Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Adriane de Lacerda Nery

Modelo experimental de alvéolo pulmonar *in vitro* utilizado para demonstrar a habilidade de interaçãocelular e citotoxicidade de amostras de *Corynebacterium diphtheriae* e *Corynebacterium ulcerans*

Rio de Janeiro

2023

Adriane de Lacerda Nery

Modelo experimental de alvéolo pulmonar *in vitro* utilizado para demonstrar a habilidade de interaçãocelular e citotoxicidade de amostras de *Corynebacterium diphtheriae* e *Corynebacterium ulcerans*

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

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

Coorientadora: Prof.ª Dr.ª Louisy Sanches dos Santos Sant'Anna

Rio de Janeiro

2023

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

N456 Nery, Adriane de Lacerda.
Modelo experimental de alvéolo pulmonar *in vitro* utilizado para demonstrar a habilidade de interação celular e citotoxicidade de amostras de *Corynebacterium diphtheriae* e *Corynebacterium ulcerans* / Adriane de Lacerda Nery. - 2023.
99 f.

Orientadora: Prof.ª Dra. Ana Luiza de Mattos-Guaraldi
Coorientadora: Prof.ª Dra. Louisy Sanches dos Santos Sant'Anna

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

1. Técnicas *in vitro* – Instrumentação – Teses. 2. Alvéolos pulmonares – Fisiologia. 3. *Corynebacterium diphtheriae* – Citologia – Teses. I. Mattos-Guaraldi, Ana Luiza de. II. Sant'Anna, Louisy Sanches dos Santos. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 579.86

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

Adriane de Lacerda Nery

Modelo experimental de alvéolo pulmonar *in vitro* utilizado para demonstrar a habilidade de interaçãocelular e citotoxicidade de amostras de *Corynebacterium diphtheriae* e *Corynebacterium ulcerans*

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

Aprovada em 22 de dezembro de 2023

Coorientadora: Prof.ª Dra. Louisy Sanches dos Santos Sant'Anna
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Banca Examinadora:

_____
Prof.ª Dra. Ana Luíza de Mattos-Guaraldi (Orientadora)
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

_____
Prof. Dr. José Augusto Adler Pereira
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

_____
Prof. Dr. Lincoln de Oliveira Sant'Anna
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

_____
Prof.ª Dra. Cíntia Silva dos Santos
Instituto Municipal de Vigilância Sanitária, Vigilância de Zoonoses e Inspeção Agropecuária

_____
Prof. Dr. Helvécio Cardoso Corrêa Póvoa
Universidade Federal Fluminense

Rio de Janeiro

2023

DEDICATÓRIA

À minha família.

À professora Maria Aparecida e colegas da escola multisseriada da área rural na cidade de Santa Luzia, BA, 1981.

Ao saudoso Prof Raphael Hirata Jr (*in memória*).

AGRADECIMENTOS

A gradeço a Deus por me guiar e me abençoar com a realização de um grande sonho.

À minha família, meus pais Orlando e Lúcia, minha irmã Alessandra, pelo apoio e comprenção da minha missão.

Aos meus orientadores Prof. Dr. Raphael Hirata Jr (*in memória*), Profª. Drª. Ana Luísa de Mattos Guaraldi e Profª. Drª. Louisy Sanches dos Santos Sant'Anna por compartilhar ensinamentos e confiança a mim depositada. Ao Professor José Augusto Adler Pereira por apoiar e fazer parte desta etapa da minha vida. Aos professores do Programa de Pós-graduação de Microbiologia Médica Humana pelos ensinamentos compartilhados. Aos colaboradores e colegas do Laboratório de Difteria e Corinebácterias de Importância Clínica – LDCIC (Lab 03).

À secretária Carla Verônica, aos técnicos do departamento pelo apoio administrativo e acadêmico.

Agradeço as instituições de apoio financeiro, CAPES, CNPq, FAPERJ e SR2-UERJ.

Deus tem um plano, em cada criatura
Aos astros, Ele dá um céu
A cada rio, Ele dá um leito
E um caminho para mim traçou
A minha vida eu entrego a Deus
Pois o Seu Filho o entregou por mim
Não importa onde for
Seguirei meu Senhor
Sobre terra ou mar
Aonde Deus mandar, irei
Em Seu querer
Encontro paz na vida
E bênçãos que já mais gozei
Embora venham lutas e tristezas
Tenho fé que Deus me guiará
A minha vida eu entrego a Deus
Pois o Seu Filho o entregou por mim
Não importa onde for
Seguirei meu Senhor
Sobre terra ou mar
Aonde Deus mandar, irei

(Bo Backer, Dick Backer, tradução Joan Sutton)

RESUMO

NERY, Adriane de Lacerda. **Modelo experimental de alvéolo pulmonar *in vitro* utilizado para demonstrar a habilidade de interação celular e citotoxicidade de amostras de *Corynebacterium diphtheriae* e *Corynebacterium ulcerans*.** 2023. 99 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

O presente estudo teve como objetivo a padronização de modelo experimental de alvéolo pulmonar humano realizado *in vitro* para a investigação da habilidade e interação de amostras de *Corynebacterium diphtheriae* e *Corynebacterium ulcerans* de origens diversas (n=6), correlacionando esta habilidade com as propriedades adesivas bacterianas às superfícies abióticas e formação de *slime*. Nos ensaios realizados com o modelo de alvéolo pulmonar *in vitro,* pneumócitos tipo II de linhagem A-549 e macrófagos pulmonares de linhagem U-937 foram cultivadas em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) contendo 50 µg/ml de fungizona e gentamicina e 10% de soro fetal bovino. A formação de monocamadas de células U-937 foi induzida pela adição de 0.25 ng/ml de PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate). Nas monocamadas em co-cultivos, pneumócitos (1×10^4 cel/ml) e macrófagos (5×10^5 cel/ml) foram depositados em orifícios de placas de poliestireno (24 poços) contendo lamínulas de vidro. A leitura foi realizada em diferentes tempos de infecção. Os resultados demonstraram que os experimentos utilizando o modelo alveolar *in vitro* podem ser empregados como metodologia eficaz para os estudos de mecanismos patogenicidade de *C. diphtheriae* e *C. ulcerans* uma vez que todas as amostras estudas foram capazes de interagir com as monocamadas de linhagem celulares em co-cultivo de pneumócitos tipo II A-549 com macrófagos pulmonares U-937. Os patógenos apresentaram diferenças quanto a capacidade de aderência bacteriana às células pulmonares, e do número de pneumócitos e macrófagos lesados em co-cultivos quando comparadas com células cultivadas individualmente. As amostras *C. diphtheriae* e *C. ulcerans* apresentaram diferentes padrões de virulência, sendo a propriedade de interação com alvéolo pulmonar caracterizada como amostra-dependente. As amostras foram classificadas quanto à intensidade de virulência aos tecidos pulmonares: V-I: *C. diphtheriae* TR-241 > V-II: *C. ulcerans* 809 > V-III: *C. diphtheriae* INCA-402 > V-IV: *C. ulcerans* 2590 > V-V: *C. ulcerans* BR-AD22 > *C. diphtheriae* CDC-E8392. A heterogeneidade da capacidade de interagir com macrófagos pulmonares de linhagem U-937 e pneumócitos tipo II de linhagem A-549 foi independente da habilidade de produção de biofilme na superfície hidrofílica do vidro e hidrofóbica do poliestireno, além da ausência da produção de *slime* em meio vermelho do Congo pelas amostras de *C. diphtheriae* e *C. ulcerans*. Entretanto, a propriedades de superfície bacteriana relacionada com a metabolização de sacarose e a produção de toxina Shiga-like parecem contribuir para o aumento da virulência das amostras nos tecidos pulmonares. Deste modo, pesquisas futuras adicionais serão realizadas empregando o modelo alveolar *in vitro*, na investigação de fatores de virulência envolvidos nestes processos infecciosos.

Palavras-chave: modelo alveolar *in vitro*; macrófagos U-937; pneumócitos tipo II A-549; *C. diphtheriae*; *C. ulcerans*.

ABSTRACT

NERY, Adriane de Lacerda. ***In vitro* pulmonary alveolar experimental model used to demonstrate the cellular interaction and cytotoxicity of *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans* samples**. 99 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

The presente study aimed to standardize an experimental model of human lung auveolus performed *in vitro* to investigate the ability and interaction of *C. dipphtheriae* and *C. ulcerans* samples from different origins (n=6), correlating this ability with bacterial adhesive properties to abiotic surfaces. In the tests carried out with the *in vitro* pulmonar alveolus model, type II pneumocytes of the A-549 lineage and pulmonary macrophagesof the U-937 lineage were cultured in Dulbecco's modified Eagle's médium (DMEM) containing 50 µg/ml of fugizone and gentamicin and 10% fetal bovine sérum. The formation of monolayers of U-937 cells was induced by the addition of 0.25 ng/ml de PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate). In the monolayers in co-cultures, pneumocytes (1×10^4 cel/ml) and macrophages (5×10^5 cel/ml) were deposited in holes of polystyrene plates (24 wells) containing glass coverslips. The readingwas performed at different times of infection. The results demonstrated that the experiments using the in vitro alveolar model can be used as an effective methodologyfor the study of pathogenicity mecanisms of *C. diphtheriae* and *C. ulcerans* since all the studied samples were capable of interacting with the cell lineage monolayers in co-culture of type II pneumocytes A-549 with pulmonary macrophages U-937. The pathogenes showed differences in terms of bacterial adherence to lung cells, and the numberof injured pneumocytes and macrophages in co-cultures when compared with cells cultured individually. *C. diphtheriae* and *C. ulcerans* samples showed different patterns of virulence, with the propertyof interaction with the pulmonary alveoçus being characterized as sample-dependet. Sampleswere classified according to the intensity of virulence to lung tissues: V-I: *C. diphtheriae* TR-241 > V-II: *C. ulcerans* 809 > V-III: *C. diphtheriae* INCA-402 > V-IV: *C. ulcerans* 2590 > V-V: *C. ulcerans* BR-AD22 > *C. diphtheriae* CDC-E8392. The heterogeneity of the ability to interact with pulmonary macrophages of the U-937 lineage and type II pneumocytes of the A-549 lineage was independent of the ability to produce biofilm on the hydrophilic surface of glass and the hydrophobic surface of polystyrene, in addition to the absence of slime production in medium Congo red for C. diphtheriae and C. ulcerans samples. However, bacterial surface properties related to sucrose metabolism and Shiga-like toxin production seem to contribute to increased virulence of samples in lung tissues. Thus, additional future research will be carried out using the in vitro alveolar model, in the investigation of virulence factors involved in these infectious processes.

