEIRO-CARVALHO, M. M.; SABBADINI, P. S.; SANTOS, C. S.; FILARDY, A. A.; MYIOSHI, A.; AZEVEDO, V. A.; HIRATA, R.; VILLAS-BÔAS, M.H.S.; MATTOS-GUARALDI, A.L. Strain-dependent arthritogenic potential of the zoonotic pathogen *Corynebacterium ulcerans*. **Veterinary Microbiology**, v. 153, n. 3–4, p. 323–331, 2011. b

DOI: 10.1016/j.vetmic.2011.06.007.

DIAS, A. A. S. O.; SILVA, F. C.; PEREIRA, G. A.; SOUZA, M. C.; CAMELLO, T. C. F.; DAMASCENO, J. A. L. D.; PACHECO, L. G. C.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. A.; HIRATA, RAPHAEL; BÔAS, MARIA H. S. V.; MATTOS-GUARALDI, A. L. *Corynebacterium ulcerans* isolated from an asymptomatic dog kept in an animal shelter in the metropolitan area of Rio de Janeiro, Brazil. **Vector borne and zoonotic diseases** (Larchmont, N.Y.), v. 10, n. 8, p. 743–748, 2010. a

DOI: 10.1089/vbz.2009.0132.

DIAS, A. A. S. O.; SILVA, F. C.; PEREIRA, G. A.; SOUZA, M. C.; CAMELLO, T. C. F.; DAMASCENO, J. A. L. D.; PACHECO, L. G. C.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. A.; HIRATA, RAPHAEL; BÔAS, M. H.S.V.; MATTOS-GUARALDI, A. L. *Corynebacterium ulcerans* diphtheria: an emerging zoonosis in Brazil and worldwide TT - **Revista de Saúde Pública**, v. 45, n. 6, p. 1176–1191, 2011. c.

DOI: 10.1590/S0034-89102011000600021.

DIETRICH, G.; VIRET, J. F. e GENTSCHEV, I. Haemolysin A and listeriolysin--two vaccine delivery tools for the induction of cell mediated immunity. **International Journal for Parasitology**, v. 33, n. 5, p. 495–505, 2003.

DOOCY, S.; PAGE, K. R.; DE LA HOZ, F.; SPIEGEL, P.; BEYRER, C. Venezuelan Migration and the Border Health Crisis in Colombia and Brazil. **Journal on Migration and Human Security**, v. 7, n. 3, p. 79–91, 2019.
DOI: 10.1177/2331502419860138.

DORELLA, F. A.; ESTEVAM, E. M.; CARDOSO, P. G.; SAVASSI, B. M.; OLIVEIRA, S. C.; AZEVEDO, V.; MIYOSHI, A. An improved protocol for electrotransformation of *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Veterinary Microbiology**, v. 114, n. 3–4, p. 298–303, 2006.
DOI: 10.1016/j.vetmic.2005.12.010.

DU PLESSIS, M.; WOLTER, N.; ALLAM, M.; GOUVEIA, L.; MOOSA, F.; NTSHOE, G.; BLUMBERG, L.; COHEN, C.; SMITH, M.; MUTEVEDZI, P.; THOMAS, J.; HORNE, V.; MOODLEY, P.; ARCHARY, M.; MAHABEER, Y.; MAHOMED, S.; KUHN, W.; MLISANA, K.; MCCARTHY, K.; VON GOTTBURG, A. Molecular Characterization of *Corynebacterium diphtheriae* Outbreak Isolates, South Africa, March–June 2015. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 8, p. 1308–1315, 2017.
DOI: 10.3201/eid2308.162039.

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, p. 138–145, 2000.

EFSTRATIOU, A. e DEZOYSA, E. K. H. Diagnosis an Epidemiology of Diphtheria. **Methods in Molecular Medicini**, v. 15, p. 1–22, 1998.
DOI: 10.1385/0-89603-498-4:191.

EFSTRATIOU, A. e GEORGE, R. C. Laboratory guidelines for the diagnosis of infections caused by *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans*. World Health Organization. **Communicable disease and public health**, v. 2, n. 4, p. 250–7, 1999.

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

ESTOFOLETE, C. F.; MILHIM, B. H. G. A.; FRANÇA, C. C. G.; SILVA, G. C. D.; AUGUSTO, M. T.; TERZIAN, A. C. B.; ZINI, N.; DURIGON, E. L.; OLIVEIRA, D. B. L.; MASSAD, E.; NOGUEIRA, M. L. Prevalence of Measles Antibodies in São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil: A serological survey model. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 5179, 2020.
DOI: 10.1038/s41598-020-62151-3.

EXAVIER, M. M.; PAUL HANNA, M.; MUSCADIN, E.; FREISHSTAT, R.J.; BRISMA, J. P.; CANARIE, M. F. Diphtheria in Children in Northern Haiti. **Journal of Tropical Pediatrics**, v. 65, n. 2, p. 183–187, 2019.
DOI: 10.1093/tropej/fmy021.

FARFOUR, E.; BADELL, E.; ZASADA, A.; HOTZEL, H.; TOMASO, H.; GUILLOT, S.; GUIISO, Nicole. Characterization and Comparison of Invasive *Corynebacterium diphtheriae* Isolates from France and Poland. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 173–175, 2012.
DOI: 10.1128/JCM.05811-11.

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 Research**, v. 44, n. D1, p. D279–D285, 2016.
DOI: 10.1093/nar/gkv1344.

FORMIGA, L. C. New possibilities for the laboratory diagnosis of diphtheria. **Brazilian Journal of medical and biology research**, v. 18, p. 401–402, 1985.

FRANKS, S. E.; EBRAHIMI, C.; HOLLANDS, A.; OKUMURA, C. Y.; AROIAN, R. V.; NIZET, V. e; MCGILLIVRAY, S. M. Novel role for the yceGH tellurite resistance genes in the pathogenesis of *Bacillus anthracis*. **Infection and Immunity**, v. 82, p. 1132–1140, 2014.

FRIEDRICH, A. W.; BIELASZEWSKA, M.; ZHANG, W. L.; PULZ, M.; KUCZIUS, T.; AMMON, A. e; KARCH, H. *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. **Journal Infection Diseases**, v. 185, p. 74–84, 2002.

FUNKE, G.; VON GRAEVENITZ, A.; CLARRIDGE, J. e BERNARD, K. A. Clinical microbiology of coryneform bacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, n. 1, p. 125–159, 1997.
DOI: 10.1128/CMR.10.1.125.

GALAZKA, A. The Changing Epidemiology of Diphtheria in the Vaccine Era. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, n. s1, p. S2–S9, 2000. b.
DOI: 10.1086/315533.

GALAZKA, A. M.; ROBERTSON, S. E. Diphtheria: Changing patterns in the developing world and the industrialized world. **European Journal of Epidemiology**, v. 11, n. 1, p. 107–117, 1995.
DOI: 10.1007/BF01719955.

GEBISA, E. S.; GERASU, M. A.; LEGGESE, D. T. A Review on Virulence Factors of *Escherichia Coli*. **Animal and Veterinary Sciences**, v. 7, n. 3, p. 83, 2019.
DOI: 10.11648/j.av.s.20190703.13.

GENTSCHIEV, I.; MOLLENKOPF, H.; SOKOLOVIC, Z.; HESS, J.; KAUFMANN, S. H. e; GOEBEL, W. Development of antigen-delivery systems, based on the *Escherichia coli* hemolysin secretion pathway. **Gene**, v. 179, n. 1, p. 133–140, 1996.

GEORGE, J. N.; NESTER, C. M. Syndromes of Thrombotic Microangiopathy. **New England Journal of Medicine**, v. 371, n. 7, p. 654–666, 2014.
DOI: 10.1056/NEJMra1312353.

GOMES, D. L. R.; PEIXOTO, R. S.; BARBOSA, E. A. B.; NAPOLEÃO, F.; SABBADINI, P. S.; DOS SANTOS, K. R. N.; MATTOS-GUARALDI, A. L.; HIRATA, R. SubMICs of penicillin and erythromycin enhance biofilm formation and hydrophobicity of *Corynebacterium diphtheriae* strains. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. 5, p. 754–760, 2013.
DOI: 10.1099/jmm.0.052373-0.

GOMES, D. L. R.; MARTINS, C. A. S.; FARIA, L. M. D.; SANTOS, L. S.; SANTOS, C. S.; SABBADINI, P. S.; SOUZA, M. C.; ALVES, G. B.; ROSA, A. C. P.; NAGAO, P. E.; PEREIRA, G. A.; HIRATA, R.; MATTOS-GUARALDI, A. L. *Corynebacterium diphtheriae* as an emerging pathogen in nephrostomy catheter-related infection: evaluation of traits associated with bacterial virulence. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, n. 11, p. 1419–1427, 2009.
DOI: 10.1099/jmm.0.012161-0.

GOWER, C. M.; SCOBIE, A.; FRY, N. K.; LITT, D. J.; CAMERON, J. C.; CHAND, M. A.; BROWN, C. S.; COLLINS, S.; WHITE, J. M.; RAMSAY, M. E.; AMIRTHALINGAM, G. The changing epidemiology of diphtheria in the United Kingdom, 2009 to 2017. **Euro surveillance**, v. 25, n. 11, p. 1–10, 2020.
DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.11.1900462.

GUAN, Z.; LIU, Y.; LIU, C.; WANG, H.; FENG, J.; YANG, G. *Staphylococcus aureus* β -Hemolysin Up-Regulates the Expression of IFN- γ by Human CD56bright NK Cells. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, 2021.
DOI: 10.3389/fcimb.2021.658141.

GUTH, B. E. C.; CHINEN, I.; MILIWEBSKY, E.; CERQUEIRA, A. M. F.; CHILLEMI, G.; ANDRADE, J. R. C.; BASCHKIER, A. e; RIVAS, M. Serotypes and Shiga toxin genotypes among *Escherichia coli* strains isolated from animals and foods in Argentina and Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 92, p. 335–349, 2008.

HACKER, E.; ANTUNES, C. A.; MATTOS-GUARALDI, A. L.; BURKOVSKI, A.; TAUCH, A. *Corynebacterium ulcerans*, an emerging human pathogen. In: **Encyclopedia of Immunotoxicology**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. p. 400–400. 2016
DOI: 10.1007/978-3-642-54596-2_200697.

HACKER, J.; BENDER, L.; OTT, M.; WINGENDER, J.; LUND, B.; MARRE, R. e; GOEBEL, W. Deletions of chromosomal regions coding for fimbriae and hemolysin occur in vitro and in vivo in various extraintestinal *Escherichia coli*. **Microbial Pathogenesis**, v. 8, p. 213–225, 1990.

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.; TONDELLA, M. L. *Corynebacterium diphtheriae* in domestic cats. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 4, p. 688–691, 2010.
DOI: 10.3201/eid1604.091107.

HENNART, M.; PANUNZI, L. G.; RODRIGUES, C.; GADAY, Q.; BAINES, S. L.; BARROS-PINKELNIG, M.; CARMI-LEROY, A.; DAZAS, M.; WEHENKEL, A. M.; DIDELOT, X.; TOUBIANA, J.; BADELL, E.; BRISSE, S. Population genomics and antimicrobial resistance in *Corynebacterium diphtheriae*. **Genome Medicine**, v. 12, n. 1, p. 107, 2020.
DOI: 10.1186/s13073-020-00805-7.

HILALI, F.; RUIMY, R.; SAULNIER, P.; BARNABÉ, C.; LÉBOUGUÉNEC, C.; TIBAYRENC, M.; ANDREMONT, A. Prevalence of Virulence Genes and Clonality in *Escherichia coli* Strains That Cause Bacteremia in Cancer Patients. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 7, p. 3983–3989, 2000.
DOI: 10.1128/IAI.68.7.3983-3989.2000.

HIRATA-JUNIOR., 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. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, n. 11, p. 986–991, 2008.
DOI: 10.1590/S0100-879X2008001100007.

HIRATA-JUNIOR, R.; SOUZA, S. M. S.; ROCHA-DE-SOUZA, C. M.; ANDRADE, A. F. B.; MONTEIRO-LEAL, L. H.; FORMIGA, L. C. D.; MATTOS-GUARALDI, A. L. Patterns of

adherence to HEp-2 cells and actin polymerisation by toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains. **Microbial Pathogenesis**, v. 36, n. 3, p. 125–130, 2004.
DOI: 10.1016/j.micpath.2003.10.002.

HIRATA, Jr. Potential pathogenic role of aggregative-adhering *Corynebacterium diphtheriae* of different clonal groups in endocarditis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, n. 11, p. 986–991, 2008.
DOI: 10.1590/S0100-879X2008001100007.

HIRATA, 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, n. 3, p. 733–737, 2011.
DOI: 10.1007/s10482-010-9519-0.

HIRATA, R.; NAPOLEÃO, F.; MONTEIRO-LEAL, L. H.; ANDRADE, A. F. B.; NAGAO, P. E.; FORMIGA, L. C. D.; FONSECA, L. S.; MATTOS-GUARALDI, A. L. Intracellular viability of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains in HEp-2 cells. **FEMS microbiology letters**, v. 215, n. 1, p. 115–9, 2002.
DOI: 10.1111/j.1574-6968.2002.tb11379.x.

HUANG, Y.; LYU, B.; ZHANG, X.; TIAN, Y.; LIN, C.; SHEN, L.; YAN, H.; ZHANG, D.; JIA, L.; Qu, M.; WANG, Q. *Vibrio parahaemolyticus* O10: K4: An Emergent Serotype with Pandemic Virulence Traits as Predominant Clone Detected by Whole-Genome Sequence Analysis — Beijing Municipality, China, 2021. **Chinese Center for Disease Control and Prevention**, v. 4, n. 22, p. 471–477, 2022.

HUNT, J. M. Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* (STEC). **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 30, n. 1, p. 21–45, 2010.
DOI: 10.1016/j.cll.2009.11.001.

ISHII-KANEI, C.; UCHIDA, T. e YONEDA, M. Isolation of a cured strain from *Corynebacterium diphtheriae* PW8. **Infection and Immunity**, v. 25, p. 1081–1083, 1979.

IWAKI, M.; KOMIYA, T.; YAMAMOTO, A.; ISHIWA, A.; NAGATA, N.; ARAKAWA, Y. e TAKAHASHI, M. Genome organization and pathogenicity of *Corynebacterium diphtheriae* C7(–) and PW8 strains. **Infection and Immunity**, v. 78, p. 3791–3800, 2010.

JI YOUN, L.; YOON, J. W. e HOVDE, C. J. A Brief overview of *Escherichia coli* O157:H7 and its plasmid O157. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 1–10, 2010.

JIN, Y.; TANG, S.; LI, W.; NG, S. C.; CHAN, M. W. Y.; SUNG, J. J. Y.; YU, J. Hemolytic *E. coli* Promotes Colonic Tumorigenesis in Females. **Cancer Research**, v. 76, n. 10, p. 2891–2900, 2016.
DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-15-2083.

JOHANNES, L. e RÖMER, W. Shiga toxins — from cell biology to biomedical applications. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 2, p. 105–116, 2010.
DOI: 10.1038/nrmicro2279.

JONES, D. T.; TAYLOR, W. R.; THORNTON, J. M. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. **CABIOS**, v. 8, p. 275–282. 1992

JOSEPH, A.; COINTE, A.; MARIANI KURKDJIAN, P.; RAFAT, C.; HERTIG, A. Shiga Toxin-Associated Hemolytic Uremic Syndrome: A Narrative Review. **Toxins**, v. 12, n. 2, p. 67, 2020.

DOI: 10.3390/toxins12020067.

KAKOULLIS, L.; PAPACHRISTODOULOU, E.; CHRA, P.; PANOS, G. Shiga toxin-induced haemolytic uraemic syndrome and the role of antibiotics: a global overview. **Journal of Infection**, v. 79, n. 2, p. 75–94, 2019.

DOI: 10.1016/j.jinf.2019.05.018.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 123–140, 2004.

DOI: 10.1038/nrmicro818.

KARMALI, M. A.; PETRIC, M.; STEELE, B.T.; LIM, C. Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. **The Lancet**, v. 321, n. 8325, p. 619–620, 1983.

DOI: 10.1016/S0140-6736(83)91795-6.

KATO, H.; TAKAHASHI, H.; SANO, K.; NAKAJIMA, H. *Corynebacterium* bacteremia in patients with hematological malignancies and other medical conditions. **Clinical Infection in Practice**, v. 7–8, p. 100040, 2020.

DOI: 10.1016/j.clinpr.2020.100040.

KELLEY, L. A.; MEZULIS, S.; YATES, C. M.; WASS, M. N.; STERNBERG, M. J. E. The Phyre2 web portal for protein modelling, prediction, and analysis. **Nature Protocols**, v. 10, n. 6, p. 845–858, 2015.

DOI: 10.1038/nprot.2015.053.

KELLEY, L. A.; STERNBERG, M. J. E. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. **Nature Protocols**, v. 4, n. 3, p. 363–371, 2009.

DOI: 10.1038/nprot.2009.2.

KIM, S.; OH, D. B.; KWON, O. e KANG, H. A. Identification, and functional characterization of the NanH extracellular sialidase from *Corynebacterium diphtheriae*. **Journal of biochemistry**, v. 147, p. 523–533, 2010.

KIMMITT, P. Toxin Gene Expression by Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*: the Role of Antibiotics and the Bacterial SOS Response. **Emerging Infectious Diseases**, v. 6, n. 5, p. 458–465, 2000.

DOI: 10.3201/eid0605.000503.

KLEE, E. W. e ELLIS, L. B. M. Evaluating eukaryotic secreted protein prediction. **BMC Bioinformatics**, v. 6, p. 256, 2005.

KOITABASHI, T.; VUDDHAKUL, V.; RADU, S.; MORIGAKI, T.; ASAI, N.; NAKAGUCHI, Y. e NISHIBUCHI, M. Genetic characterization of *Escherichia coli* O157: H7/- strains carrying the stx2 gene but not producing Shiga toxin 2. **Microbiology and Immunology**, v. 50, p. 135–148, 2006.

KONRAD, R.; BERGER, A.; HUBER, I.; BOSCHERT, V.; HÖRMANSDORFER, S.; BUSCH, U.; HOGARDT, M.; SCHUBERT, S. e 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.

KORONAKIS, V. e HUGHES, C. Bacterial signal peptide-independent protein export: HlyB-directed secretion of hemolysin. **Semin. Nature Cell Biology**, v. 4, n. 1, p. 7–15, 1993.

KORONAKIS, V.; KORONAKIS, E. e HUGHES, C. Isolation and analysis of the C-terminal signal directing export of *Escherichia coli* hemolysin protein across both bacterial membranes. **The EMBO Journal**, v. 8, n. 2, p. 595–605, 1989.

KORONAKIS, V.; HUGHES, C. Hemolysin. In: DONNENBERG, Michael S. (org.). *Escherichia Coli: Virulence Mechanisms of a Versatile Pathogen*. **University of Maryland School of Medicine**. Baltimore, Maryland: Elsevier, 2002.
DOI: 10.1016/B978-0-12-220751-8.50018-5.

KROGH, A.; LARSSON, B.; VON HEIJNE, G.; SONNHAMMER, E. L. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. Edited by F. Cohen. **Journal of Molecular Biology**, v. 305, n. 3, p. 567–580, 2001.
DOI: 10.1006/jmbi.2000.4315.

KRÜGER, A.; LUCCHESI, P. M. A. Shiga toxins and stx phages: highly diverse entities. **Microbiology**, v. 161, n. 3, p. 451–462, 2015.
DOI: 10.1099/mic.0.000003.

KUDINHA, T. The Pathogenesis of *Escherichia coli* Urinary Tract Infection. In: *Escherichia coli - Recent Advances on Physiology, Pathogenesis and Biotechnological Applications.* InTech, 2017.
DOI: 10.5772/intechopen.69030.

KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547–1549, 2018.
DOI: 10.1093/molbev/msy096.

LAPOINTE, P.; WEI, X. e GARIEPY, J. A role for the protease-sensitive loop region of Shiga-like toxin 1 in the retrotranslocation of its A1 domain from the endoplasmic reticulum lumen. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 23310–23318, 2005.

LECLERCQ, S. Y.; SULLIVAN, M. J.; IPE, D. S.; SMITH, J. P.; CRIPPS, A. W.; ULETT, G. C. Pathogenesis of *Streptococcus* urinary tract infection depends on bacterial strain and β -hemolysin/cytolysin that mediates cytotoxicity, cytokine synthesis, inflammation, and virulence. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 29000, 2016.
DOI: 10.1038/srep29000.

LEE, M. S.; KIM, M. H. e TESH, V. L. Shiga toxins expressed by human pathogenic bacteria induce immune responses in host cells. **Journal of microbiology**, v. 51, n. 6, p. 724–730, 2013.

LEITZ, N.; LEITZ, Z.; SCHALLER, M. Unwanted baggage. **Case Reports**, v. 2013, n. may08 1, p. bcr2013009260–bcr2013009260, 2013.
DOI: 10.1136/bcr-2013-009260.

LING, H.; BOODHOO, A.; HAZES, B.; CUMMINGS, M. D.; ARMSTRONG, G. D.; BRUNTON, J. L.; READ, R. J. Structure of the Shiga-like Toxin I B-Pentamer Complexed with an Analogue of Its Receptor Gb 3, **Biochemistry**, v. 37, n. 7, p. 1777–1788, 1998.

DOI: 10.1021/bi971806n.

LIVAK, K. J. e SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.
DOI: 10.1006/meth.2001.1262.

LU, S.; WANG, J.; CHITSAZ, F.; DERBYSHIRE, M. K.; GEER, R. C.; GONZALES, N. R.; GWADZ, M.; HURWITZ, D. I.; MARCHLER, G. H.; SONG, J. S.; THANKI, N.; YAMASHITA, R. A.; YANG, M.; ZHANG, D.; ZHENG, C.; LANCZYCKI, C. J.; MARCHLER-BAUER, A. CDD/SPARCLE: the conserved domain database in 2020. **Nucleic Acids Research**, v. 48, n. D1, p. D265–D268, 2020.
DOI: 10.1093/nar/gkz991.

MACHADO, T. L. Avaliação dos testes de toxigenicidade na comprovação da real atoxinogenicidade de amostras de *Corynebacterium diphtheriae* isoladas de casos clínicos e portadores. 1989. UFRJ, 1989.

MAGALHÃES, C. A.; ROSSATO, S. S.; BARBOSA, A. S.; SANTOS, T. O.; ELIAS, W. P.; SIRCILI, M. P.; PIAZZA, R. M. F. The ability of haemolysins expressed by atypical enteropathogenic *Escherichia coli* to bind to extracellular matrix components. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 2, p. 146–152, 2011.
DOI: 10.1590/S0074-02762011000200005.

MAIDEN, M. C. J. Multilocus Sequence Typing of Bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 561–588, 2006.
DOI: 10.1146/annurev.micro.59.030804.121325.

MAN, P.; MONTAGNER, C.; VITRAC, H.; KAVAN, D.; PICHARD, S.; GILLET, D.; FOREST, E.; FORGE, V. Accessibility changes within diphtheria toxin T domain when in the functional molten globule state, as determined using hydrogen/deuterium exchange measurements. **FEBS Journal**, v. 277, n. 3, p. 653–662, 2010.
DOI: 10.1111/j.1742-4658.2009.07511.x.

MANDLIK, A.; DAS, A.; TON-THAT, H. The molecular switch that activates the cell wall anchoring step of pilus assembly in gram-positive bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 37, p. 14147–14152, 2008.
DOI: 10.1073/pnas.0806350105.

MARCHLER-BAUER, A.; LU, S.; ANDERSON, J. B.; CHITSAZ, F.; DERBYSHIRE, M. K.; DeWEESE-SCOTT, C.; FONG, J. H.; GEER, L. Y.; GEER, R. C.; GONZALES, N. R.; GWADZ, M.; HURWITZ, D. I.; JACKSON, J. D.; Ke, Z.; LANCZYCKI, C. J.; LU, F.; MARCHLER, G. H.; MULLOKANDOV, M.; OMELCHENKO, M. V.; ROBERTSON, C. L.; SONG, J. S.; THANKI, N.; YAMASHITA, R. A.; ZHANG, D. ZHANG, N.; ZHENG, C. e BRYANT, S. H. CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 39, p. 225–229, 2011

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 Research**, v. 43, n. D1, p. D222–D226, 2015.
DOI: 10.1093/nar/gku1221.

MARTINI, H.; SOETENS, O.; LITT, D.; FRY, N. K.; DETEMMERMAN, L.; WYBO, I.; DESOMBERE, I.; EFSTRATIOU, A.; PIÉRARD, D. Diphtheria in Belgium: 2010–2017.

Journal of Medical Microbiology, v. 68, n. 10, p. 1517–1525, 2019.

DOI: 10.1099/jmm.0.001039.

MATTOS-GUARALDI, A. L.; DAMASCO, P. V.; GOMES, D. L. R.; MELENDEZ, M. G.; SANTOS, L. S.; MARINELLI, R. S.; NAPOLEÃO, F.; SABBADINI, P. S.; SANTOS, C. S.; MOREIRA, L. O.; HIRATA, R. Concurrent diphtheria, and infectious mononucleosis: difficulties for management, investigation, and control of diphtheria in developing countries.

Journal of Medical Microbiology, v. 60, n. 11, p. 1685–1688, 2011.

DOI: 10.1099/jmm.0.027870-0.

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

MATTOS-GUARALDI, A. L. e FORMIGA, L. C. D. *Corynebacterium diphtheriae* e difteróides: ensaios de aderência. **Revista Brasileira de Patologia Clínica**, v. 27, p. 53–60, 1991.

MATTOS-GUARALDI, A. L. e; FORMIGA, L. C. D. Hemagglutination pattern of *Corynebacterium diphtheriae*. **Rev Microbiol**, v. 23, p. 8–12, 1992.

MATTOS-GUARALDI, A. L.; FORMIGA, L. C. D. Agglutination of sheep erythrocytes by *Corynebacterium diphtheriae*. **Brazilian J. Med. Biol. Res**, v. 19, p. 75–77, 1986.

MATTOS-GUARALDI, A. L.; FORMIGA, L. C. D.; PEREIRA, G. A. Cell surface components and adhesinin *Corynebacterium diphtheriae*. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 12, p. 1507–1512, 2000.

DOI: 10.1016/S1286-4579(00)01305-8.

MATTOS-GUARALDI, A. L.; SAMPAIO, J. L. M.; SANTOS, C. S.; PIMENTA, F. P.; PEREIRA, G. A.; PACHECO, L. G. C.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V.; MOREIRA, L. O.; GUTIERREZ, F. L.; COSTA, J. L. F.; COSTA-FILHO, R.; DAMASCO, P. V.; CAMELLO, T. C. F.; HIRATA JR, R. First detection of *Corynebacterium ulcerans* producing a diphtheria-like toxin in a case of human with pulmonary infection in the Rio de Janeiro metropolitan area, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 4, p. 396–400, 2008.