Keywords: *in vitro* alveolar model; U-937 macrophages; Type II pneumocytes A-549; *C. diphtheriae*; *C. ulcerans*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Microfotografias de pacientes com difteria respiratória e cutânea..... 20

Figura 2- Perfis de aderência expressos por amostras de *Corynebacterium diphtheriae* em células de linhagem HEp-2..... 32

Figura 3- Casos de infecções das vias respiratórias inferiores ocorridos no Brasil no ano 2021..... 37

Figura 4- Padrão de aderência bacteriana..... 47

Figura 5- Controles de células epiteliais de linhagem A-549 (ATCC/CCL-185) observadas por microscopia óptica em diferentes tempos de formação de monocamadas..... 51

Figura 6- Controle de monocamadas de células de linhagem U-937 (ATCC CRL-1593.2) oriundas de linfoma histiocítico humano, visualizadas por microscopia óptica..... 52

Figura 7- Modelo de alvéolo pulmonar in vitro empregando co-cultivos de pneumócitos da linhagem A-549 (ATCC/CCL-185) e macrófagos pulmonares da linhagem U-937 (ATCC CRL-1593.2) 53

Figura 8- Interação de amostras de *Corynebacterium* potencialmente produtoras de toxina diftérica com células epiteliais de linhagem A-549 (ATCC/CCL-185) observadas por microscopia óptica em diferentes temos de infecção..... 54

Figura 9- Fotomicrografias dos aspectos morfológicos e semiquantitativos dos mecanismos de interação com monocamadas de pneumócitos da linhagem A-549 de amostras de *Corynebacterium diphtheriae* e *Corynebacterium ulcerans* observadas por microscopia ótica em 4h de incubação..... 56

Figura 10- Interação de amostras de *Corynebacterium diphtheriae* e *Corynebacterium ulcerans*. com macrófagos de linhagem U-937 (ATCC CRL-1593.2) obtidos de linfoma histiocítico humano, observados por microscopia ótica em diferentes tempos de formação de infecção..... 57

Figura 11- Aspectos morfológicos e semiquantitativos dos processos de interação de amostras de *Corynebacterium diphtheriae* utilizando o modelo experimental *in vitro* de alvéolo pulmonar humano com co-cultivos de pneumócitos da linhagem U-937 e macrófagos pulmonares da linhagem A-549..... 59

Figura 12- Heterogeneidade da capacidade de interação de amostras de *Corynebacterium diphtheriae* em ensaios com modelo alveolar humano *in vitro* utilizando co-cultivo de pneumócitos de linhagem A-459 e macrófagos pulmonares humanos de linhagem U-937..... 60

Figura 13- Aspectos morfológicos e semiquantitativos dos processos de interação de amostras de *Corynebacterium ulcerans* utilizando o modelo experimental *in vitro* de alvéolo pulmonar humano com co-cultivos de pneumócitos da linhagem U-937 e macrófagos pulmonares da linhagem A-549..... 62

Figura 14- Análise comparativa dos aspectos morfológicos dos processos de interação de amostras de *Corynebacterium diphtheriae* e *Corynebacterium ulcerans* com monocamadas de macrófagos pulmonares da linhagem U-937 com pneumócitos de linhagem A-549 co-cultivadas e observadas antes (controle) e durante 4h de infecção 64

Figura 15- Contagem de bactérias viáveis da amostra *Corynebacterium diphtheriae* TR-241, produtora de toxina diftérica, em diferentes tempos de incubação durante o processo de interação com células utilizadas no modelo experimental de alvéolo pulmonar humano..... 67

Figura 16- Pesquisa da capacidade de produção de *slime* por *Corynebacterium diphtheriae* e *Corynebacterium ulcerans* em meio Vermelho do Congo em diferentes tempos de cultivo..... 68

Figura 17- Análise semiquantitativa da formação de biofilme na superfície hidrofóbica de poliestireno por amostras de *Corynebacterium diphtheriae* e *Corynebacterium ulcerans*..... 69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Fatores provavelmente envolvidos com virulência de *Corynebacterium* spp. potencialmente produtoras de toxina diftérica..... 36

Tabela 2- Características das amostras de *Corynebacterium* spp. utilizadas no presente estudo..... 46

Tabela 3- Diferenças nas propriedades de interação de amostras de *Corynebacterium diphtheriae* e *Corynebacterium ulcerans* em monocamadas de células de linhagem A-549 e U-937 utilizadas nos ensaios *in vitro* alvéolo pulmonar humano caracterizadas por métodos morfológicos e semiquantitativos..... 65

Tabela 4- Formação de biofilme na superfície hidrofílica de tubos de vidro e hidrofóbica de microplacas de poliestireno por amostras de *Corynebacterium diphtheriae* e *Corynebacterium ulcerans* 70

Tabela 5- Características microbiológicas, produção de slime, propriedades de formação de biofilme em superfícies abióticas e de interação com células de linhagem A-549 e U-937 utilizadas nos ensaios in vitro de alvéolo pulmonar humano de seis amostras de *Corynebacterium* spp. utilizadas no presente estudo 72

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ADP	Adenisina difosfato
Anti-TD	Anti-toxina diftérica
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BGPIs	Bastonetes Gram-Positivos Irregulares
CdiLAM	Lipoarabinomanana
CDC	*Centers for Disease Control and Prevention*
CO_2	Dióxido de carbono
COVID-19	Doença infecciosa causada pelo vírus SARS-CoV-2
D-gal	Galactose
D-GalNAc	N-acetilgalactosamina
D-GlcNAc	N-acetilglucosamina
DAT	Antitoxina diftérica
D-Man-like	Manose-like
DMEM	Meio Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DPOC	Bronquite crônica e enfisema pulmonar
D.O.	Densidade óptica
dT	Vacina adsorvida difteria e tétano adulto
DTP	Vacina adsorvida difteria, tétano e pertussis (celular) infantil
DTPa	Vacina adsorvida difteria, tétano e pertussis (celular) infantil
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GAS	*Streptococcus* do grupo A
GM-CSF	*Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor*
Grupo CMNR	Grupo formado pelos gêneros *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Rodhococcus*
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IgG	Imunoglobulina G
INCA	Insttituto Nacional do Câncer
IL-1	Interleucina-1

kDa	Kilo Dalton
LAM	Lipoarabinomas
LPSN	*List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*
MALDI-TOF	*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight*
MDR	*Multidrug resistance*
NanH	Neuraminidase
Mg	Miligrama
MLSB	Resistência para
MRSA	*Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina
mRNA	RNA mensageiro
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
PBP	Penicilina
PBS	*Phosphate Buffered Saline*
PLD	Fosfolipase D
PMA	*Phorbol 12-myristate 13-acetate*
PNI	Programa nacional de imunização
QRDR	*Quilonone-resistance-determining-region*
RNA	Ácido ribonucléico
RPAD	*Random Amplified Polymorphic DNA*
SAD	Soro antidifitérico
SGB	*Streptococcus* do grupo B
SUS	Sistema Único de Saúde
TD	Toxina diftérica
TD-negativa	Toxina diftérica negativa
TD-positiva	Toxina diftérica positiva
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TSA	*Trypticase Soy Agar*
tox	Gene que codifica a toxina diftérica
UFM	Unidade Formadora de Colônias
UI	Unidade internacional
URSS	União das Repúblicas Socialistas Soviética
WHO	*World Health Organization* – Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	15
1	**REVISÃO DE LITERATURA**	16
1.1	**O gênero *Corynebacterium***	16
1.2	***Corynebacterium diphtheriae***	17
1.3	***Corynebacterium ulcerans***	18
1.4	**Complexo *Corynebacterium diphtheriae***	19
1.5	**Difteria**	20
1.5.1	Difteria respiratória	21
1.5.2	Difteria cutânea	22
1.5.3	Prevenção e tratamento	23
1.5.4	Epidemiologia	25
1.6	**Mecanismos de virulência de *Corynebacterium* spp. potencialmente produtoras de toxina diftérica**	27
1.6.1	Citoxicidade	27
1.6.2	Outros fatores de virulência de *Corynebacterium* spp	29
1.7	**Infecções no trato respiratório inferior**	37
1.8	**Alvéolos pulmonares**	38
1.9	**Pesquisas de mecanismos de interação com tecidos pulmonares**	40
2	**RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA**	44
3	**OBJETIVOS**	45
3.1	**Objetivo geral**	45
3.2	**Objetivos específicos**	45
4	**MATERIAL E MÉTODOS**	46
4.1	**Origem, identificação, características e estocagem das amostras bacterianas**	46
4.2	**Ensaios de interação bacteriana com células eucarióticas co-cultivadas (modelo experimental de alvéolo pulmonar)**	47
4.3	**Avaliação da capacidade de produção de *slime* em meio Vermelho do Congo**	49
4.4	**Ensaios de formação de biofilme**	49
4.5	**Parâmetros de análise da interação bacteriana no modelo *in vitro* de alvéolo pulmonar humano**	50

5 **RESULTADOS**..... 51
5.1 **Formação de monocamadas de células epiteliais pulmonares de humanos A-549** 51
5.2 **Formação de monocamadas de macrófagos pulmonares humanos U-937**..... 52
5.3 **Modelo de alvéolo pulmonar *in vitro* empregando co-cultivos de células U-937 e A-549** 52
5.4 **Interação de amostras de *Corynebacterium* spp potencialmente produtoras de TD com pneumócitos humanos da linhagem A-549** 53
5.5 **Interação de amostras de *Corynebacterium* spp. potencialmente produtoras de TD com macrófagos pulmonares humanos da linhagem U-937**..... 56
5.6 **Interação de amostras de *Corynebacterium* spp. potencialmente produtoras de TD avaliadas pelo modelo experimental celular de alvéolo pulmonar humano *in vitro*** 58
5.6.1 Análises qualitativas e semiquantitativas da interação de *C. diphtheriae* com pneumócitos da linhagem U-937 e macrófagos pulmonares da linhagem A-549 em co-cultura no modelo experimental celular de alvéolo pulmonar humano 58
5.6.2 Análises qualitativas e semiquantitativas da interação de *C. ulcerans* com pneumócitos da linhagem U-937 e macrófagos pulmonares da linhagem A-549 em co-cultura no modelo experimental celular de alvéolo pulmonar humano 61
5.6.3 Potencial de interação de *Corynebacterium* spp. com pneumócitos da linhagem U-937 e macrófagos pulmonares da linhagem A-549 em co-cultura no modelo experimental celular de alvéolo pulmonar humano 63
5.6.4 Análise quantitativa do potencial de interação, invasão e sobrevivência investigada pelo modelo experimental celular de alvéolo pulmonar humano 66
5.7 **Produção de *slime*** 67
5.8 **Formação de biofilme em superfícies abióticas** 69
5.8.1 Formação de biofilme na superfície hidrofóbica de poliestireno 69
5.8.2 Formação de biofilme na superfície hidrofílica de vidro 70
5.9 **Correlação dos resultados obtidos** 71
6 **DISCUSSÃO**..... 73
CONCLUSÕES..... 80
REFERÊNCIAS 81

INTRODUÇÃO

Corynebacterium diphtheriae e *Corynebacterium ulcerans* potencialmente produtoras de toxina diftérica (TD) são principalmente conhecidos como agente etiológicos da difteria clássica e zoonótica, respectivamente, infecções que atingem o trato respiratório e a pele. Entretanto, *C. diphtheriae* e *C. ulcerans* já foram reportadas como capazes de causar infecções invasivas de diversos tipos em pacientes de diferentes faixas etárias, imunocompetentes e imunocomprometidos, incluindo infecções do trato respiratório inferior, independente da produção de TD (MEINEL et al., 2014; THOMAS et al., 2022).

Além de casos clássicos de pneumonia, foram relatados outros tipos de infecção no trato respiratório inferior causados por algumas amostras de espécies patogênicas diversas pertencentes ao gênero *Corynebacterium*, tais como: infecção pleuropulmonar necrotizante, abscesso pulmonar, traqueobronquite, granuloma pulmonar necrotizante, traqueíte, bronquite, pneumonia em pacientes submetidos à ventilação mecânica. Casos de infecção pulmonar podem levar à sepse e costumam ser importante causa de morte dos pacientes (LEUNG; WONG; HON, 2018; MATTOS-GUARALDI; SANTOS; VIEIRA, 2023).

Nos últimos anos, experimentos realizados *in vitro* empregando modelos de cultivo celulares têm sido cada vez mais utilizados nas investigações científicas. A cultura de células contribui para o esclarecimento da complexidade da interação com os tecidos humanos, e como métodos alternativos nos estudos realizados com modelo animal (CARIUS et al, 2023).

Experimentos *in vitro* que simulam a estrutura do alvéolo pulmonar humano têm sido utilizados em diversos estudos com diversos patógenos. Uma vez que não foram observados na literatura consultada estudos com modelos experimentais *in vitro* do alvéolo pulmonar com amostras de *Corynebacterium* spp., consideramos relevante investigar amostras de *C. diphtheriae* e *C. ulcerans* de origens diversas.

1 **REVISÃO DE LITERATURA**

1.1 **O gênero *Corynebacterium***

O gênero *Corynebacterium* faz parte da família *Corynebacteriaceae*, da ordem *Corynebacteriales* e da classe *Actinobacteria* (TAUCH; SANDBOTE, 2014). Com base no sequenciamento do gene 16S rRNA, a classe *Actinobacteria* foi subdividida em 15 ordens, 43 famílias e 203 gêneros de bactérias Gramgram-positivas com alto teor guanosina-citosina (G-C + G) na composição do DNA (BUSSE, 2012; HACHER et al., 2016), que varia de 46 a 74 % (FUNKE.; BERNARD, 2007). Os gêneros *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* e *Rodhococcus* formam o grupo CMNR, caracterizado pela presença de ácido micólico (lipídios de cadeia longa ramificada) (WEERASEKERA et al., 2019), e lipoglicanos, como lipoarabinomas (LAM) e lipomanas na parede celular (MOREIRA et al., 2008).

O gênero *Corynebacterium* é composto por bacilos Gram-positivos, catalase-positivos, imóveis, não esporulados e não ácidos-resistentes. Inclui espécies fermentadoras e não fermentadoras de sacarose. As corinebactérias apresentam um pleomorfismo característico e sua parede celular é composta por arabinose, ácido mesodiaminopimélico, apresentando altos índices de cadeias curtas de ácido micólico com 22 a 38 átomos de carbono e tendo galactose como principal açúcar de parede celular (MATTOS-GUARALDI; SANTOS; VIEIRA, 2023). A coloração de Gram permite a visualização de bastonetes não paralelos, curvados, e às vezes com extremidades mais largas, conferindo uma forma de clava (BERNARD, 2012; HACKER et al., 2016; ROGERS et al, 2011).

Atualmente, o gênero *Corynebacterium* possui 237 espécies identificadas, sendo 178 consideradas válidas (LPSN, 2023), incluindo espécies de importância biotecnológica, comensais de humanos e animais, e mais de 50 espécies já relacionadas a quadros de infecções em humanos (BURKOVSKI, 2013; OTT, 2018; SANGAL; BURKOVSKI, 2020; SILVA-SANTANA, et al., 2021). O principal membro da classe é *Corynebacterium diphtheriae*, espécie-tipo do gênero, agente etiológico da difteria clássica (ALIBI et al., 2017; ANTUNES et al., 2015).

Recentemente, têm sido observadas variações geográficas na frequência de isolamento e de infecções comunitárias e nosocomiais causadas por diversas espécies do gênero

Corynebacterium, além de *C. diphtheriae* (n ≥ 60): *Corynebacterium ulcerans*, *Corynebacterium amycolatum*, *Corynebacterium jekeium*, *Corynebacterium xerosis*, *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, *Corynebacterium afermentans*, *Corynebacterium macginley* e *Corynebacterium striatum* (MATTOS-GUARALDI; SANTOS; VIEIRA, 2023).

1.2 ***Corynebacterium diphtheriae***

Em 1883 Klebs identificou o microrganismo *C. diphtheriae* como agente causador da difteria. No ano seguinte, Loeffler postulou que os danos aos órgãos internos eram resultantes de toxina solúvel. Em 1888, Roux e Yersin demonstraram que animais injetados com filtrados de *C. diphtheriae* desenvolveram patologia orgânica semelhante à da difteria humana e concluíram que uma potente exotoxina era o principal fator de virulência (MURPHY, 1996; SHARMA et al., 2019).

Amostras de *C. diphtheriae* são capazes de produzir toxina diftérica (TD) após serem lisogeinizados por corinefagos portadores do gene *tox* (OTT, 2018; SANGAL; HOSKISSON, 2014; WEERASEKERA et al., 2019). Amostras avirulentas podem se tornar virulentas após infecção e lisogeinização por um ou vários corinefagos que carregam o gene estrutural para a toxina diftérica (TD), o gene *tox* (PARVEEN et al., 2019).

Com base em testes bioquímicos e na morofologia colonial, a espécie *C. diphtheriae* foi inicialmente dividida em quatro biovares: *gravis*, *mitis*, *intermedius* e *belfanti* (DAZAS et al., 2018; FUNKE et al., 1997; TAGINI et al., 2018; SANTOS et al., 2018). Amostras do biovar *belfanti* são nitrato negativas, raramente, portadoras do gene *tox* e/ou produtoras de TD. Foram isoladas causando infecções em pacientes com rinite crônica atrófica (ozaena), além de outras infecções no trato respiratório superior e inferior. Casos de pneumonia são mais frequentemente reportados, incluindo pacientes com fibrose cística (BEZJAK, 1954; MATTOS-GUARALDI; SANTOS; VIEIRA, 2023; PIVOT et al, 2019; SCHLEZ et al., 2021).