DOI: 10.1590/S0074-02762008000400014.

MATTOS-GUARALDI, A. L.; FORMIGA, L. C. D.; MARQUES, E. A.; PEREIRA, G. A.; MOREIRA, L. O.; PIMENTA, F. P.; CAMELLO, T. C. F.; OLIVEIRA, E. F. Diphtheria in vaccinated adults in Rio de Janeiro, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, n. 3, p. 236–239, 2001.

DOI: 10.1590/S1517-83822001000300015.

MATTOS-GUARALDI, A.; MOREIRA, L. O.; DAMASCO, P. V.; HIRATA JÚNIOR, R. Diphtheria remains a threat to health in the developing world: an overview. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 8, p. 987–993, 2003.

DOI: 10.1590/S0074-02762003000800001.

MATTOS-GUARALDI, A.L.; FORMIGA, L. C. D. Bacteriological properties of a sucrose-fermenting *Corynebacterium diphtheriae* strain isolated from a case of endocarditis. **Current Microbiology**, v. 37, n. 3, p. 156–158, 1998.

DOI: 10.1007/s002849900356.

MATUSSEK, A.; EINEMO, I.; JOGENFORS, A.; LÖFDAHL, S.; LÖFGREN, S. Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Diarrheal Stool of Swedish Children: Evaluation of Polymerase Chain Reaction Screening and Duration of Shiga Toxin Shedding. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**, v. 5, n. 2, p. 147–151, 2016.
DOI: 10.1093/jpids/piv003.

MEINEL, D.M.; KUEHL, R.; ZBINDEN, R.; BOSKOVA, V.; GARZONI, C.; FADINI, D.; DOLINA, M.; BLÜMEL, B.; WEIBEL, T.; TSCHUDIN-SUTTER, S.; WIDMER, A.F.; BIELICKI, J.A.; DIERIG, A.; HEININGER, U.; KONRAD, R.; BERGER, A.; HINIC, V.; GOLDENBERGER, D.; BLAICH, A.; STADLER, T.; BATTEGAY, M.; SING, A.; EGLI, A. Outbreak investigation for toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* wound infections in refugees from Northeast Africa and Syria in Switzerland and Germany by whole genome sequencing. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 12, p. 1003.e1-1003.e8, 2016.
DOI: 10.1016/j.cmi.2016.08.010.

MELKER, H.E.; BERBERS, G.A.M.; NAGELKERKE, N. J. D.; SPAENDONCK; M.A.E.; CONYN-VAN. Diphtheria antitoxin levels in the Netherlands: A population-based study. **Emerging Infectious Diseases**, v. 5, n. 5, p. 694–700, 1999.
DOI: 10.3201/eid0505.990511.

MELTON-CELSA, A. R. e O'BRIEN, A. D. Structure, biology, and relative toxicity of Shiga toxin family members for cells and animals. In: KAPER, J.B.; O'BRIEN, AD. (org.). *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin producing *E. coli* strains. **American Society for Microbiology**, p. 121–128. 1998.

MELTON-CELSA, A. R.; O'BRIEN, A. D. New Therapeutic Developments against Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. **Microbiology Spectrum**, v. 2, n. 5, 2014.
DOI: 10.1128/microbiolspec.EHEC-0013-2013.

MENZEL, S.; RISSIEK, B.; HAAG, F.; GOLDBAUM, F. A.; KOCH-NOLTE, F. The art of blocking ADP-ribosyltransferases (ARTs): Nanobodies as experimental and therapeutic tools to block mammalian and toxin ARTs. **FEBS Journal**, v. 280, n. 15, p. 3543–3550, 2013.
DOI: 10.1111/febs.12313.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Sistema de Informação de Agravos de Notificação – SINAN. Casos confirmados de difteria: Brasil e Grandes Regiões, 1997-2006. 2018.

MÖLLER, J.; SCHORLEMMER, S.; HOFMANN, J.; BURKOVSKI, A. Cellular and Extracellular Proteome of the Animal Pathogen *Corynebacterium silvaticum*, a Close Relative of Zoonotic *Corynebacterium ulcerans* and *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Proteomes**, v. 8, n. 3, p. 19, 2020.
DOI: 10.3390/proteomes8030019.

MOORE, L. S. P.; LESLIE, A.; MELTZER, M.; SANDISON, A.; EFSTRATIOU, A.; SRISKANDAN, S. *Corynebacterium ulcerans* cutaneous diphtheria. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 15, n. 9, p. 1100–1107, 2015.
DOI: 10.1016/S1473-3099(15)00225-X.

MOREIRA, L. O.; ANDRADE, A. F. B.; VALE, M. D.; SOUZA, S. M. S.; HIRATA-JUNIOR, R.; ASAD, L. M. O. B.; 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. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 10, p. 5907–5913, 2003.
DOI: 10.1128/AEM.69.10.5907-5913.2003.

MOREIRA, L. O. Influência da limitação de ferro nas propriedades adesivas de amostras de *Corynebacterium diphtheriae*. 1999. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 1999.

MORIGI, M.; GALBUSERA, M.; GASTOLDI, S.; LOCATELLI, M.; BUELLI, S.; PEZZOTTA, A.; PAGANI, C.; NORIS, M.; GOBBI, M.; STRAVALACI, M.; ROTTOLI, D.; TEDESCO, F.; REMUZZI, G.; ZOJA, C. Alternative Pathway Activation of Complement by Shiga Toxin Promotes Exuberant C3a Formation That Triggers Microvascular Thrombosis. **The Journal of Immunology**, v. 187, n. 1, p. 172–180, 2011.
DOI: 10.4049/jimmunol.1100491.

MOROVA, J.; OSICKA, R.; MASIN, J.; SEBO, P. RTX cytotoxins recognize β 2 integrin receptors through N-linked oligosaccharides. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 14, p. 5355–5360, 2008.
DOI: 10.1073/pnas.0711400105.

MÜHLEN, S. e DERSCH, P. Treatment Strategies for Infections with Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, 2020.
DOI: 10.3389/fcimb.2020.00169.

MURASE, K.; OOKA, T.; IGUCHI, A.; OGURA, Y.; NAKAYAMA, K.; ASADULGHANI, M.; ISLAM, M. R.; HIYOSHI, H.; KODAMA, T.; BEUTIN, L.; HAYASHI, T. Haemolysin E- and enterohaemolysin-derived haemolytic activity of O55/O157 strains and other *Escherichia coli* lineages. **Microbiology**, v. 158, n. 3, p. 746–758, 2012.
DOI: 10.1099/mic.0.054775-0.

MURRAY, P. R. **Manual of clinical microbiology: Coryneform Gram-positive**. 9a edição Washington.

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. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 9, p. e584–e588, 2011.
DOI: 10.1016/j.ijid.2011.04.003.

NAKAO, H.; POPOVIC, T. Development of a direct PCR assay for detection of the diphtheria toxin gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 7, p. 1651–1655, 1997.
DOI: 10.1128/jcm.35.7.1651-1655.1997.

O'LOUGHLIN, E. V. e ROBINS-BROWNE, R. M. Effect of Shiga toxin and Shiga-like toxins on eukaryotic cells. **Microbes and Infection Journal**, v. 3, p. 493–507, 2001.

OKAMOTO, K.; HATAKEYAMA, S.; SUGITA, C.; OGURA, K.; UEDA, R.; KOUUDA, H.; NAKATA, J. Nasal diphtheria (chronic carriage) caused by nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae*. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 24, n. 9, p. 759–762, 2018.
DOI: 10.1016/j.jiac.2018.01.015.

ORAM, D. M.; AVDALOVIC, A.; HOLMES, R. K. Analysis of Genes That Encode DtxR-Like Transcriptional Regulators in Pathogenic and Saprophytic Corynebacterial Species. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 4, p. 1885–1895, 2004.
DOI: 10.1128/IAI.72.4.1885-1895.2004.

ORTH, D.; KHAN, A. B.; NAIM, A.; GRIF, K.; BROCKMEYER, J.; KARCH, H.; JOANNIDIS, M.; CLARK, S.; DAY, A. J.; FIDANZI, S.; STOIBER, H.; DIERICH, M. P.;

ZIMMERHACKL, L. B.; WÜRZNER, R. Shiga Toxin Activates Complement and Binds Factor H: Evidence for an Active Role of Complement in Hemolytic Uremic Syndrome. **The Journal of Immunology**, v. 182, n. 10, p. 6394–6400, 2009.
DOI: 10.4049/jimmunol.0900151.

OSTALAZA, H.; BARTALOME, B.; ORTIZ DE ZARATE, I.; AL., Et. Release of vesicle contents by the bacterial protein toxin α -haemolysin. **Biochim Biophys Acta**, v. 1147, p. 81–88, 1993.

OTSHUDIEMA, J. O.; ACOSTA, A. M.; CASSIDAY, P. K.; HADLER, S. C.; HARIRI, S.; TIWARI, T. S. P. Respiratory Illness Caused by *Corynebacterium diphtheriae* and *C. ulcerans*, and Use of Diphtheria Antitoxin in the United States, 1996–2018. **Clinical Infectious Diseases**, v. 73, n. 9, p. e2799–e2806, 2021.
DOI: 10.1093/cid/ciaa1218.

OTSUJI, K.; FUKUDA, K.; OGAWA, M.; SAITO, M. Mutation and Diversity of Diphtheria Toxin in *Corynebacterium ulcerans*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 25, n. 11, p. 2122–2123, 2019.
DOI: 10.3201/eid2511.181455.

PACHECO, L. G. C.; CASTRO, T. L. P.; CARVALHO, R. D.; MORAES, P. M.; DORELLA, F. A.; CARVALHO, N. B.; SLADE, S. E.; SCRIVENS, J. H.; FEELISCH, M.; MEYER, R.; MIYOSHI, A.; OLIVEIRA, S. C.; DOWSON, C. G.; AZEVEDO, V. A Role for Sigma Factor σE in *Corynebacterium pseudotuberculosis* Resistance to Nitric Oxide/Peroxide Stress. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, 2012.
DOI: 10.3389/fmicb.2012.00126.

PARK, W. H. e WILLIAMS, A. W. The production of diphtheria toxin. **J Exp Med**, v. 1, n. 1, p. 164–185, 1896.

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

PEIXOTO, R. S.; PEREIRA, G. A.; SANTOS, L. S.; ROCHA-DE-SOUZA, C. M.; GOMES, D. L. R.; SANTOS, C. S.; WERNECK, L. M. C.; DIAS, A. A. O.; HIRATA, R.; NAGAO, P. E.; MATTOS-GUARALDI, A. L. Invasion of endothelial cells and arthritogenic potential of endocarditis-associated *Corynebacterium diphtheriae*. **Microbiology**, v. 160, n. 3, p. 537–546, 2014.
DOI: 10.1099/mic.0.069948-0.

PEIXOTO, R. S.; HACKER, E.; ANTUNES, C. A.; WEERASEKERA, D.; DIAS, A. A. O.; MARTINS, C. A.; HIRATA JÚNIOR, R.; SANTOS, K. R. N.; BURKOVSKI, A.; MATTOS-GUARALDI, A. L. Pathogenic properties of a *Corynebacterium diphtheriae* strain isolated from a case of osteomyelitis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 65, n. 11, p. 1311–1321, 2016.
DOI: 10.1099/jmm.0.000362.

PEIXOTO, R. S.; ANTUNES, C. A.; SIMPSON-LOURÊDO, L.; VIANA, V. G.; SANTOS, C. S.; FUENTES, J. R. S.; HIRATA JR., R.; HACKER, E.; MATTOS-GUARALDI, A. L.; BURKOVSKI, A. Functional characterization of the collagen-binding protein DIP2093 and its influence on host–pathogen interaction and arthritogenic potential of *Corynebacterium diphtheriae*. **Microbiology**, v. 163, n. 5, p. 692–701, 2017.

DOI: 10.1099/mic.0.000467.

PEREIRA, G. A.; PIMENTA, F. P.; SANTOS, F. R.; DAMASCO, P. V.; HIRATA JR, R. e MATTOS-GUARALDI, A. L. Antimicrobial resistance among Brazilian *Corynebacterium diphtheriae* strains. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 5, p. 507–510, 2008.

PERSSON, S.; OLSEN, K. E. P.; ETHELBERG, S. e; SCHEUTZ, F. Subtyping method for *Escherichia coli* Shiga toxin (verocytotoxin) 2 variants and correlations to clinical manifestations. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, p. 2020–2024, 2007.

PIMENTA, F. P.; SOUZA, M. C.; PEREIRA, G. A.; HIRATA, R.; CAMELLO, T. C. F.; MATTOS-GUARALDI, A. L. DNase test as a novel approach for the routine screening of *Corynebacterium diphtheriae*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 307–311, 2008.

a.

DOI: 10.1111/j.1472-765X.2007.02310. x.

PIMENTA, F. P.; HIRATA, R.; ROSA, A. C. P.; MILAGRES, L. G.; MATTOS-GUARALDI, A.L. A multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Corynebacterium diphtheriae* and differentiation between non-toxigenic and toxigenic isolates. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, n. 11, p. 1438–1439, 2008. b.

DOI: 10.1099/jmm.0.2008/000414-0.

PIMENTA, F. P.; MATIAS, G. A. M.; PEREIRA, G. A.; CAMELLO, T. C. F.; ALVES, G. B.; ROSA, A. C. P.; HIRATA, R.; MATTOS-GUARALDI, A. L. A PCR for dtxR gene: Application to diagnosis of non-toxigenic and toxigenic *Corynebacterium diphtheriae*.

Molecular and Cellular Probes, v. 22, n. 3, p. 189–192, 2008. c.

DOI: 10.1016/j.mcp.2008.01.001.

PIMENTA, F. Pires; DAMASCO, P. V.; NETO, J. C.; LOPES, G. S.; RAPHAEL, H.; MILAGRES, L. G.; MATTOS-GUARALDI, A. L. Diphtheria-neutralizing antibody levels in healthy adults from Rio de Janeiro, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 4, p. 459–462, 2006.

DOI: 10.1590/S0074-02762006000400019.

POILANE, I.; FAWAZ, F.; NATHANSON, M.; CRUAUD, P.; MARTIN, T.; COLLIGNON, A.; GAUDELUS, J. *Corynebacterium diphtheriae* osteomyelitis in an immunocompetent child: A case report. **European Journal of Pediatrics**, v. 154, n. 5, p. 381–383, 1995.

DOI: 10.1007/BF02072108.

POOLPOL, K.; ORTH-HÖLLER, D.; SPETH, C.; ZIPFEL, P. F.; SKERKA, C.; CÓRDOBA, S. R.; BROCKMEYER, J.; BIELASZEWSKA, M.; WÜRZNER, R. Interaction of Shiga toxin 2 with complement regulators of the factor H protein family. **Molecular Immunology**, v. 58, n. 1, p. 77–84, 2014.

DOI: 10.1016/j.molimm.2013.11.009.

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. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, n. 2, p. 229–235, 2006.

DOI: 10.1099/jmm.0.46135-0.

QUICK, M. L.; SUTTER, R. W.; KOBALDZE, 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 Journal of Infectious Diseases**, v. 181, n. s1, p. S130–S137, 2000.

DOI: 10.1086/315550.

RAHMAN, A; SRIVASTAVA, S. S.; SNEH, A; AHMED, N.; KRISHNASASTRY, M. V. Molecular characterization of tlyA gene product, Rv1694 of *Mycobacterium tuberculosis*: A non-conventional hemolysin and a ribosomal RNA methyl transferase. **BMC Biochemistry**, v. 11, n. 1, p. 35, 2010.

DOI: 10.1186/1471-2091-11-35.

RASMUSSEN, R. Quantification on the LightCycler. In: IN: MEUER S., WITTEW C., Nakagawara, K I. (eds) (org.). Rapid Cycle Real-Time PCR. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, p. 21–34. 2001.

DOI: 10.1007/978-3-642-59524-0_3.

RÖMER, W.; BERLAND, L.; CHAMBON, V.; GAUS, K.; WINDSCHIEGL, B. e; TENZA, D. Shiga toxin induces tubular membrane invaginations for its uptake into cells. **Nature**, v. 450(7170), p. 670–675, 2007.

SABBADINI, P. S.; ASSIS, M. C.; TROST, E.; GOMES, D. L. R.; MOREIRA, L. O.; SANTOS, C. S.; PEREIRA, G. A.; NAGAO, P. E.; AZEVEDO, V. A. C.; HIRATA JÚNIOR, R.; SANTOS, A. L. S.; 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. **Microbial Pathogenesis**, v. 52, n. 3, p. 165–176, 2012.

DOI: 10.1016/j.micpath.2011.12.003.

SABBADINI, P. S.; GENOVEZ, M. R. N.; SILVA, C. F.; ADELINO, T. L. N.; SANTOS, C. S.; PEREIRA, G. A.; NAGAO, P. E.; DIAS, A. A. S. O.; MATTOS-GUARALDI, A. L.; HIRATA JÚNIOR, R. Fibrinogen binds to nontoxicogenic and toxicogenic *Corynebacterium diphtheriae* strains. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 5, p. 706–711, 2010.

DOI: 10.1590/S0074-02762010000500018

SANGAL, V. E. e HOSKISSON, P. A. Corynephages: Infections of the Infectors. In: BURKOVSKI, A. (org.). *Corynebacterium diphtheriae* and Related Toxigenic Species: **Genomics, Pathogenicity and Applications**. v. 9789400776p. 1–293.

DOI: 10.1007/978-94-007-7624-1. 2014

SANGAL, V. E.; FINERAN, P. C.; HOSKISSON, P. A. Novel configurations of type I and II CRISPR–Cas systems in *Corynebacterium diphtheriae*. **Microbiology**, v. 159, n. Pt_10, p. 2118–2126, 2013.

DOI: 10.1099/mic.0.070235-0.

SANGAL, V. E. e HOSKISSON, P. A. Evolution, epidemiology, and diversity of *Corynebacterium diphtheriae*: new perspectives on an old foe. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 43, p. 364–370, 2016.

DOI: 10.1016/j.meegid.2016.06.024.

SANTIS, A.; SICILIANO, R. F.; SAMPAIO, R. O.; AKAMINE, M.; VERONESE, E. T.; ALMEIDA, F. M.; ARAÚJO, M. R. E.; ROSSI, F.; MAGRI, M. M. C.; NASTRI, A. C.; ACCORSI, T. A. D.; ROSA, V. E. E.; TITINGER, D. P.; SPINA, G. S.; TARASOUTCHI, F. Non-toxicogenic *Corynebacterium diphtheriae* infective endocarditis with embolic events: a case report. **BMC Infectious Diseases**, v. 20, n. 1, p. 907, 2020.

DOI: 10.1186/s12879-020-05652-w.

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-JUNIOR, R.; MATTOS-GUARALDI, A. L. Non-opsonic phagocytosis of homologous non-toxicogenic and toxicogenic *Corynebacterium diphtheriae* strains by human U-937 macrophages. **Microbiology and Immunology**, v. 54, n. 1, p. 1–10, 2010.

DOI: 10.1111/j.1348-0421.2009.00179. x.

SANTOS, L. S.; SANT'ANNA, L. O.; RAMOS, J. N.; LADEIRA, E. M.; STAVRACAKIS-PEIXOTO, R.; BORGES, L. L.G.; SANTOS, C. S.; NAPOLEÃO, F.; CAMELLO, T. C.F.; PEREIRA, G. A.; HIRATA, R.; VIEIRA, V. V.; COSME, L. M.S.S.; SABBADINI, P. S.; MATTOS-GUARALDI, A. L. Diphtheria outbreak in Maranhão, Brazil: Microbiological, clinical and epidemiological aspects. **Epidemiology and Infection**, v. 143, n. 4, p. 791–798, 2014.

DOI: 10.1017/S0950268814001241.

SANTOS, L. S.; SANT'ANNA, L. O.; RAMOS, J. N.; LADEIRA, E. M.; STAVRACAKIS-PEIXOTO, R.; BORGES, L. L.G.; SANTOS, C. S.; NAPOLEÃO, F.; CAMELLO, T. C.F.; PEREIRA, G. A.; HIRATA, R.; VIEIRA, V. V.; COSME, L. M.S.S.; SABBADINI, P. S.; MATTOS-GUARALDI, A. L. Diphtheria outbreak in Maranhão, Brazil: Microbiological, clinical and epidemiological aspects. **Epidemiology and Infection**, v. 143, n. 4, p. 791–798, 2014.

DOI: 10.1017/S0950268814001241.

SANTOS, L. S.; ANTUNES, C. A.; OLIVEIRA, D. M.; SANT'ANNA, L. O.; PEREIRA, J. A. A.; HIRATA-JUNIOR, R.; BURKOVSKI, A.; MATTOS-GUARALDI, A. L. Tellurite resistance: a putative pitfall in *Corynebacterium diphtheriae* diagnosis? **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 108, n. 5, p. 1275–1279, 2015. b.

DOI: 10.1007/s10482-015-0558-4.

SAXENA, S. K.; O'BRIEN, A. D. e ACKERMAN, E. J. Shiga toxin, Shiga-like toxin II variant, and ricin are all single-site RNA N-glycosidases of 28S RNA when microinjected into *Xenopus* oocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, p. 596–601, 1989.

SCHEIFER, C.; ROLLAND-DEBORD, C.; BADELL, E.; REIBEL, F.; AUBRY, A.; PERIGNON, A.; PATEY, O.; BRISSE, S.; CAUMES, E. Re-emergence of *Corynebacterium diphtheriae*. **Médecine et Maladies Infectieuses**, v. 49, n. 6, p. 463–466, 2019.

DOI: 10.1016/j.medmal.2018.12.001.

SCHMIDT, H.; BEUTIN, L. e KARCH, H. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. **Infection and Immunity**, v. 63, p. 1055–1061, 1995.

SCHWIDDER, M.; HEINISCH, L.; SCHMIDT, H. Genetics, Toxicity, and Distribution of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Hemolysin. **Toxins**, v. 11, n. 9, p. 502, 2019.

DOI: 10.3390/toxins11090502.

SCULLY, M.; CATALAND, S.; COPPO, P.; RUBIA, J.; FRIEDMAN, K. D.; KREMER HOVINGA, J.; LÄMMLE, B.; MATSUMOTO, M.; PAVENSKI, K.; SADLER, E.; SARODE, R.; WU, H.; GALE, D. FUJIMURA, Y.; MCDONALD, V.; PEYVANDI, F.; SCHARRER, I.; VEYRADIER, A.; WESTWOOD, J. P. Consensus on the standardization of terminology in thrombotic thrombocytopenic purpura and related thrombotic microangiopathies. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 15, n. 2, p. 312–322, 2017.

DOI: 10.1111/jth.13571.

- SEGURA, A.; AUFFRET, P.; BIBBAL, D.; BERTONI, M.; DURAND, A.; JUBELIN, G.; KÉROURÉDAN, M.; BRUGÈRE, H.; BERTIN, Y.; FORANO, E. Factors Involved in the Persistence of a Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157:H7 Strain in Bovine Feces and Gastro-Intestinal Content. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 2018.
DOI: 10.3389/fmicb.2018.00375.
- SEKAR, S. K. R.; VEERARAGHAVAN, B.; ANANDAN, S.; DEVANGA-RAGUPATHI, N. K.; SANGAL, L. e 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.
- SETO, Y.; KOMIYA, T.; IWAKI, M.; KOHDA, T.; UKAMOTO, M.; TAKAHASHI, M. e KOZAKI, S. Properties of coryneophage attachment site and molecular epidemiology of *Corynebacterium ulcerans* isolated from humans and animals in Japan. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 61, p. 116–122, 2008.
- SHANMUGAM, L.; PRIYADARSHI, K.; KUMARESAN, M.; SIVARADJY, M.; UPADHYAY, P.; ELAMURUGAN, T.P.; SASTRY, A. S. A Rare Case Report of Non-toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* Bloodstream Infection in an Uncontrolled Diabetic with Peripheral Vascular Disease. **Cureus**, n. May, p. 0–7, 2021.
DOI: 10.7759/cureus.14947.
- SHARMA, N. C.; EFSTRATIOU, A.; MOKROUSOV, I.; MUTREJA, A.; DAS, B.; RAMAMURTHY, T. Diphtheria. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 5, n. 1, p. 81, 2019.
DOI: 10.1038/s41572-019-0131-y.
- SHIGA, K. Ueber den Dysenterie-bacillus (*Bacillus dysenteriae*). **Zentralbl Bakteriolog Orig**, v. 24, p. 913–918, 1898.
- SIEVERS, F.; WILM, A.; DINEEN, D.; GIBSON, T. J.; KARPLUS, K.; LI, W.; LOPEZ, R.; MCWILLIAM, H.; REMMERT, M.; SÖDING, J.; THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Molecular Systems Biology**, v. 7, n. 1, p. 539, 2011.
DOI: 10.1038/msb.2011.75.
- SILBERGLEIT, M.; VASQUEZ, A. A.; MILLER, C. J.; SUN, J.; KATO, I. Oral, and intestinal bacterial exotoxins: Potential linked to carcinogenesis. In: *Progress in Molecular Biology and Translational Science*.: Elsevier Inc., v. 171p. 131–193. 2020.
DOI: 10.1016/bs.pmbts.2020.02.004.
- 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. S. V.; HIRATA, 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, n. 2, p. 343–352, 2014.
DOI: 10.1007/s10482-013-0080-5.
- SIMPSON-LOURÊDO, L.; SILVA, C. M. F.; HACKER, E.; SOUZA, N. F.; SANTANA, M. M.; ANTUNES, C. A.; NAGAO, P. E.; HIRATA, R.; BURKOVSKI, A.; VILLAS-BÔAS, M. H. S.; MATTOS-GUARALDI, A. L. Detection, and virulence potential of a phospholipase D-negative *Corynebacterium ulcerans* from a concurrent diphtheria and infectious mononucleosis case. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 112, n. 7, p. 1055–1065, 2019.
DOI: 10.1007/s10482-019-01240-4.
- SMITH, H. The haemolysins of *Escherichia coli*. **The Journal of pathology and bacteriology**, v. 85, p. 197–211, 1963.

SMITH, H. W. e HALLS, S. The transmissible nature of the genetic factor in *Escherichia coli* that controls haemolysin production. **Microbiology Society Journals**, v. 47, n. 1, p. 153–161, 1967.

SOARES, S. C.; ABREU, V. A. C.; RAMOS, R. T. J.; CERDEIRA, L.; SILVA, A.; BAUMBACH, J.; TROST, E.; TAUCH, A.; HIRATA, R.; MATTOS-GUARALDI, A. L.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V. PIPS: Pathogenicity Island Prediction Software. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, p. e30848, 2012.
DOI: 10.1371/journal.pone.0030848.