Amostras agrupadas no biovar *gravis* são nitrato positivas, fermentam glicogênio e expressam atividade hemolítica em intensidades variadas (SANGAL; BURKOVSKI, 2020). Amostras TD negativas deste biovar foram relacionadas a casos de endocardite na Austrália (FUNKE et al., 1997). Casos de endocardite por *C. diphtheriae* biovar *gravis* também ocorreram no Brasil, incluindo um caso fatal de criança com sete anos de idade que desenvolveu

endocardite e choque séptico por amostra TD positiva (HIRATA et al., 2008). Este é o biovar mais frequente na Europa (HIRATA et al., 2011).

O biovar *mitis* inclui amostras nitrato positivas, não fermentadoras de glicogênio. Este é o biovar predominantemente isolado na América do Sul. Além de causar casos clássicos de difteria respiratória e cutânea, também tem sido relacionado a casos diversos de infecções invasivas, inclusive endocardite (HIRATA et al., 2008; HIRATA et al., 2011; MATTOS-GUARALDI; SANTOS; VIEIRA, 2023). Por fim, as amostras de *C. diphtheriae* biovar *intermedius*, lipofílicas e não hemolíticas, são raramente isoladas no Brasil, mas frequentemente isoladas na Ásia (SANTOS, et al., 2015a; SANGAL; BURKOVSKI, 2020).

Em 2018, a análise taxonômica de amostras de *C. diphtheriae* indicou a presença de duas subespécies, *C. diphtheriae* subsp. *diphtheriae* e *C. diphtheriae* subsp. *lausannense* (TAGINI et al., 2018). Nesta última, estão agrupadas a amostras nitrato negativas, inicialmente classificadas no biovar *belfantii*, isoladas de trato respiratório e reportadas em diferentes países (LI et al., 2022).

1.3 ***Corynebacterium ulcerans***

Em 1926 os pesquisadores Gilbert e Stewart isolaram e identificaram pela primeira vez o patógeno *C. ulcerans* de paciente com difteria respiratória (GILBERT; STEWART, 1926). *C. ulcerans* é diferenciado de *C. diphtheriae* pela atividade de urease e reação de CAMP (FUNKE; BERNARD, 2007). *C. ulcerans* é capaz de produzir TD, à semelhança de *C. diphtheriae*, uma vez que também pode abrigar beta-corinefagos lisogênicos com genes codificadores desta TD (BERGER et al., 2013; MEINEL et al., 2014; TROST et al., 2011).

C. ulcerans é um microrganismo comensal (OTSUJI et al., 2017) e agente etiológico de diversos quadros de infecções em animais, principalmente mastite em gado (DIAS et al., 2011). As infecções em humanos causadas por *C. ulcerans*, incluindo a difteria, podem ser fatais e usualmente a sua transmissão ocorre de forma zoonótica. Na Europa, a difteria causada por *C. ulcerans* possui maior incidência do que a difteria causada por *C. diphtheriae* (BERGER et al., 2013; DE ZOYSA et al., 2005; PERKINS et al., 2010; TAYLOR et al., 2010; THOMAS et al., 2022; WAGNER et al., 2010). Aproximadamente 75% destes casos ocorreram em pacientes adultos que haviam sido imunizados totalmente ou parcialmente contra o toxóide diftérico

(DIAS et al., 2011; LARTIGUE et al., 2005; OTSUJI et al., 2017; TEJEDOR et al., 2000; YASUDA et al., 2018; WELLINGHAUSEN et al., 2002).

Nas últimas décadas a frequência e gravidade das infecções humanas associadas a *C. ulcerans* aparentam ter aumentado muito em diferentes países do mundo (BONMARIN et al., 2009; DEWINTER. BERNARD; ROMNEEY, 2005; GUGLIELMINI et al., 2021; HATANAKA et al., 2003; HOGG et al., 2009; KIMURA et al., 2011; KOMIYA et al., 2010). O principal reservatório de *C. ulcerans* parece ser o gado bovino, onde normalmente causam mastite. Entretanto, casos de infecção em outros animais também foram descritos, incluindo cães, gatos, porcos, além de outros (BERGIN et al., 2000; DE ZOYSA et al., 2005; DIAS et al., 2010; FOSTER et al., 2002; KATSUKAWA et al., 2009; MORRIS et al., 2005; OLSON et al., 1988; SETO et al., 2008; SCHUHEGGER et al., 2009; TEJEDOR et al., 2000).

C. ulcerans pode ser encontrado colonizando nasofaringe de trabalhadores rurais assintomáticos. Entretanto, alguns casos não possuem associação com comunidades rurais ou consumidores de leite não fervido/pasteurizado, o que sugere outras vias de contaminação (DE ZOYSA et al., 2005; THOMAS et al., 2022). Independente da produção de TD, *C. ulcerans* também já foi isolado de síndromes infecciosas em humanos acometendo o trato respiratório inferior (pneumonia) (HATANAKA et al., 2003; HOMMEZ et al., 1999; MATTOS-GUARALDI et al., 2008), em algumas situações evoluindo para coagulação intravascular disseminada (NUREKI et al., 2007).

A TD de *C. ulcerans* pode causar sangramento nasal durante a infecção, lesões de pele semelhantes às causadas por difteria cutânea típica, formação de pseudomembrana na árvore traqueobrônquica, hemorragia, comprometimento de linfonodos cervicais, morte celular por apoptose. Outras sindromes independentes da TD são: necrose e ulcerações da mucosa, pneumonias e nódulos pulmonares granulomatosos e coagulação intravascular disseminada, lesões de pele, faringites, faringites exudativas (HATANAKA et al., 2003; MATTOS-GUARALDI; SANTOS; VIEIRA, 2023; TROST et al., 2011; YAMAMOTO et al, 2023).

1.4 **Complexo *Corynebacterium diphtheriae***

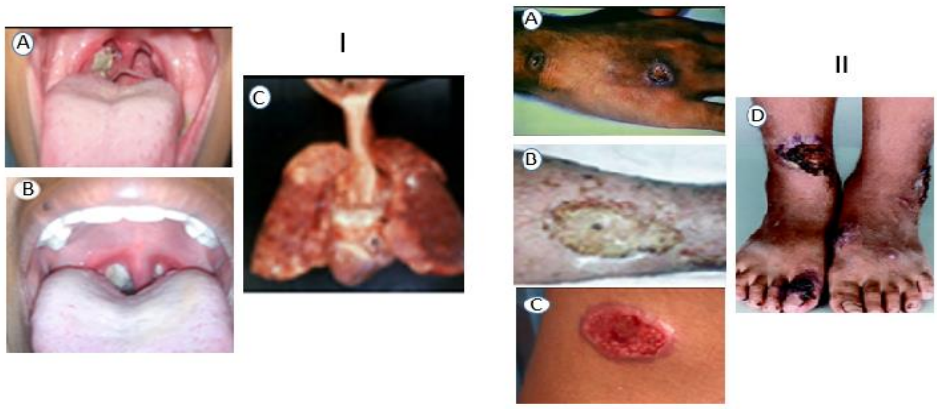
Recentemente, com base em análises de sequenciamento genômico, quimiotaxonômicas e bioquímicas, três novas espécies de *Corynebacterium* filogeneticamente próximas a *C. diphtheriae*, *C. ulcerans*, *C. pseudotuberculosis* foram descritas e reportadas como

potencialmente carreadoras do gene codificador da TD (*tox*): *C. belfantii*, *C. rouxii* e *C. silvaticum*. As duas primeiras incluem as amostras originalmente classificadas no biovar *belfanti*. As seis espécies citadas, atualmente, compõem o complexo *C. diphtheriae* (BADELL, et al., 2020; CANÁRIO VIANA et al., 2022; DANGEL et al., 2020; HOEFER et al., 2021; PRYGIEL et al., 2022; SCHLEZ ET AL., 2021).

1.5 **Difteria**

A difteria é uma doença infecciosa aguda que pode afetar o trato respiratório (difteria respiratória) e pele (difteria cutânea) (Figura 1). É causada por bactérias do gênero *Corynebacterium* produtoras da toxina diftérica (TD), principalmente das espécies *C. diphtheriae* e *C. ulcerans* (ANDERSON et al., 2020; BENAMROUCHE et al., 2016; HOEFER et al., 2019).

Figura 1 - Microfotografias de pacientes com difteria respiratória e cutânea.



Legenda: I, difteria respiratória; II, difteria cutânea. IA, A formação de pseudomembranas, esbranquiçadas ou amarelo-acinzentadas com bordas bem definidas constitui o sinal patognomônico da doença. (IB) Em alguns pacientes, também ocorre a formação de pseudomembrana na superfície lingual. (IC) A extensão da pseudomembrana pode levar ao comprometimento do palato mole, úvula e nos casos graves pode se estender na traquéia e brônquios com consequente obstrução das vias respiratórias. (II) Na difteria cutânea, as lesões geralmente apresentam-se sob a forma de (IIA) úlceras arredondadas, fibrinopurulentas e bordas bem demarcadas com ou sem pseudomembrana, incluindo, lesões crônicas de comorbidades, como (IIB) diabetes e (IIC) leishmaniose; (IID) mordidas de mosquito, geralmente em regiões tropicais e endêmicas.