STEIN, P. E.; BOODHOO, A.; TYRRELL, G. J.; BRUNTON, J. L.; READ, R. J. Crystal structure of the cell-binding B oligomer of verotoxin-1 from *E. coli*. **Nature**, v. 355, n. 6362, p. 748–750, 1992.
DOI: 10.1038/355748a0.

STEPANOVIĆ, S.; VUKOVIĆ, D.; DAKIĆ, I.; SAVIĆ, B.; ŠVABIĆ-VLAHOVIĆ, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 40, n. 2, p. 175–179, 2000.
DOI: 10.1016/S0167-7012(00)00122-6.

SUARDANA, I. W.; PINATHI, K. J. P.; WIDIASIH, D. A.; ARTAMA, W. T.; ASMARA, W.; DARYONO, B. S. Regulatory elements of stx2 gene and the expression level of Shiga-like toxin 2 in *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 51, n. 1, p. 132–140, 2018.
DOI: 10.1016/j.jmii.2016.04.006.

SUNARNO, S.; FITRI, N. PUSPANDARI, N.; SARIADJI, K. The dtxR Gene: A New Alternative Marker to Identify *Corynebacterium ulcerans* and *Corynebacterium pseudotuberculosis* by PCR Assay. **The Indonesian Biomedical Journal**, v. 10, n. 3, p. 236–42, 2018.
DOI: 10.18585/inabj.v10i3.403.

TORRES, L. C.; FÁTIMA, R. D.; HIRATA, R.; PACHECO, L. G. C.; SOUZA, M. C.; SANTOS, L. S.; SANTOS, C. S.; SALAH, M.; COSTA, M. M.; GARCIA, R. M.; SELIM, S. A.; AZEVEDO, V. A.; 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. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 3, p. 272–279, 2013.
DOI: 10.1590/0074-0276108032013003

TRABULSI, L. R. E ALTERTHUM, F. *Corynebacterium diphtheriae* e outras espécies do gênero. In: ALTERTHUM, Flávio (org.). **Microbiologia**. 6a. ed.: EDITORA ATHENEU LTDA, p. 920. 2015

TROST, E.; AL-DILAIMI, A.; PAPAVALIOU, P.; SCHNEIDER, J.; VIEHOEVER, P.; BURKOVSKI, A.; SOARES, S. C.; ALMEIDA, S. S.; DORELLA, F. A.; MIYOSHI, A.; AZEVEDO, V.; SCHNEIDER, M. A. P.; SILVA, A.; SANTOS, C. S.; SANTOS, L. S.; SABBADINI, P.; DIAS, A. A.; HIRATA, R.; MATTOS-GUARALDI, A. L.; TAUCH, A. Comparative analysis of two complete *Corynebacterium ulcerans* genomes and detection of candidate virulence factors. **BMC Genomics**, v. 12, n. 1, p. 383, 2011.
DOI: 10.1186/1471-2164-12-383.

TROST, E.; BLOM, J.; SOARES, S.; 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, 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. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 12, p. 3199–3215, 2012.
DOI: 10.1128/JB.00183-12.

TRUELOVE, S. A.; KEEGAN, L. T.; MOSS, W. J.; CHAISSON, L. H.; MACHER, E.; AZMAN, A. S.; LESSLER, J. Clinical and Epidemiological Aspects of Diphtheria: A Systematic Review and Pooled Analysis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 71, n. 1, p. 89–97, 2020.
DOI: 10.1093/cid/ciz808.

TUITE, ASHLEIGH R.; THOMAS-BACHLI, A.; ACOSTA, H.; BHATIA, D.; HUBER, C.; PETRASEK, K.; WATTS, A.; YONG, J. H. E.; BOGOCH, I. I.; KHAN, K. Infectious disease implications of large-scale migration of Venezuelan nationals. **Journal of Travel Medicine**, v. 25, n. 1, p. 1–8, 2018.
DOI: 10.1093/jtm/tay077.

VANDENESCH, F.; LINA, G.; HENRY, T. *Staphylococcus aureus* Hemolysins, bi-component Leukocidins, and Cytolytic Peptides: A Redundant Arsenal of Membrane-Damaging Virulence Factors? **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, 2012.
DOI: 10.3389/fcimb.2012.00012.

VIEIRA, V. V.; RAMOS, J. N.; SANTOS, L. S.; MATTOS-GUARALDI, A. L. *Corynebacterium*: Molecular Typing and Pathogenesis of *Corynebacterium diphtheriae* and Zoonotic Diphtheria Toxin-Producing *Corynebacterium* Species. In: IVANO DE FILIPPIS (org.). **Molecular Typing in Bacterial Infections**. 2 ed.: Springer Nature, p. 3–32. 2022.

VIGUETTI, S. Z.; PACHECO, L. G. C.; SANTOS, L. S.; SOARES, S. C.; BOLT, F.; BALDWIN, A.; DOWSON, C. G.; ROSSO, M. L.; GUIISO, N.; MIYOSHI, A.; HIRATA, R.; MATTOS-GUARALDI, A. L.; AZEVEDO, V. Multilocus sequence types of invasive *Corynebacterium diphtheriae* isolated in the Rio de Janeiro urban area, Brazil. **Epidemiology and Infection**, v. 140, n. 4, p. 617–620, 2012.
DOI: 10.1017/S0950268811000963.

VOS, R. A.; MOLLEMA, L.; KERKHOF, J.; VAN DEN KERKHOF, J. H. C. T.; GERSTENBLUTH, I.; JANGA-JANSEN, A. V. A.; STIENSTRA, Y.; MELKER, H. E.; VAN DER KLIS, F. R. M. Risk of Measles and Diphtheria Introduction and Transmission on Bonaire, Caribbean Netherlands, 2018. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 101, n. 1, p. 237–241, 2019.
DOI: 10.4269/ajtmh.18-0824.

WAGNER, J.; IGNATIUS, R.; VOSS, S.; HÖPFNER, V.; EHLERS, S.; FUNKE, G.; WEBER, U.; HAHN, H. Infection of the Skin Caused by *Corynebacterium ulcerans* and Mimicking Classical Cutaneous Diphtheria. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, n. 9, p. 1598–1600, 2001.
DOI: 10.1086/322969.

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. **Epidemiology and Infection**, v. 138, n. 11, p. 1519–1530, 2010. a.
DOI: 10.1017/S0950268810001895.

WAGNER, K. S.; WHITE, J. M.; LUCENKO, I.; MERCER, D.; CROWCROFT, N. S.; NEAL, S.; EFSTRATIOU, A. Diphtheria in the Post epidemic Period, Europe, 2000–2009. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 2, p. 217–225, 2012.
DOI: 10.3201/eid1802.110987.

WAGNER, P. L.; LIVNY, J.; NEELY, M. N.; ACHESON, D. W. K.; FRIEDMAN, D. I.; WALDOR, M. K. Bacteriophage control of Shiga toxin 1 production and release by *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 957–970, 2002.
DOI: 10.1046/j.1365-2958.2002.02950.x.

WAGNER, P. L.; WALDOR, M. K. Bacteriophage Control of Bacterial Virulence. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 8, p. 3985–3993, 2002.
DOI: 10.1128/IAI.70.8.3985-3993.2002.

WAGNER, W.; VOGEL, M. e GOEBEL, W. Transport of hemolysin across the outer membrane of *Escherichia coli* requires two functions. **Journal of Bacteriology**, v. 154, n. 1, p. 200–210, 1983.

WALSH, M. J.; DODD, J. E.; HAUTBERGUE, G. M. Ribosome-inactivating proteins. **Virulence**, v. 4, n. 8, p. 774–784, 2013.
DOI: 10.4161/viru.26399.

WEERASEKERA, D.; MÖLLER, J.; KRANER, M. Edmund; ANTUNES, C.; MATTOS-GUARALDI, A. L.; BURKOVSKI, A. Beyond diphtheria toxin: cytotoxic proteins of *Corynebacterium ulcerans* and *Corynebacterium diphtheriae*. **Microbiology**, v. 165, n. 8, p. 876–890, 2019.
DOI: 10.1099/mic.0.000820.

WELLINGHAUSEN, N.; SING, A.; KERN, W. V.; PERNER, S.; MARRE, R.; RENTSCHLER, J. A fatal case of necrotizing sinusitis due to toxigenic *Corynebacterium ulcerans*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 292, n. 1, p. 59–63, 2002.
DOI: 10.1078/1438-4221-00186.

WELLS, T. J.; HENDERSON, I. R. Type 1 and 5 secretion systems and associated toxins. In: *Escherichia coli*. Second Edi ed.: Elsevier, p. 499–532. 2013.
DOI: 10.1016/B978-0-12-397048-0.00016-4.

YANG, K.; KRUSE, R. L.; LIN, W. V.; MUSER, D. M. Corynebacteria as a cause of pulmonary infection: a case series and literature review. **Pneumonia**, v. 10, n. 1, p. 10, 2018.
DOI: 10.1186/s41479-018-0054-5.

YASUDA, I.; MATSUYAMA, H.; ISHIFUJI, T.; YAMASHITA, Y.; TAKAKI, M.; MORIMOTO, K.; SEKINO, M.; YANAGIHARA, K.; FUJII, T.; IWAKI, M.; YAMAMOTO, A.; ARIYOSHI, K.; TANAKA, T. Severe Pneumonia Caused by Toxigenic *Corynebacterium ulcerans* Infection, Japan. **Emerging Infectious Diseases**, v. 24, n. 3, p. 588–591, 2018.
DOI: 10.3201/eid2403.171837.

YASUMURA, Y. e KAWAKITA, Y. Studies on SV40 in tissue culture: preliminary step for cancer research in vitro. *Nihon Rinsho*, v. 21, p. 1201–1215, 1963.

ZADRAVEC, P.; MAREČKOVÁ, L.; PETROKOVÁ, H.; HODNIK, V.; PERIŠIĆ NANUT, M.; ANDERLUH, G.; ŠTRUKELJ, B.; MALÝ, P.; BERLEC, A. Development of Recombinant *Lactococcus lactis* Displaying Albumin-Binding Domain Variants against Shiga Toxin 1 B Subunit. **PLOS ONE**, v. 11, n. 9, p. e0162625, 2016.
DOI: 10.1371/journal.pone.0162625.

ZASADA, A. A.; MOSIEJ, E. Contemporary microbiology and identification of *Corynebacteria* spp. causing infections in human. **Letters in Applied Microbiology**, v. 66, n. 6, p. 472–483, 2018.
DOI: 10.1111/lam.12883.

ZASADA, A. A.; ZALESKA, M.; PODLASIN, R. B.; SEFERYŃSKA, I. The first case of septicemia due to nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae* in Poland: case report. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 4, n. 1, p. 8, 2005.
DOI: 10.1186/1476-0711-4-8.

APÊNDICE – Códigos de acesso ao genoma das amostras utilizadas no banco de dados públicos GenBank/NCBI – 2022

| Amostra | Código | Amostra | Código |
|---|----------------------|---|-------------------|
| <i>Corynebacterium diphtheriae</i> | | <i>Corynebacterium rouxii</i> | |
| NCTC13129 | BX248357.1 | FRC0190 | NZ_LR738855.1 |
| HC01 | NC_016786.1 | <i>Corynebacterium occultum</i> | |
| HC02 | NC_016802.1 | 2039 | NZ_CP046455.1 |
| HC03 | NC_016787.1 | <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> | |
| HC04 | NC_016788.1 | 316 | NC_016932.2 |
| INCA 402 | NC_016783.1 | <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> | |
| VA01 | NC_016790.1 | DSM 20632 | NZ_LT629700.1 |
| TR241 | NC_016782.1 | <i>Corynebacterium striatum</i> | |
| 31 A | NC_016799.1 | 815 | DACRXP010000027.1 |
| PW8 | NC_016789.1 | <i>Escherichia coli</i> | |
| BH8 (INCA 814) | NC_016800.1 | O5:H -97 | WP_001365506.1 |
| ATCC 27010 | CP003210.1 | SLT-1A | GI:134536 |
| ATCC 27012/ C7 | CP003210.1 | SLT-2A | GI:93760 |
| CDC-E8392 | NC_016785.1 | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | |
| <i>C. diphtheriae</i> subespécie <i>lausannense</i> | | H37Rv | NC_000962.3 |
| CMCNS703 | MSBS01000042.1 | <i>Shigella dysenteriae</i> | |
| CMCNS2995 | LT990688.1 | HNCMB 20080 | NZ_CP061529.1 |
| <i>Corynebacterium belfantii</i> | | <i>Staphylococcus aureus</i> | |
| 2937 | OWN37895.1 | SA 201501 | JAJNOK010000238.1 |
| 01-16 | NZ_JADQUD010000022.1 | | |
| <i>Corynebacterium ulcerans</i> | | | |
| 809 | NC_017317.1 | | |

ANEXO A - Comitê de Ética



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

ANEXO B – Artigos publicados em periódicos

Antonie van Leeuwenhoek
<https://doi.org/10.1007/s10482-019-01265-9>



ORIGINAL PAPER

Virulence potential of *Corynebacterium striatum* towards *Caenorhabditis elegans*

Cassius de Souza · Liliâne Simpson-Louredo · Higor Franceschi Mota · Yuri Vieira Faria · Felipe de Oliveira Cabral · Sabrina dos Santos Colodette · Maria E. Freire Castro Canellas · Andrezza do Espírito Santo Cucinelli · Maria das Graças de Luna · Cintia da Silva Santos · Lilian de Oliveira Moreira · Ana Luíza Mattos-Guaraldi

Received: 29 January 2019 / Accepted: 10 April 2019
 © Springer Nature Switzerland AG 2019

Abstract *Corynebacterium striatum* strains have been increasingly reported as etiological agents of nosocomial infections and outbreaks in industrialized and developing countries. However, there are few studies focused on the virulence potential of *C. striatum*. A growing body of research supports the use of *Caenorhabditis elegans* as a model host for investigating the virulence potential of pathogenic bacteria, including corynebacteria. In the present study, chemotaxis behaviour, mortality, and morphological changes were investigated in nematodes infected by four *C. striatum* strains isolated from different clinical sites, and with different MDR profiles and PFGE types. The results showed chemotaxis of nematodes towards *C. striatum*. Nematode death (> 60%) was detected from the first day post-infection with all strains tested, but at different levels, independent of biofilm formation on catheter surfaces

and differences in growth temperature between nematodes (20 °C) and mammals (37 °C). *C. striatum* 2369/II multidrug-resistant (MDR; from tracheal aspirate of a patient undergoing endotracheal intubation) and 1961/III multidrug-sensitive (MDS; urine) strains led to 100% mortality in worms. Survival of nematodes was observed until 4 days post-infection with the *C. striatum* 1954/IV MDS strain isolated from a surgical wound (13%) and 1987/I MDR strain isolated from a patient with a lower respiratory tract infection (39%). The Dar phenotype was observed post-infection with all MDS and MDR strains except 1954/IV. All strains showed the capacity for bagging formation. Star formation was observed only with strains that led to 100% nematode mortality. In conclusion, *C. striatum* was found to exert virulence for *C. elegans*. Variations in nematode morphological changes and levels of mortality indicate differences in the virulence potential of *C. striatum* independent of

C. Souza · H. F. Mota · Y. V. Faria · F. O. Cabral · S. S. Colodette · M. E. F. C. Canellas · A. E. S. Cucinelli · M. G. Luna · C. S. Santos · A. L. Mattos-Guaraldi (✉)
 Laboratory of Diphtheria and Corynebacteria of Clinical Relevance, The Collaborating Centre for Reference and Research on Diphtheria/National Health Foundation/Ministry of Health - PNS/MS, Brazil- LDCC/FCM/ UERJ, Faculty of Medical Sciences, State University of Rio de Janeiro – UERJ, Av. 28 de Setembro, 87 - Fundos, 3º andar, Vila Isabel, Rio de Janeiro, RJ CEP 20551-030, Brazil
 e-mail: aguaraldi@gmail.com

L. Simpson-Louredo
 National Institute of Control and Quality in Health - Oswaldo Cruz Foundation, INCQS, Av. Brasil, 4365 - Mangueiras, Rio de Janeiro, RJ CEP 21040-900, Brazil


L. O. Moreira
 Faculty of Pharmacy of Federal University of Rio de Janeiro, UFRJ, Av. Carlos Chagas Filho, 373 - Cidade Universitária, Rio de Janeiro, RJ CEP 21941-170, Brazil

Published online: 04 May 2019

Springer

Bacterial and Fungal Pathogenesis - Research Paper |
Published: 16 February 2022

Insights of OxyR role in mechanisms of host–pathogen interaction of *Corynebacterium diphtheriae*

[Elisabete Alves Cappelli](#), [Andrezza do Espírito Santo Cucinelli](#), [Liliane Simpson-Louredo](#), [Maria Eurydice Freire Canellas](#), [Camila Azevedo Antunes](#), [Andreas Burkovski](#), [Jemima Fuentes Ribeiro da Silva](#), [Ana Luíza Mattos-Guaraldi](#), [Alessandra Mattos Saliba](#) & [Louisy Sanches dos Santos](#) 

[Brazilian Journal of Microbiology](#) (2022)

141 Accesses | 1 Altmetric | [Metrics](#)

Abstract

Corynebacterium diphtheriae, the leading causing agent of diphtheria, has been increasingly related to invasive diseases, including sepsis, endocarditis, pneumonia, and osteomyelitis. Oxidative stress defense is required not only for successful growth and survival under environmental conditions but also in the regulation of virulence mechanisms of human pathogenic species, by promoting mucosal colonization, survival, dissemination, and defense against the innate immune system. OxyR, functioning as a negative and/or positive transcriptional regulator, has been included among



ScienceDirect

Microbes and Infection

Available online 13 May 2022, 105001

In Press, Journal Pre-proof

Original article

Virulence potential of the first *Corynebacterium mycetoides* strain isolated from human urine: a rare species of *Corynebacterium*

Lincoln de Oliveira Sant'Anna ^a, Elisabete Alves Cappelli ^a, Max Roberto Batista Araújo ^b, Juliana Nunes Ramos ^c, Liliâne Simpson-Lourêdo ^c, Andrezza do Espírito Santo Cucinelli ^c, Paulo Victor Pereira Baio ^d, Verônica Viana Vieira ^d, Louisy Sanches dos Santos ^a, Ana Luíza Mattos-Guaraldi ^a

^a Laboratory of Diphtheria and Corynebacteria of Clinical Relevance, Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, State University of Rio de Janeiro, Av. 28 de Setembro, 87, Fundos, 3º andar, Vila Isabel, 20551-030, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^b Hermes Pardini Institute, Av. das Nações, 2448, Santo Antônio, 33200-000, Vespasiano, MG, Brazil

^c Army Chemical and Pharmaceutical Laboratory, Ministry of Defense, R. Licínio Cardoso, 96, São Francisco Xavier, 20960-015, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^d Interdisciplinary Laboratory of Medical Research, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Av. Brasil, 4365, Mangueiras, 21040-360, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Received 9 November 2021, Revised 4 May 2022, Accepted 6 May 2022, Available online 13 May 2022.

Show less ^

Share Cite

<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2022.105001>

Get rights and content

Abstract

For many years, the potential pathogenic of non-diphtheriae corynebacteria were underestimated. Nowadays, a growing number of *Corynebacterium* species are recognized as opportunistic agents of human infections, mainly in hospital settings. In addition, multidrug-resistant *Corynebacterium* isolates from clinical specimens, have been reported and the role of *Corynebacterium* spp. in urinary tract infections (UTIs) has been highlighted. Several studies have reported *Corynebacterium* species as the agent of UTIs especially in patients with risk factors. Thus, the present work aimed to report the first isolation of *Corynebacterium mycetoides*

ANEXO C – Capítulos de livro

I CONBRAGEM
I CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA MULTIDISCIPLINAR

CAPÍTULO 21

ABCESSO INTRATONSILAR CAUSADO POR Corynebacterium diphtheriae NÃO PRODUTORA DE TOXINA DIFTÉRICA CONFIRMADO POR PCR MULTIPLEX: RELATO DE CASO E REVISÃO DA LITERATURA SOBRE INFECÇÕES ATÍPICAS CAUSADAS POR AGENTES PATOGÊNICOS DA DIFTERIA

INTRATONSILLAR ABSCESS CAUSED NON-DIPHThERIA TOXIN PRODUCING Corynebacterium diphtheriae CONFIRMED BY MULTIPLEX PCR: CASE REPORT AND LITERATURE REVIEW OF ATYPICAL INFECTIONS CAUSED BY DIPHTHERIA PATHOGENS

Andreza do Espírito Santo Cucinelli#

State University of Rio de Janeiro, Laboratory of Diphtheria and Corynebacteria of Clinical Relevance, Rio de Janeiro-RJ
<http://lattes.cnpq.br/6918848605710038>

Elisabete Alves Cappelli#

State University of Rio de Janeiro, Laboratory of Diphtheria and Corynebacteria of Clinical Relevance, Rio de Janeiro-RJ
<http://lattes.cnpq.br/7398599068520311>

Brunna Santoro Garcia

State University of Rio de Janeiro, Laboratory of Diphtheria and Corynebacteria of Clinical Relevance, Rio de Janeiro-RJ
<http://lattes.cnpq.br/4610169759131997>

Camilla de Oliveira Maia

State University of Rio de Janeiro, Laboratory of Diphtheria and Corynebacteria of Clinical Relevance, Rio de Janeiro-RJ
<http://lattes.cnpq.br/3622970894882457>

Cassius de Souza

State University of Rio de Janeiro, Laboratory of Diphtheria and Corynebacteria of Clinical Relevance, Rio de Janeiro-RJ

DOENÇAS REEMERGENTES E VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA: FATORES QUE FAVORECEM NOVAS EPIDEMIAS NO CONTEXTO DA COVID-19 NO BRASIL

Andrezza do Espírito Santo Cucinelli

INTRODUÇÃO

Apesar do desenvolvimento tecnológico e suas consequências para a saúde, as epidemias ainda se fazem presentes. Nas últimas décadas, algumas epidemias foram ocasionadas pelos coronavírus, culminando na atual COVID-19, uma pandemia de proporções alarmantes, principalmente pela taxa de transmissão e amplo alcance geográfico do vírus.

É importante observar que o aparecimento de novas doenças costuma ganhar destaque, por não possuírem medidas farmacológicas para minimizar seus efeitos. Assim, concentram esforços econômicos, políticos, sociais e de saúde. Entretanto, quando a epidemia se abrande, os investimentos também diminuem, já que muitas vezes os interesses das indústrias farmacêuticas não convergem com os interesses de saúde pública. Diversas são as causas que levam ao ressurgimento de doenças até então controladas, mas a falta de investimentos em vigilância epidemiológica precisa ser discutida pelas autoridades em saúde pública.

O objetivo deste ensaio foi apresentar quatro fatores que, associados às consequências da pandemia de COVID-19, potencializam o ressurgimento de doenças infecciosas, até então controladas por vacinação, no Brasil. Bem como, sugerir medidas de vigilância epidemio-

ANEXO D – Aprovação em concurso

DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO - Seção 3

ISSN 1677-7009

Nº 118, sexta-feira, 25 de junho de 2021

das Propostas a partir de 15/06/2021 às 09:00 no site www.gov.br/compras. Abertura das Propostas: 07/07/2021 às 14:00 no site www.gov.br/compras. Informações Gerais: -

ARMAR MUNIZ DE MENDONÇA MARI
Pregoeira

[SASSISnet - 24/06/2021] 154153-15146-2021S000001

ANEXO DE LICITAÇÃO
PREÇO ELETRÔNICO Nº 03/2021 - UASG 531312

Nº Processo: 2307021095/202118. Objeto: Aquisição de produtos para atender ao Serviço de Farmácia - MEDICAMENTOS CURSOS DIVERSAS. Total de Itens Limitados: 83. Edital: 25/08/2021 das 09:00 às 12:00 e das 14:00 às 17:00. Endereço: Av. Brigadeiro Trompovsky 578, 3ª Et. do Funic. Cidade Universitária - Rio de Janeiro/RJ ou <https://www.gov.br/compras/licita/7112152-5-00003-2021>. Sítio das Propostas a partir de 15/06/2021 às 09:00 no site www.gov.br/compras. Abertura das Propostas: 12/07/2021 às 10:00 no site www.gov.br/compras. Informações Gerais: -

BARBARA SOARES AVANCO
Pregoeira

[SASSISnet - 24/06/2021] 154153-15146-2021S000001

INSTITUTO DE BIOLOGIA

EDITAL Nº 584, DE 23 DE JUNHO DE 2021
RESULTADO DO PROCESSO SELETIVO DO EDITAL Nº 413/2021

O Diretor do Instituto de Biologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, no uso de suas atribuições, resolve:

Art. 1º: Tornar público o resultado do processo seletivo aberto para contratação de Professor Substituto do Instituto de Biologia/Departamento de Genética, Área BIODIVERSIDADE, referente ao Edital nº 413 de 27 de maio de 2021, publicado no DOU nº 100 de 28 de maio de 2021.

| NOME | Situação |
|----------------------------|-------------|
| Elisa Beatriz Freitas | APROVADO 1ª |
| Gulherme Caldas de Andrade | APROVADO 2ª |
| Alviny Rosendo Neto | APROVADO 3ª |
| Fabiana Silva de Sousa | APROVADO 4ª |

SÉRGIO BONICIOR

EDITAL Nº 587, DE 23 DE JUNHO DE 2021
RESULTADO DO PROCESSO SELETIVO DO EDITAL Nº 413/2021

O Diretor do Instituto de Biologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, no uso de suas atribuições, resolve:

Art. 1º: Tornar público o resultado do processo seletivo aberto para contratação de Professor Substituto do Instituto de Biologia/Departamento de Genética, Área GENÉTICA GERAL, referente ao Edital nº 413 de 27 de maio de 2021, publicado no DOU nº 100 de 28 de maio de 2021.

| NOME | Situação |
|-------------------------------|-------------|
| Gabriela Coelho Binda | APROVADO 1ª |
| Tatiane de Sousa Rodrigues | APROVADO 2ª |
| Gabriel Adriano Cipolla | APROVADO 3ª |
| Pedro Rodrigues Souza da Cruz | APROVADO 4ª |
| Ricardo Micolino | APROVADO 5ª |

SÉRGIO BONICIOR

PRÓ-REITORIA DE GESTÃO E GOVERNANÇA

EXTRATO DE TERMO ADITIVO Nº 2/2021 - UASG 531315 - UFRJ

Número do Contrato: 312/2019.
Nº Processo: 24079.05035/2019-84.
Dispensa: Nº 242/2019. Contratante: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO. Contratado: 71.060.999/0001-75 - FUNDAÇÃO COORDENAÇÃO DE PROJETOS, PESQUISAS E ESTUDOS TI. Objeto: Prorrogação do prazo de execução, objeto do termo de contrato nº 312/2019 de 22 de julho de 2021 para 12 de julho de 2022, mantidas as mesmas condições pactuadas. Vigência: 12/07/2021 a 12/07/2022. Valor Total Atualizado do Contrato: R\$ 1.000.000,00. Data de Assinatura: 18/06/2021.