Fonte: Adaptado de FORMIGA et al., 1995; MATTOS-GUARALDI et al., 2008; SHARMA et al., 2019.

C. diphtheriae pode ser encontrando colonizando temporariamente a pele e/ou trato respiratório superior (MATTOS-GUARALDI et al, 2003; MOKROUSOV, 2009). A transmissão ocorre de pessoa a pessoa através do contato direto entre um indivíduo doente ou portador assintomático e outro suscetível através de gotículas de secreção eliminadas na fala, espirro ou tosse (MARTÍNEZ-MARTÍNEZ et al., 1995), ou contato com lesões cutâneas. Embora *C. diphtheriae* seja classicamente descrito como microrganismo capaz de causar infecções em humanos, tendo este como seu único reservatório, nas últimas décadas, amostras desta espécie têm sido isoladas de animais, incluindo lesões de úbere de vaca, lesão cutânea em cavalo e otite em gato doméstico, alertando para a possibilidade (ainda não comprovada) de transmissão zoonótica deste patógeno (MATTOS-GUARALDI; SANTOS; VIEIRA, et al., 2023; THOMAS et al., 2022; TYLER et al., 2022).

1.5.1 Difteria respiratória

Os sintomas iniciais da difteria respiratória são inespecíficos e incluem mal-estar geral, febre, dor de garganta e perda do apetite. Com a evolução da doença, observa-se a formação da pseudomembrana branco-acinzentada, principalmente nas regiões das tonsilas, oro e nasofaringe, podendo se estender até traqueia, brônquios e bronquíolos e levando a graves limitações no fluxo aéreo e broncopneumonia (MATTOS-GUARALDI et al., 2014; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ et al., 1995; PEIXOTO et al, 2011; SANGAL; HOSKISSON, 2014). A pseudomembrana inflamatória é composta por rede de fibrina, tecido morto e células bacterianas que podem bloquear a passagem de ar para os pulmões (DIAS et al., 2011; TORTORA et al., 2012).

Quando a TD é absorvida pelo sistema cardiovascular e distribuída para órgãos distantes, como coração, rins e suprarrenais, e para o sistema nervoso periférico, pode causar paralisia, insuficiência cardíaca e insuficiência renal em decorrência da inibição da síntese proteica e morte de células suscetíveis. Vale ressaltar que apenas 0.1 μg/kg de TD pode levar o indivíduo ao óbito (BENAMROUCHE, et al., 2016; HADFIELD et al, 2000; MATTOS-GUARALDI et al., 2014; MOKROUSOV, 2009). A cardiomiopatia tóxica ocorre entre 7 e 14 dias após o início dos sintomas respiratórios em 10 a 25% dos pacientes, sendo responsável por 20 a 25% das mortes. As desordens neurológicas (hipoestasia, polineuropatia, neuropatias cranianas) ocorrem semanas ou meses depois e ocorrem em 20 a 25% dos casos não tratados,

sendo responsáveis por até 15% dos óbitos. A progressão da doença para óbito ocorre entre 1 e 2 semanas após o início dos sintomas e ocorre entre 60 e 65% das infecções de laringe (BOTH et al., 2015; TRUELOVE et al., 2020).

Nos casos mais graves da doença, denominados de difteria maligna ou hipertóxica, as manifestações clínicas são mais severas desde o início súbito. A evolução é caracterizada por linfadenopatia cervical e edema periganglionar importantes, configurando o que popularmente se chama "pescoço de touro" ou "pescoço taurino", bem como pela formação de pseudomembrana em toda a extensão do trato respiratório. É preciso ressaltar que estes sinais decorrem não apenas da multiplicação do microrganismo, mas também da ação local de TD, devido à ação local e intensa absorção. Miocardite, neurite e insuficiência renal são complicações frequentemente observadas. Cerca de 50% dos casos de difteria maligna são fatais, principalmente em decorrência de bloqueio atrioventricular e arritmias complexas. Quadros de difteria clássica e maligna já foram descritos em indivíduos imunizados, incluindo adultos jovens recentemente vacinados (MATTOS-GUARALDI et al., 2023).

1.5.2 Difteria cutânea

A difteria cutânea ocorre mais frequentemente em regiões de clima tropical e subtropical e a transmissão do patógeno é mais elevada do que nos casos de difteria respiratória, contribuindo para a emergência de surtos epidêmicos. A difteria cutânea ocorre mais nos pés, na parte inferior das pernas e nas mãos. A transmissão acontece pelo contato com a pele infectada, gotículas respiratórias de um paciente infectado com difteria do trato respiratório, ou exposição a poeira ou roupas contaminadas com o patógeno (BURKOVSKI, 2014; FUNKE; BERNARD, 2007; HÖFLER, 1991; TRUELOVE, et al., 2020).

Os bacilos podem colonizar qualquer tipo de lesão celular, como por exemplo: feridas cirúrgicas, piodermite, eczema, impetigo, dermatite, úlceras leshmanióticas ou picadas de insetos (Figura 1). A lesão progride formando uma úlcera perfurada, simples ou múltipla, medindo desde vários milímetros a alguns centímetros com margens ligeiramente curvas e elevadas. As lesões são dolorosas e podem ser recobertas por pseudomembrana, durante 1-2 semanas. Posteriormente, a pseudomembrana desaparece e a lesão se torna anestésica apresentando exsudato seroso ou serosanguinolento (FORMIGA et al., 1995; HADFIELD et

al., 2000; MATTOS-GUARALDI et al., 2008; MATTOS-GUARALDI; SANTOS; VIEIRA 2023; SHARMA et al., 2019).

1.5.3 Prevenção e tratamento

A prevenção da difteria vem sendo realizada desde a década de 40 com a vacina DTP, que contém o toxóide diftérico (TD inativada) combinado aos toxoides tetânico e ao componente pertussis. No Brasil, a implementação da vacina antidiftérica ocorreu apenas em 1970.

Atualmente, há diferentes formulações contendo o toxoide diftérico e o esquema vacinal estabelecido pelo Ministério da Saúde consiste na administração de três doses da vacina pentavalente, com intervalo de 60 dias entre as doses (aos 2, 4 e 6 meses de idade), e doses de reforço com a vacina DTP aos 15 meses e aos 4 anos de idade. A vacina pentavalente é composta por toxoides diftérico e tetânico, pelo componente pertussis (célula inteira inativada de *Bordetella pertussis*), pelo polissacarídeo capsular purificado de *Haemophilus influenza* B (Hib) e hepatite B (HB) (BRASIL, 2019). A partir dos 10 anos, doses de reforço com a vacina dT, que apresenta associação dos toxoides diftérico e tetânico, são recomendas a cada 10 anos da última dose recebida. As gestantes devem receber a partir da 20ª semana, uma dose da vacina tríplice acelular (dTpa), contendo os toxoides diftérico e tetânico, e o componente pertussis acelular. Em adolescentes e adultos com esquemas incompletos de vacinação, não vacinados e /ou com histórico de vacinação desconhecido, recomenda-se a administração de ao menos uma dose da dTPa e duas doses da dT com intervalo de 2 meses (BRASIL, 2019 ; SBIM, 2023).

É preciso ressaltar que a doença apresenta elevada taxa de letalidade (5-17%) para indivíduos não vacinados e que, apesar da disponibilidade gratuita à população, as taxas de cobertura vacinal vêm declinando no Brasil desde 2016, estando abaixo da meta preconizada (95%). Segundo dados do Ministério da Saúde, nos anos de 2020, 2021 e 2022 a cobertura vacinal foi de 77,86%, 71,53% e 77,24%, respectivamente (BRASIL, 2023). Vale também mencionar que a cobertura vacinal não é homogênea no território brasileiro. Entre os anos 2008 a 2022 ocorreram 10 óbitos por difteria, no ano de 2010 foram registrados 3 óbitos. Em 2017 ocorreu um óbito referente a um caso importado da Venezuela (BRASIL, 2023). Por fim, enfatizamos que a imunização com o toxoide diftérico previne apenas contra os sintomas

referentes à TD, mas não impede a colonização e infecção de humanos com as células bacterianas TD-positivas ou TD-negativas (PENG et al., 2018). Logo, elevados níveis de anticorpos anti-TD em indivíduos imunizados reduzem significativamente o número de amostras TD-positivas de *C. diphtheriae* isoladas na população, mas não conseguem manter o controle de portadores de amostras DT-negativas de *C. diphtheriae* no ambiente (MATTOS-GUARALDI et al., 2003; MATTOS-GUARALDI; SANTOS; VIEIRA, 2023; SHARMA et al., 2019).

O tratamento da difteria é feito com o soro antidiftérico (SAD) para inativar a ação de TD da bactéria no organismo do paciente o mais rapidamente possível, e o uso de agentes antimicrobianos para interromper o processo infeccioso. A administração do soro antidiftérico (SAD) deve ocorrer em ambiente hospitalar devido às possíveis complicações (reação anafilática e doença do soro) por ser produzida em equinos (REZAEIFARD et al., 2021). A administração de doses de SAD é realizada por via endovenosa e de acordo com os aspectos clínicos da doença: 40.000 UI – em formas leve, nasal, cutânea e/ou amigdaliana; 60.000 a 80.000 UI - laringo-amigdaliana ou mista; 80.000 a 120.000 - grave (difteria hipertóxica ou maligna) ou tardia > 4 dias da doença (VIEIRA et al., 2019).

A penicilina é classicamente considerada o agente antimicrobiano de primeira escolha para o tratamento da difteria (FITZGERALD; ROSSER; PEREIRA, 2015; HENNART et al., 2020), seguido de outros beta-lactâmicos e macrolídeos (MUTTAIYAH et al., 2011; PEREIRA et al., 2008). Entretanto, tem sido crescente o número de amostras penicilina-resistentes, além da emergência de amostras de multirresistentes de *C. diphtheriae* e *C. ulcerans* (MATTOS-GUARALDI; SANTOS; VIEIRA, 2023; REZAEIFARD et al., 2021).

O tratamento com agentes antimicrobianos é feito durante 14 dias. Os pacientes geralmente deixam de transmitir o microrganismo após 24/48h do início do tratamento. O paciente deve permanecer em isolamento respiratório durante o período de tratamento. Medidas quimioprofilaxia com eritromicina é oferecida aos contactantes não vacinados, inadequadamente vacinados, ou com estado vacinal desconhecido, cuja administração a crianças é de 40-50mg/kg/dia (4 doses), durante 7 dias, e de 500 mg de 6/6h durante 7 dias por via oral a adultos (VIEIRA et al., 2019). O tratamento para infecções severas, como endocardite, consiste na administração de beta-lactâmicos e macrolideos durante um período de 4-6 semanas (GOMES et al., 2013; MUTTAIYAH et al., 2011).

1.5.4 Epidemiologia

A difteria foi uma das principais causas de morte infantil no período pré-vacinal em todo o mundo (MATTOS-GUARALDI et al., 2003). Após a implementação da vacina entre os anos de 1930-1940, observou-se redução da incidência dessa doença infectocontagiosa (ANDERSON et al., 2020; VITEK; WHARTON, 1998). Na Europa, as menores taxas de incidência foram alcançadas no início dos anos 80 e acredita-se que a erradicação da difteria entre a população indígena europeia tenha ocorrido antes de 1990 (GALAZKA et al., 1995). Contudo, na década de 1990 ocorreu o ressurgimento de uma grande epidemia de difteria na antiga União das Repúblicas Socialistas Soviética (URSS), atingindo principalmente adultos. Ocorreram cerca de 140.000 casos de difteria e 4.000 óbitos. Somente na Rússia foram 105.000 casos com mais de 2.600 óbitos (BOLT et al., 2010; GALAZKA et al.,1995; VITEK; WHARTON, 1998).

Na mesma época, também ocorreram relatos de casos de difteria nos seguintes países: Estados Unidos da América (SING et al., 2005), Reino Unido (EFSTRATIOU; GEORGE, 1999), Japão (HATANAKA et al., 2003), Alemanha (SING et al., 2005), Holanda (VAN DAM et al., 2003), Suiça (KAUFMANN et al., 2002) e Itália (VON HUNOLSTEIN et al., 2003), Tunísia (ALIBI et al., 2017). Surtos de difteria também foram observados na Argélia, China, Equador, Jordânia, Lesoto e Sudão (GALAZKA et al., 1995), Iraque, República Popular do Laos, Mongólia, Papua Nova Guiné, Tailândia (BOLT et al., 2010). Embora a vacinação em massa tenha reduzido consideravelmente o número de casos, a difteria permaneceu uma importante causa de morbidade e mortalidade em vários continentes (DIAS et al., 2011).

Mudanças no perfil epidemiológico têm sido observadas: a difteria vem acometendo indivíduos de qualquer idade e casos sem a pseudomembrana característica têm sido relatados. Atualmente, os surtos têm sido relacionados à baixa cobertura vacinal em crianças, à interrupção nos sistemas de saúde e programas de vacinação, aglomeração e condições socioeconômicas precárias (SHARMA et al., 2019; VITEK; WHARTON, 1998).

O continente asiático apresenta a maior incidência de casos de difteria do mundo desde o ano 2000; a Índia possui o maior número de casos notificados, seguida pela Indonésia e Nepal (WHO, 2023). Também há relatos de surtos de difteria na Nigéria, Rússia, Finlândia, Suécia, Noruega, Tailândia, Sudão e centros de reassentamento de refugiados, onde se observa aumento de casos de difteria e de portadores assintomáticos devido à dificuldade de acesso aos serviços públicos de saúde. Entre os anos de 2015-2018 ocorreram surtos na Venezuela, Iêmen e Haiti

devido à crise econômica, guerra, falta de acesso ao serviço de saúde e à vacinação (WHO, 2023).

Na América Latina, tem-se observado nos últimos anos e principalmente durante a pandemia de COVID-19, um declínio na cobertura vacinal após a terceira dose da vacina DTP em crianças com menos de 1 ano de idade, e a cobertura vacinal na população mais jovem e de adultos (principalmente homens) ainda segue muito baixa. No ano de 2021, houve registro de 13 casos confirmados de difteria na República Dominicana, e 10 óbitos; no Haiti foram registrados 12 casos confirmados e 2 óbitos (OPAS/OMS, 2021). Na Venezuela, entre os anos de 2016 e 2018 ocorreram 1.904 casos suspeitos de difteria, com 164 óbitos. O alto fluxo migratório de refugiados venezuelanos é motivo de preocupação quanto à ocorrência de casos importados no Brasil (VIEIRA et al., 2019).

No Brasil, no ano de 2008, ocorreu um caso de infecção fatal em humano causado por *C. ulcerans*. Em 2010, o Ministério da Saúde emitiu um alerta sobre a situação de difteria no Brasil, informando a mudança no perfil clínico-epidemiológico da doença, tais como ausência de formação de pseudomembrana, desvio da faixa etária, ocorrência de difteria zoonótica e circulação de *C. ulcerans* e *C. diphtheriae* no país. Adotou-se, a partir de então, as mesmas medidas de controle preconizadas para a espécie *C. diphtheriae* em casos confirmados de difteria por *C. ulcerans*, tais como: notificação, tratamento, monitoramento de todos os casos suspeitos de difteria com isolamento de amostras DT-negativas pelos profissionais de saúde (DIAS et al., 2011).

No estado do Maranhão, em 2010, ocorreu um surto de difteria com registro de 28 casos. A maioria dos casos ocorreu em crianças (idade entre 1 e 12 anos) e mulheres vacinadas apresentando forma grave da doença causada por *C. diphtheriae* biovar *intermedius*, raramente isolada no Brasil (SANTOS, et al., 2015a). Entre os anos 2013 e 2017, também em nosso território, foram notificados 36 casos de difteria, com duas mortes em Minas Gerais no ano de 2015 (VIEIRA et al., 2019). Entre os anos de 2019 e 2021, foram notificados 59 de casos suspeitos de difteria, dos quais 5 foram confirmados, sem notificação de óbito. Os estados brasileiros que notificaram os casos confirmados foram: Pernambuco (1 caso), Rondônia (1 caso), Minas Gerais (1 caso), Rio Grande do Sul (1 caso) e Mato Grosso (1 caso) (OPAS/OMS, 2021).

Ao longo dos anos vem também ocorrendo um aumento na incidência de doenças causadas por amostras TD-negativas de *C. diphtheriae*, que podem estar relacionadas com quadros de dor de garganta persistente, amigdalite grave, faringite com ou sem pseudomembrana e doenças invasivas – pneumonia, endocardite, abscesso esplênico,

osteomielite, artrite e infecções relacionadas ao uso de cateteres (SANGAL; HOSKISSON, 2016; SANTOS et al., 2015a; SANTOS et al., 2015b). Infecções invasivas causadas por amostras TD-negativa podem ocorrer em pessoas vacinadas, parcialmente imunizadas e não vacinadas (HIRATA Jr et al., 2008).

1.6 **Mecanismos de virulência de *Corynebacterium* spp. potencialmente produtoras de toxina diftérica**

1.6.1 Citoxicidade

Toxina Diftérica:

Atualmente, *C. diphtheriae*, *C. ulcerans*, *C. pseudotuberculosis*, *C. belfantii*, *C. rouxii* e *C. silvaticum* são espécies caracterizadas como potencialmente produtoras de TD. A toxina diftérica é uma proteína composta por 535 aminoácidos de aproximadamente 62 kDa, do tipo AB. A TD é excretada da bactéria, sofre clivagem para formar duas cadeias, A e B, que são mantidas unidas por uma ligação dissulfeto intercadeia entre os resíduos de cisteína nas posições 186 e 201. A TD se distribui pela circulação atingindo o miocárdio e nervos periféricos. A região B é específica para um receptor membranar existente nas células alvo, provocando após acoplagem, a internalização da toxina por endocitose. A região A tem a atividade tóxica propriamente dita: ela bloqueia irreversivelmente o sistema da síntese de novas proteínas (tem atividade de ADP ribosil transferase, ribosilando o fator de elongação EF2 e impedindo a tradução no ribossomo), o que inevitavelmente provoca a morte celular **(**HADFIELD et al., 2000; REZAEIFARD et al., 2021; SIMONOVA et al., 2022).