[COMPRASNET 4.0 - 24/06/2021]

RETIFICAÇÃO

NO EXTRATO DE TERMO ADITIVO Nº 0000/2020
Publicado no DO de 2020-01-25, Seção 3. Onde se lê Valor Total: R\$542.898,81. Leia-se: Valor Total: R\$ 540.856,00.

[COMPRASNET 4.0 - 24/06/2021]

SUPERINTENDÊNCIA GERAL DE PATRIMÔNIO
DIVISÃO DE CONTRATOS FUNDACIONAIS

EXTRATO DE CONTRATO

CONTRATO Nº 240/2021 - UASG 531315. Nº Processo: 24079.02087/2021-21. Contratante: Thales De Brazil Cardtes e Soluções de Tecnologia LTDA. CNPJ Contratado: 40.450.789/0001-26. Contratado: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO - UFRJ. CNPJ Contratado: 31.860.888/0001-16. Objeto: Serviços Técnicos em Equipamentos de Certificação Digital Padrão ICP-Brasil. Fundamento Legal: Lei 8.966/1994, Art. 24, inciso III. Vigência: de 01/06/2021 a 02/10/2022. Data de Assinatura: 02/06/2021.

EXTRATO DE ACORDO DE COOPERAÇÃO - UASG 531315

Nº Processo: 24079.2218252020-27 - Termo de Cooperação Nº 5900.011685.2018. Partícipes: SIMOCHEM PETROLIO BRASILEIRA S.A., CNPJ 06.871.406/0001-26 com sede na Cidade do Rio de Janeiro/RJ, e UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO (UFRJ), CNPJ 31.860.888/0001-16; Intermediária: FUNDAÇÃO COORDENAÇÃO DE PROJETOS, PESQUISAS E ESTUDOS TECNOLÓGICOS (COPPETEC), CNPJ: 72.060.999/0001-75. Objeto: Infrá estrutura Simoche - RJ 20186. Fundamento Legal: Lei 92.973/2004, Art. 9º. Data de Assinatura: 24/04/2021.

EXTRATO DE TERMO DE COOPERAÇÃO Nº 5900.011685.2018 - UASG 531315

Nº Processo: 24079.2218252020-01 - Termo de Cooperação Nº 5900.011685.2018. Partícipes: PETROLIO BRASILEIRO S.A. (PETROBRAS), CNPJ 33.000.333/0001-01 com sede na Cidade do Rio de Janeiro/RJ, e UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO (UFRJ), CNPJ 31.860.888/0001-16; Intermediária: FUNDAÇÃO COORDENAÇÃO DE PROJETOS, PESQUISAS E ESTUDOS TECNOLÓGICOS (COPPETEC), CNPJ: 72.060.999/0001-75. Objeto: "Relações estruturais e análise estrutural não-linear da deformação tectônica em análogos de reservatórios sedimentares pouco consolidados aflorantes na região de Lagoa (RJ) área próxima da foz da baía portuguesa. Fundamento Legal: Lei 92.973/2004, Art. 9º. Data de Assinatura: 09/06/2021.

EXTRATO DE CONTRATO

CONTRATO Nº 239/2021 - UASG 531315. Nº Processo: 24079.302096/2021-08. Contratante: Thales De Brazil Cardtes e Soluções de Tecnologia LTDA. CNPJ Contratado: 01.384614/0001-96. Contratado: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO - UFRJ. CNPJ Contratado: 31.860.888/0001-16. Objeto: Serviços Técnicos em Equipamentos de Certificação Digital Padrão ICP-Brasil. Fundamento Legal: Lei 8.966/1994, Art. 24, inciso III. Vigência: de 04/06/2021 a 04/08/2021. Data de Assinatura: 04/06/2021.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDONÓPOLIS

EXTRATO DE CONTRATO Nº 34251/2021 - UASG 159677 - UFR

Nº Processo: 20108.014840/2020-21. Inelegibilidade Nº 1/2021. Contratante: UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDONÓPOLIS. Contratado: 34.032.216/0016-90 - EMPRESA BRASILEIRA DE CORREIOS E TELEGRAMAS. Objeto: Contratação de produtos e serviços por meio de pacote de serviços dos correios mediante adesão ao termo de condições comerciais e anexos, quando contratados serviços específicos, que permite a compra de produtos e utilização dos diversos serviços dos correios por meio dos canais de atendimento disponibilizados. Fundamento Legal: Lei 8.666/1994 - Artigo 25. Vigência: 01/01/2021 a 01/01/2026. Valor Total: R\$ 2.454,56. Data de Assinatura: 24/05/2021.

[COMPRASNET 4.0 - 24/06/2021]

EXTRATO DE CONTRATO Nº 30083/2021 - UASG 159677 - UFR

Nº Processo: 20108.014840/2020-21. Inelegibilidade Nº 1/2021. Contratante: UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDONÓPOLIS. Contratado: 34.032.216/0016-90 - EMPRESA BRASILEIRA DE CORREIOS E TELEGRAMAS. Objeto: Contratação de produtos e serviços por meio de pacote de serviços dos correios mediante adesão ao termo de condições comerciais e anexos, quando contratados serviços específicos, que permite a compra de produtos e utilização dos diversos serviços dos correios por meio dos canais de atendimento disponibilizados. Fundamento Legal: Lei 8.666/1994. Vigência: 26/04/2021 a 26/04/2026. Valor Total: R\$ 12.554,15. Data de Assinatura: 26/04/2021.

[COMPRASNET 4.0 - 24/06/2021]

EDITAL Nº 7, DE 18 DE JUNHO DE 2021

HOMOLOGAÇÃO DE PROCESSO SELETIVO SIMPLIFICADO DE PROVAS PARA LIDERANÇA DE PROFESSOR SUBSTITUTO

A Universidade Federal de Rondonópolis, por meio do Curso de Medicina e nos termos que dispõe o Edital de abertura de processo seletivo de 20 de maio de 2021, publicado no DO.UFRR, de 26/05/2021, seção 4, página 08, resolve:

I - Homologar o processo seletivo simplificado de provas para contratação de Professor Substituto, conforme a seguir:

Candidato: Dr. João Leonardo Katsuyama Junior; Área de Conhecimento: Genética e Obstetrícia; Resultado: Aprovado; Classificação: 1ª lugar. Candidato (a): Claudio Mario Lopez; Área de Conhecimento: Genética e Obstetrícia; Resultado: Classificado; Classificação: 2ª lugar.

II - A vigência contratual obedecerá ao período de necessidade temporária de excepcional interesse público que fundamenta o Edital legal do respectivo contrato;

III - Havendo classificação habilitada desde seletivo poderá ocorrer o aproveitamento do candidato como Professor Substituto em Temporário;

IV - O prazo de validade deste edital será de 01 (um) ano a partir da data de assinatura do presente contrato;

V - Este Edital entra em vigor na data de sua publicação.

JOÃO GABRIEL GUIMARÃES LIZ

Coordenador do Curso de Medicina

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

EDITAL Nº 84, DE 28 JUNHO DE 2021

RESULTADO DO PROCESSO SELETIVO SIMPLIFICADO PARA PROFESSOR SUBSTITUTO

O REITOR DA UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO, no uso

de suas atribuições que lhe confere o Art.º, inciso XVI, do Regimento Geral, resolve

divulgar o resultado do Processo Seletivo Simplificado para Professor Substituto,

promovido por esta Universidade, tendo sido classificados os candidatos abaixo

relacionados:

| INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SAÚDE | |
|--|-----------------------------------|
| DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS | |
| Edital nº 27 de 28 de MAIO de 2021, DOU de 03/05/2021, Seção 3, página 07. | |
| Processo nº 31884.011518/2021-68 | |
| Área: Diagnóstico Clínico e Laboratorial / ICC | |
| DIAS | CANDIDATO |
| 2ª | GUILA DINIZ DA SILVA FERRETI |
| 2ª | ANDREZA DO ESPRITO SANTO CUOBELLI |
| 3ª | MARINA CARLETO CAMARGO AGUIAR |
| 4ª | MARLEIA AMAREL GOMES SOARES |

ROBERTO DE SOUZA RODRIGUES

ANEXO E – Prêmios e Câmeras técnicas





SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
CONSELHO REGIONAL DE FARMÁCIA DO
ESTADO DO RIO DE JANEIRO - CRF-RJ

PORTARIA Nº 1311/2021

Ementa: Institui Grupo Técnico de Trabalho de Análises Clínicas e nomeia seus integrantes.

CONSIDERANDO o princípio da publicidade e transparência a ser observado por este Conselho de Fiscalização profissional;

CONSIDERANDO a decisão tomada na 1238ª Reunião de Diretoria, realizada no dia dezessete de maio de dois mil e vinte e um;

A PRESIDENTE DO CONSELHO REGIONAL DE FARMÁCIA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO – CRF-RJ, no uso de suas atribuições legais,

DECIDE:

Artigo 1º - Instituir Grupo Técnico de Trabalho de Análises Clínicas do CRF-RJ, com mandato até 31 de dezembro de 2021;

Artigo 2º - Nomear os seguintes integrantes para compor o Grupo Técnico:

- Brunna Santoro Garcia – coordenadora - CRF-RJ: 7486
- Alex Gomes de Freitas - CRF-RJ: 12561
- Andrezza do Espírito Santo Cucinelli - CRF-RJ: 12645
- José Francisco Silva Júnior - CRF-RJ: 3885
- Rebecca Maria Maciel Gabriel - CRF-RJ: 6173
- Tania Maria Lemos Mouço - CRF-RJ: 3032

Artigo 3º - Esta Portaria entra em vigor na data de sua assinatura.

Rio de Janeiro, 19 de maio de 2021.

Tania Maria Lemos Mouço
Presidente

ANEXO F – Participação em bancas de graduação

INSTITUTO FEDERAL DO RIO DE JANEIRO – IFRJ
Campus Realengo – Curso de Bacharelado em Farmácia

**DECLARAÇÃO DE PARTICIPAÇÃO EM BANCA DE
 TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO (TCC)**

Declara-se, para todos os fins, que Andrezza do Espírito Santo Cucinelli participou como membro titular da banca de defesa do Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) intitulado: “AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA EM AMOSTRAS DE *Staphylococcus epidermidis* E *Staphylococcus haemolyticus* ISOLADAS DE HEMOCULTURA” de autoria de **Emanuelle Pessanha dos Santos**, aluna do curso de GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA do IFRJ/Campus Realengo.

**INSTITUTO FEDERAL DE
 EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA**

Rio de Janeiro, 17 de Dezembro de 2018.



Hélia Pinheiro Rodrigues Corrêa
 (Diretora de Ensino)
 Hélia Pinheiro Rodrigues Corrêa
 DIRETORA DE ENSINO
 IFRJ-Campus Realengo
 SIAPE: 1691140



Elisa Suzana Carneiro Pôças
 Diretora Geral do Campus Realengo - IFRJ
 SIAPE 1545949



Itallo Collopy Júnior
 Matrícula 1589563
 Coord. do Curso de Grad. em Farmácia
 Campus Realengo - IFRJ


INSTITUTO FEDERAL DO RIO DE JANEIRO – IFRJ
 Campus Realengo – Curso de Bacharelado em Farmácia

DECLARAÇÃO DE PARTICIPAÇÃO EM BANCA DE
 TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO (TCC)

Declara-se, para todos os fins, que Andrezza do Espírito Santo Cucinelli participou como membro titular da banca de defesa do Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) intitulado “Colonização nasal por *Staphylococcus aureus* em graduandos da área da saúde: uma breve revisão da literatura.” de autoria de **Bruna Vidal da Silva**, aluna do curso de GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA do IFRJ/Campus Realengo.

INSTITUTO FEDERAL DE
 EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Rio de Janeiro, 13 de dezembro de 2019.