As amostras toxigênicas carregam o gene *tox* encontrados em corinebacteriofagos lisogênicos β tox $^{+}$, γ tox^{+} e ω tox^{+}. Amostras altamente tóxicas podem possuir dois ou os três genes *tox* inseridos no genoma (HADFIELD et al., 2000). A regulação da expressão gênica depende das concentrações de ferro nos tecidos do hospedeiro e da atividade da proteína reguladora DtxR, codificada por um gene cromossômico. Na presença de baixas concentrações de ferro, o regulador do gene é inibido, resultando no aumento da produção de TD (HADFIELD et al., 2000). As corinebactérias utilizam ferro para desempenhar várias atividades celulares

como respiração celular e produção de catalase. Em processos infecciosos, ordinariamente, apresentando baixas concentrações de ferro, *C. diphtheriae* produtor de TD compete com as células do hospedeiro pelo ferro disponível no ambiente (BURKOVSKI, 2020; DANGEL et al., 2019; LUONG et al., 2021; SANGAL; SIMONOVA et al., 2022).

Fosfolipase D:

C. ulcerans e *C. pseudotuberculosis*, causadores de infecções em animais, são produtores de fosfolipase D, uma exotoxina dermonecrótica codificada pelo gene *pld* (TROST et al., 2011; WILSON et al., 1995). A fosfolipase D (PLD) é classicamente considerada como o principal fator de virulência destas espécies, contribuindo para a persistência e a disseminação destes patógenos nos mamíferos (TROST et al., 2011). A exotoxina PLD possui atividade de esfingomielinase, resultando no aumento da permeabilidade vascular local, favorecendo a dispersão dos microrganismos nos tecidos dos hospedeiros (DIAS et al., 2011). A PLD catalisa a hidrólise de fosfatidilcolina em fosfatidato e colina, e cliva ligação éster de espingomielina presente na membrana celular de mamíferos (HACKER et al., 2016), gerando o mediador lipídico ácido lisofosfatídico, um indutor conhecido de respostas pró-inflamatórias **(**HACKER et al., 2016; TROST et al., 2011).

Toxina Shiga-like:

C. ulcerans é capaz de produzir toxina Shiga-like (proteína ligada ao ribossomo - Rbp) (SANGAL et al., 2014). Esta proteína tem semelhança estrutural com as toxinas Shiga SLT-1 e SLT-2 de *Escherchia coli*, e pode ter relação com a falência de múltiplos órgãos no paciente (SANGAL; BURKOVSKI, 2020). A toxina expressa efeitos citotóxicos em células epitelias e capacidade proliferativa em macrófagos (MATTOS-GUARALDI; SANTOS; VIEIRA, 2023). O seguinte mecanismo de ação é proposto: a Rbp é secretada no citosol do hospedeiro, liga-se ao ribossomo e exerce atividade enzimática, inibindo a síntese de proteínas e permitindo que *C. ulceran*s sobreviva no interior de células de mamíferos (TROST et al., 2011).

Análises posteriores verificaram que, além de *C. ulcerans*, *C. diphtheriae* pode também ser capaz de secretar a Rbp, com efeitos citotóxicos observados em macrófagos de origem animal e humano e linhagem de células epiteliais (HIRATA et al., 2008; TROST et al., 2011; WEERASEKERA et al., 2018).

1.6.2 Outros fatores de virulência de *Corynebacterium* spp.

Apesar da toxina diftérica ser classicamente considerada como o principal fator de virulência, *C. diphtheriae* apresenta mecanismo heterogêneo de patogenicidade que exerce importante papel na aderência, colonização, invasão, propagação e na evasão do sistema imune do hospedeiro (BURKOVSKI, 2013; GUEDES et al., 2015; MATTOS-GUARALDI et al., 2000; SHARMA, et al., 2019).

Biofilme:

As bactérias do gênero *Corynebacterium* formam biofilme, que consiste em um agregado de microcolônias envolvidas por uma matriz de polissacarídeos. Essas microcolônias formam comunidades organizadas que permitem a comunicação entre si, aderência em superfícies bióticas (GUEDES et al., 2015) e abióticas (SOUZA et al., 2015) e com canais de circulação de nutrientes (COSTERTON et al., 1999).

O biofilme é um modo protegido de crescimento bacteriano. Nele as células bacterianas expressam diferentes de genes de resistência (COSTERTON et al., 1999; GAJEWSKA et al., 2020) e possuem capacidade aprimorada de transferir horizontalmente genes (SOUZA et al., 2015). As células sésseis do biofilme são resistentes à resposta imune e a antibióticos, pois estes têm dificuldade de penetrar toda a profundidade do biofilme. As substâncias poliméricas que formam a matriz do biofilme retardam a difusão de antibióticos e os solutos se dispersam em taxas mais lentas no interior do biofilme do que em água. As bactérias plactônicas que se desprendem do biofilme podem causar infecções em outros locais, estimular a produção de anticorpos, que vão lesar os tecidos ao redor do biofilme.

A formação de biofilme ocorre em três etapas: 1) fixação bacteriana à superfície sólida, seguida pela transcrição de genes para a síntese de polissacarídeos extracelulares; 2) formação de microcolônias na superfície; 3) diferenciação de microcolônias em biofilme maduro envolto por polissacarídeos, onde a comunidade enclausurada adquire resistência a biocidas (COSTERTON et al., 1999; GOMES et al., 2009).

Estudos realizados com amostras de *C. diphtheriae* fermentadoras e não fermentadoras de sacarose concluíram que as amostras sacarose-positivas eram mais hidrofílicas e as amostras sacarose-negativas mais hidrofóbicas (MATTOS-GUARALDI et al., 2000). Todas as amostras de *C. diphtheriae* aderiram ao poliestireno, independente da habilidade de metabolizar a sacarose (MATTOS-GUARALDI et al., 2000, MÖLLER et al., 2021).

Fímbrias, adesinas não-fimbriais, hemaglutininas:

A interação entre bactérias e fagos permite a incorporação de genes de virulência e de resistência aos agentes antimicrobianos no genoma bacteriano (NASIM et al., 2021). A caracterização de moléculas de superfície bacterianas é necessária para a compreensão dos mecanismos de interação celular e função das adesinas e invasinas nos processos infecciosos causados por corinebactérias (MATTOS-GUARALDI et al., 1999; MATTOS-GUARALDI et al., 2014).

As espécies de *Corynebacterium* são caracterizadas por uma parede celular de complexa arquitetura com membrana plasmática associada ao peptidoglicano ligada covalentemente a um polímero de arabinogalactana associado a uma camada externa de ácidos micólicos. Na superfície celular de amostras fermentadoras e não fermentadoras de sacarose é constituída de moléculas de glicolipídeos (lipomanana e lipoarabinomanana), polissacarídeos, proteínas, incluindo adesinas e porinas formadoras de canais (BURKOVSKI, 2013; BURKOVSKI, 2018; MATTOS-GUARALDI et al 1998; MOREIRA et al., 2008).

Fímbrias, adesinas não-fimbriais, hemaglutininas e proteínas expostas na superfície desempenham importante papel no processo de internalização bacteriana de células hospedeiras (SHARMA et al., 2019). Para amostras de *Corynebacterium* spp., a aderência e invasão do hospedeiro pode ser mediada por fímbrias ligadas covalentemente na parede celular bacteriana. Em *C. diphtheriae*, três clusters, *spaABC*, *spaDEF* e *spaGHI*, foram descritos até o momento, codificando os pili SpaA, SpaD e SpaH, respectivamente. A montagem de tais pili depende da atividade de cinco sortases, identificadas como SrtA-E (GASPAR; TON-THAT, 2006; TON-THAT; SCHNEEWIND, 2003; SWIERCZYNSKI; TON-THAT, 2006). Análises do papel destes *pilus* revelaram que o *pili* SpaA está envolvido na aderência às células faríngeas, enquanto os demais parecem estar relacionados à adesão em células laríngeas (MANDLIK et al., 2007). Dois clusters de genes para pilinas, *spaDEF* e *spaBC*, e seus respectivos genes de sortases (*srtA, srtB, srtC* e *srtD*) vêm também sendo identificados em isolados de *C. ulcerans* (SUBEDI et al., 2018; TROST et al., 2011).

Proteínas não-fimbriais promovem interação bacteriana com as células hospedeiras. No ano de 2001, foi inicialmente reportado que a proteína DIP0733 (67-72 pb) de *C. diphtheriae* era capaz de aderir na superfície de eritrócitos e células epiteliais humanas. Sabe-se atualmente que, além da atividade hemaglutinante, esta proteína se encontra envolvida nos processos de aderência, invasão, citotoxicidade e apoptose de células epiteliais (ANTUNES et al., 2015; COLOMBO et al., 2001; SABBADINI et al., 2012). Ademais, a DIP0733 interage com

fibrinogênio e com colágeno e está relacionada com a colonização e morte de *Caenorhabditis elegans*, um nematódeo utilizado como modelo de infecção *in vivo* (MÖLLER et al., 2021).