 Hélia Pinheiro Rodrigues Corrêa
 (Diretora de Ensino)

Hélia Pinheiro Rodrigues Corrêa
 Diretora Adjunta de Ensino CREAL - IFRJ
 SIAPE 1891140


 Elisa Suzana Carneiro Pôças
 (Diretora Geral)

Elisa Suzana Carneiro Pôças
 Diretora Geral do Campus Realengo - IFRJ
 SIAPE 1545849


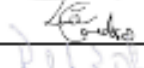
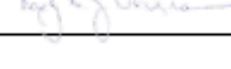


 Itallo Collopy Júnior
 (Coordenador do curso de Farmácia)

Itallo Collopy Júnior
 Matrícula 1586663
 Coord. do Curso de Grad. em Farmácia
 Campus Realengo - IFRJ

ANEXO 5

ATA DE DEFESA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aos vinte e dois dias do mês de dezembro de 2020, realizou-se em sala virtual do Google Meet a defesa do Trabalho de Conclusão de Curso da aluna BEATRIZ DA SILVA MOTTA, intitulado: “**EXPRESSÃO GÊNICA DA ENZIMA UREASE EM CEPAS DE *Sporothrix brasiliensis***”. Os trabalhos foram iniciados às 16h pelo orientador, presidente da Banca Examinadora, na presença dos demais membros. Após a apresentação do TCC aos componentes da Banca Examinadora, com comentários e/ou questionamentos, a banca deu seu parecer final sobre a apresentação, tendo atribuído as notas registradas no quadro abaixo.

| Membros da Banca Examinadora | | Nota | Rubrica |
|------------------------------|--------------------------------------|---|---|
| Orientador Interno | Débora Leandro Rama Gomes | 10 |  |
| Orientador Externo | Luã Cardoso de Oliveira | 10 |  |
| Orientador Externo | Rosely Maria Zancopé Oliveira | 10 |  |
| Membro 1 | Marcos de Abreu Almeida | 10 | |
| Membro 2 | Andrezza do Espírito Santo Cucinelli | 10 |  |
| MÉDIA FINAL | | Parecer Final | |
| 10 (dez) | | <input checked="" type="checkbox"/> Aprovação. <input type="checkbox"/> Aprovação condicionada a modificações. <input type="checkbox"/> Reprovação. | |

OBSERVAÇÕES: _____

Novo título do TCC, quando pertinente:

ANEXO G – Participação em congressos nacionais e internacionais



Se otorga el presente certificado a:

Andrezza Do Espirito Santo Cucinelli (autor), Elisabete Alves Cappelli, Louisy Sanches Dos Santos, Camila Azevedo Antunes, Dulanthi Weerasekera, Cintia Silva Dos Santos, Cassius De Souza, Liliane Simpson-Louredo, Cecilia Maria Ferreira Silva, Yuri Vieira Faria, Vanilda Gonçalves Viana, Geisica Lugão Lacerda, Débora Leandro Rama Gomes, Andreas Burkovski, Alessandra Mattos Saliba, Raphael Hirata Júnior, Ana Luíza Mattos - Guaraldi

Por haber participado como expositor en el XXIV Congreso Latinoamericano de Microbiología 2018 realizado del 13 al 16 de Noviembre de 2018, Santiago, Chile.

Presentando el trabajo titulado:

Investigação da presença e expressão de genes codificadores de toxina Shiga-like em cepas de Corynebacterium diphtheriae

Dra. Claudia Saavedra
Presidenta
Comité Organizador ALAM 2018

Dr. Renato Chavez
Comité Organizador
ALAM 2018





30^o
CONGRESSO
BRASILEIRO DE
MICROBIOLOGIA
de 06 a 09 de outubro de 2019
Maceió - Alagoas

30^o CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado INVESTIGATION OF THE PRESENCE AND EXPRESSION OF SHIGA-LIKE TOXIN ENCODING GENES IN CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE STRAINS com a autoria de: CUCINELLI, A. E. S, CAPELLI, E. A, SANTOS, L. S, CANELLAS-CASTRO, M. E. F, SOUZA, C., LYDIO, R. L, OLIVEIRA, R. C., GOMES, D. L. R. , SALIBA, A. M., MATTOS-GUARALDI, A. L1 foi apresentado na forma de pôster durante o 30^o Congresso Brasileiro de Microbiologia realizado no Centro Cultural e de Exposições Ruth Cardoso, na cidade de Maceió, AL, no período de 6 a 9 de outubro de 2019.



Carlos Pelleschi Taborda
Presidente



Jorge Luiz Mello Sampaio
1^o Secretário

De 06 a 09 de Outubro de 2019 - Centro Cultural e de Exposições Ruth Cardoso - Maceió - Al

Eventos Satélites
ONE HEALTH
1^o ENCONTRO BRASILEIRO SOBRE ESPOROTRICOSE HUMANA E FELINA
DO ISHAM WORKING GROUP ON SPOROTRICHOSIS

Organização
e Realização:



SBM Sociedade Brasileira de Microbiologia

Patrocínio:



BD



FAPESP



CAPES



CNPq
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico



31
Congresso
Brasileiro de
Microbiologia

De 22 a 24 de Outubro de 2021

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado ISOLATION OF CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE AND CORYNEBACTERIUM ULCERANS FROM CLINICAL SPECIMENS IN BRAZIL: AN ALERT TO BRAZILIAN PUBLIC HEALTH com a autoria de: ARAUJO, M.R.B., SANT'ANNA, L.O., SANTANA, G.S., CUCINELLI, A.E.S., MATTOS-GUARALDI, A. L., SANTOS, L.S. foi aceito para publicação nos Anais do 31º Congresso Brasileiro de Microbiologia realizado online no período de 22 a 24 de outubro de 2021.

ISSN número 2176-414X



Gustavo Henrique Goldman
PRESIDENTE



Waldir Pereira Elias Junior
1º SECRETÁRIO

DE 22 A 24 DE OUTUBRO DE 2021 - EVENTO 100% ONLINE

Realização  SBM

Patrocínio



 FAPESP 60

Control  lab
Lado a lado com você

SIMPÓSIO
CRFRJ
2021

CERTIFICADO

Certificamos que

Dra. Andreza do Espírito Santo Cucinelli

Participou como Palestrante no **Simpósio CRF-RJ 2021: Impactos, Perspectivas e Desafios para o Futuro da Profissão Farmacêutica** realizado de modo *online* pelo Conselho Regional de Farmácia do Estado do Rio de Janeiro, nos dias 27 e 28 de novembro de 2021, com carga horária total de 12 (doze) horas.

Rio de Janeiro, 28 de Novembro de 2021

Tania Maria Lemos Mouço
PRESIDENTE

Silvania Maria Carlos França
VICE-PRESIDENTE

Ricardo Lahora Soares
SECRETÁRIO GERAL

Carla Patrícia de Moraes e Coura
TESOUREIRA

REALIZAÇÃO



A autenticidade deste documento pode ser verificada através da URL: <http://sgce.crf-rj.org.br:8102/validar/EF0030112FF96C208CE49E044CD6BE2A>

ANEXO H – Prática Docente

**DECLARAÇÃO**

Declaro para os devidos fins que a farmacêutica **ANDREZZA DO ESPÍRITO SANTO CUCINELLI**, CPF nº 103.060.587-40, proferiu palestra sobre o tema "A Rotina do Laboratório Clínico" para a disciplina "Microbiologia e Imunologia Clínica" do Curso de Bacharelado em Farmácia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro – *Campus Realengo* nos períodos letivos 2019.1 e 2019.2.

Rio de Janeiro, 10 de dezembro de 2019.



Profª Drª Débora Leandro Rama Gomes
E-mail: debora.gomes@ifrrj.edu.br
IFRJ - *Campus Realengo*
SIAPE: 1667528



UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins, que **ANDREZZA DO ESPIRITO SANTO CUCINELLI**, servidora do Hospital Universitário Antônio Pedro, à convite do professor Thiago Pavoni Gomes Chagas, do Departamento de Patologia, ministrou a aula intitulada "CONTROLE DE QUALIDADE NO SETOR DE IMUNOLOGIA" na disciplina MPT00082 – Controle de Qualidade em Laboratório Clínico, na data de 05 de novembro de 2020, com carga horária total de 2 horas.

Niterói, 05 de novembro de 2020.



Prof.ª Dra. Analúcia Rampazzo Xavier
Chefe do Departamento de
Patologia - MPT
Mat. 81411-10001

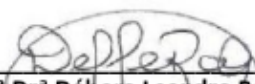
Analúcia Rampazzo Xavier
Chefe do Departamento de Patologia



DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que a farmacêutica **ANDREZZA DO ESPÍRITO SANTO CUCINELLI**, CPF nº 103.060.587-40, proferiu palestra sobre o tema “A Rotina do Laboratório Clínico” para a disciplina “Microbiologia e Imunologia Clínica” do Curso de Bacharelado em Farmácia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro – *Campus Realengo* nos períodos letivos 2021.1 e 2021.2.

Rio de Janeiro, 20 de dezembro de 2021.



Profª Drª Débora Leandro Rama Gomes
E-mail: debora.gomes@ifrj.edu.br
IFRJ - *Campus Realengo*
SIAPE: 1667528



UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins, que a Professora **ANDREZZA DO ESPIRITO SANTO CUCINELLI**, do Hospital Universitário Antônio Pedro, convidada pelo professor Thiago Pavoni Gomes Chagas, do Departamento de Patologia, ministrou aulas na disciplina **MPT00082 – Controle de Qualidade em Laboratório Clínico**, nas datas de 25/03/2021 e 08/04/2021, de 2 horas cada, totalizando uma carga horária de **4 horas**.

Niterói, 26 de abril de 2021.



Enoi Aparecida Guedes Vilar
Chefe do Departamento de Patologia
(Decana)



DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que **Andreza do Espírito Santo Cucinelli**, portadora do CPF nº 103.060.587-40, fez parte de nosso quadro de corpo docente na grade curricular do Curso Técnico de Análises Clínicas desde abril de 2021 até abril de 2022, com carga horária de 06 horas semanais. Durante este período ministrou aulas nas disciplinas de Imunologia, Virologia, Hematologia, Imunohematologia, Biologia Celular e Molecular, Urinálise e Bioquímica Clínica.

Niterói, 03 de junho de 2022.

Patrícia Cunha Vasconcellos de Freitas

Diretora

Reg.030.DS.51981.110.0010.117

Patrícia C. V. de Freitas
Diretora
Reg. 030.DS.51981.110.0010.1117

10.536.433/0001-10

KSV ESCOLA TÉCNICA LTDA-ME

Al. São Basaventura, 51A101

Fonseca - CEP 24138-005

Niterói - RJ



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
DISCIPLINA DE MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA
Av. 28 de Setembro, 87 - fundos, 3º andar. Microbiologia
CEP: 20551-030. Endereço: hirata@uerj.br
Tel: (021) 2868-8280. Fax: 2868-8376

Rio de Janeiro, 13 de junho de 2018.

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins, que a discente Andrezza do Espírito Santo Cucinelli, ministrou aulas na Disciplina de Microbiologia e Imunologia, sobre os temas: "Genética de Microorganismos: Fluxo de Informação em Células Bacterianas", com carga horária total de 4 horas teóricas e "Reações Antígenos-Anticorpos e sua aplicação em Imunoensaios" para a turma de Odontologia, em 22 de maio e 12 de junho de 2018, respectivamente.


Raphael Hirata Junior
Prof. Associado DIMI-FCM-UERJ
Matr. 32.660-3
DIMI/FCM/UERJ



Certificado

Certificamos que **Andrezza do Espírito Santo Cucinelli** participou como palestrante da Sessão Científica com o Tema: **Controle de Qualidade e Biossegurança no Setor Laboratorial** promovida pela Liga Acadêmica de Análises Clínicas - LAAAC do curso de **Biomedicina da UNEF|FAN**, realizado no dia 20 de abril de 2021 com a carga horária de 2 horas.

Emanuela Avelar Silva Costa

Coordenadora do curso de graduação em
Biomedicina na UneffFan



Emanuelle de Santana dos Santos

Presidente da Liga Acadêmica de
Análises Clínicas da UneffFan



DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que a docente **Andreza do Espirito Santo Cucinelli**, CPF no 103.060.587-40, ministrou o curso “Capacitação em Hemoterapia – Banco de Sangue” em Maio de 2022, totalizando 12 horas, distribuídas em 06 encontros presenciais de 02 horas de duração/cada, nesta instituição.

Declaramos também que em Julho será emitido certificado do curso ministrado.

Niterói, 24 de Maio de 2022.

Atenciosamente,

Andreza do Espirito Santo Cucinelli
RG 26.429.754-9

DIREÇÃO
CapacitarLab EIRELI-ME
CNPJ 20.729.344/0001-43

CAPACITARLAB EIRELI-ME
CNPJ: 20.729.344/0001-43

WHATSAPP: (21) 97600-8492 / (21) 99610-1044
admcapacitarlab@hotmail.com
www.facebook.com/capacitarlab



DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que a docente **Andrezza do Espirito Santo Cucinelli**, CPF no 103.060.587-40, ministrou o curso “Capacitação em Hemoterapia – Banco de Sangue” em Junho de 2022, totalizando 12 horas, distribuídas em 06 encontros presenciais de 02 horas de duração/cada, nesta instituição.

Declaramos também que em Julho será emitido certificado do curso ministrado.

Niterói, 10 de Junho de 2022.

Atenciosamente,

Briza do Silva Melo
R/S 26.485.844-9

DIREÇÃO

CapacitarLab EIRELI-ME
CNPJ 20.729.344/0001-43

CAPACITARLAB EIRELI-ME
CNPJ 20.729.344/0001-43

WHATSAPP: (21) 97600-8492 / (21) 99610-1044
atendimento@capacitarlab@hotmail.com
www.facebook.com/capacitarlab



UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins, que **ANDREZZA DO ESPÍRITO SANTO CUCINELLI**, servidora do Hospital Universitário Antônio Pedro, à convite do professor Thiago Pavoni Gomes Chagas, do Departamento de Patologia, ministrou a aula intitulada "CONTROLE DE QUALIDADE NO SETOR DE IMUNOLOGIA" na disciplina MPT00082 – Controle de Qualidade em Laboratório Clínico, na data de 09 de dezembro de 2021 e 06 de janeiro de 2022, com carga horária total de 4 horas (2 horas cada aula).

Niterói, 21 de janeiro de 2022.

RAIANE CARDOSO
CHAMON
raianechamon@id.u
ff.br:12017843792

Assinado de forma digital por
RAIANE CARDOSO CHAMON
raianechamon@id.u.uff.br:1201
7843792
Dados: 2022.01.21 08:36:19
-03'00'

Professora Raiane Cardoso Chamon
Chefe do Departamento de Patologia