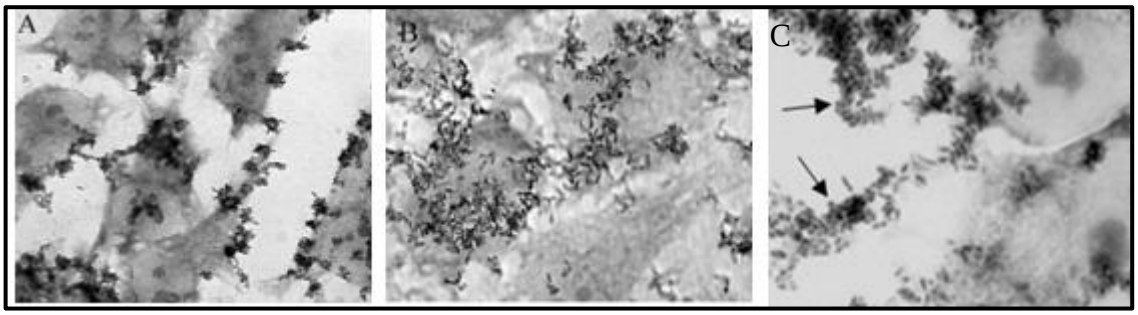
Posteriormente, foram identificadas as proteínas DIP1281 e DIP1621, e a lipoarabinomanana CdiLAM (BURKOVSKI, 2013; SHARMA et al., 2019). A proteína DIP1281 é membro da família NlpC/P60 e, além de adesina, atua na invasão da célula do hospedeiro (BURKOVSKI, 2013; OTT et al., 2010). A DIP1621 é uma hidrolase associada à parede celular, também promove aderência bacteriana nas células epiteliais e subsequente invasão (KOLODKINA; DENISEVICH; TITOV, 2011). A lipoarabinomanana CdiLAM pode atuar como adesina do epitélio respiratório humano (BURKOVSKI, 2013; MOREIRA et al., 2008, SABBADINI et al 2012).

A habilidade de interagir com células epiteliais de linhagens HEp-2, Caco-2 (adenocarcinoma colo-retal humano) e T84 (carcinoma de cólon intestinal humano) e expressar diferentes padrões de aderência tem sido utilizado por pesquisadores para indicar o potencial de virulência e invasão de patógenos bacterianos, incluindo *Escherichia coli* (BRAGA et al., 2018; KAMALI DOLATABADI et al., 2022; SHERMAN et al., 1987).

Estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa com as amostras TR-241 e CDC-E8392 de *C. diphtheriae* (DT-positivas; difiteria) demonstraram diferentes intensidades de ligação às monocamadas de células epiteliais de linhagem HEp-2, e expressão dos perfis de aderência: localizado (LA) e difuso (DA), respectivamente (Figuras 2A e 2B). O fenótipo LA predominou sobre o fenótipo DA quando investigado maior número de amostras. Entretanto, as amostras não fermentadoras de sacarose que expressavam perfil de aderência DA foram mais aderentes a células HEp-2 do que as amostras fermentadoras de sacarose. As amostras também apresentaram capacidade de induzir polimerização de actina. As proteínas de superfície não fimbriais 67-72p (DIP 0733) de *C. diphtheriae* interagiram com as membranas das células HEp-2 (HIRATA et al., 2002; HIRATA et al., 2004).

Amostras de *C. diphtheriae* biovar *mitis* (n = 4) e *C. diphtheriae* biovar *gravis* (n = 1) isoladas de sangue exibiram perfis de aderência do tipo agregativo (AA) em células de linhagem HEp-2 (Figura 2C). Amostras invasivas com perfis de aderência AA agregativa de *C. diphtheriae* apresentaram cinco perfis clonais distintos avaliados por ensaios de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). Apesar da diversidade clonal, todas as cinco isoladas de quadros de endocardite pareceram exibir propriedades adesivas bacterianas especiais capazes de favorecer a ruptura da barreira sanguínea e a disseminação sistêmica dos patógenos. Consequentemente, o perfil de aderência agregativa pode ser usado como uma indicação de algum potencial invasivo de amostras de *C. diphtheriae* (HIRATA et al., 2008).

Figura 2 - Perfis de aderência expressos por amostras de *Corynebacterium diphtheriae* em células de linhagem HEp-2



Legenda: A, Localizado (LA) – amostra TR-241; B, Difuso (DA) – amostra CDC-E8392; C, Agregativo (AA) – amostra HC01 (endocardite).
Fonte: Adaptado de Hirata et al., 2004 e 2008.

Glicoconjugados:

As moléculas contendo N-acetilglucosamina (D-GlcNAc), N-acetilgalactosamina (D-GalNAc), galactose (D-Gal), manose-like (D-Man-like) e resíduos de ácido siálico na superfície de amostras *C. diphtheriae* podem ser facilmente reconhecidos por lectinas. A prevalência desses carboidratos em amostras patogênicas sugere que estas estruturas estão relacionadas a mecanismos de sobrevivência bacteriana em humanos (MATTOS-GUARALDI et al., 2000).

Em ambientes com baixas concentrações de ferro, ocorre aumento da expressão bacteriana de D-Gal, D-Man-like e D-GalNAc e consequente redução da ligação de D-GlcNAc e ácido siálico. O ferro é essencial para o crescimento bacteriano, porém é encontrado no organismo humano como metaloproteínas e glicoproteínas, e raramente de forma livre e em baixos níveis. Adicionalmente, um dos mecanismos de evasão da resposta imune do hospedeiro aos processos infecciosos é a hipoferremia. Nesse sentido, *Corynebacterium* spp. produzem várias alternativas metabólicas para captação de ferro do hospedeiro para expressar fatores de virulência como citotoxinas, sideróforos, heme oxigenasse. Estudo anterior realizado pelo nosso grupo de pesquisa demonstrou que a limitação de ferro aumentou a autoagregação e aderência de amostras de *C. diphtheriae* a eritrócitos e células epiteliais HEp-2, em decorrência de uma menor expressão de resíduos de ácido siálico na superfície bacteriana (MOREIRA et al, 2003).

Enzimas neuraminidase (NanH) e trans-sialidase:

Alguns patógenos produzem enzimas neuraminidases ou sialidases caracterizadas como glicosídeos–hidrolases na superfície celular capazes remover resíduos ácido N-acetilneuramínico de mucinas, glicoproteínas, gangliosídeos e de alguns homopolímeros da superfície das células dos hospedeiros para modificar a resposta do hospedeiro frente às infecções, dificultando o reconhecimento e favorecendo a evasão dos microrganismos à resposta imune, auxiliando o processo invasivo e aumentando a severidade da infecção em humanos (BURKOVSKI, 2013; CORRÊA et al., 2022; MATTOS-GUARALDI et al., 2000).

Amostras de *C. diphtheriae* são capazes de produzir a enzima *trans*-sialidase que produz a asialoglicoconjugados nas células hospedeiras. Os resíduos de ácido siálico são liberados no meio ambiente e ão transferidos pela enzima *tras*-sialidase e fixados às superfícies das células bacterianas (MATTOS-GUARALDI et al., 2000).

Endoglicosidase, Cp40, EndoE, proteases:

As glicosidases são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas em cadeias de glicanos. Há dois tipos de glicosidases: exoglicosidases, que clivam carboidratos terminais de estruturas de glicanos; e endoglicosidases, que hidrolisam ligações no interior das cadeias de glicanos (SHADNEZHAD; NAEGELI; COLLIN, 2016).

Em C*orynebacterium pseudotuberculosis* foi primeiramente identificado CP40, uma endoglicosidase (endo-β-N-acetilglucosaminidase), codificada pelo gene *cpp*. Amostras de *C. ulcerans* possuem endoglicosidase GH18, (hidrolase glicosídeo família 18) que é homóloga a CP40. Estudos proteômicos com enzimas de *C. pseudotuberculosis*, *C. ulcerans* e com o domínio α da endoglicosidase EndoE de *Enterococcus faecalis*, revelou que todas as três proteínas compartilham um motivo FGH18 conservado, que é um motivo catalítico comum de glicosil hidrolases da família 18, incluindo membros com atividade da endo-β-N-acetilglucosaminidase. Há indicativos de que endoglicosidases estejam envolvidas na evasão da resposta imune adaptativa, e a imunidade contra esta proteína confere proteção contra infecção (WILSON, BRANDON, WALKER, 1995; HACKER, et al., 2016; SHADNEZHAD; NAEGELI; COLLIN, 2016; DE PINHO et al., 2024).

Para *C. ulcerans* foram ainda identificados os genes *tspA* (tripsina serina proteinase), *vsp1* e *vsp2* (serina proteinase venosa), que codificam serina proteinases que interagem com componentes teciduais e/ou com componentes do sistema imunológico do hospedeiro (TROST et al., 2011), contribuindo para a interação patógeno-hospedeiro e sobrevivência intracelular (SANGAL; BURKOVSKI, 2020).

Obtenção de ferro:

As bactérias utilizam o ferro no seu metabolismo celular e como componente de catalase para se proteger contra estresse oxidativo no interior de macrófagos (MÖLLER et al., 2021). Contudo, a disponibilidade de ferro no corpo humano é limitada para a bactéria, já que quase sempre este íon está complexado com metaloproteínas e glicoproteínas (MOREIRA et al., 2003). Além disso, durante a infecção, o organismo humano desenvolve hipoferremia, limitando ainda mais o acesso bacteriano ao ferro (MOREIRA et al., 2003). Então, ao longo de sua evolução, as bactérias desenvolveram mecanismos para absorver e utilizar os resíduos de ferro do hospedeiro que estão ligados à transferrina, lactoferrina e grupamentos heme. Sabe-se que as corinebactérias possuem sistema de captação de ferro (sideróforos), transportadores dependentes de proteínas de ligação que extraem ferro de várias fontes hospedeiro (BIBB; SCHMITT, 2010).

Em *C. diphtheriae*, diversos sistemas de captação de ferro têm sido descritos, como os codificados pelos óperons *hmuTUV* (em associação com as proteínas HtaA and HtaB) e *irp6* (composto pelos genes *irp6A*, *irp6B* e *irp6C*) e o cluster de sete gene *ciu* (*ciuA*-*G*). Além disso, outras proteínas possivelmente envolvidas neste processo têm sido preditas (MÖLLER et al., 2021).

Resistência ao telurito:

O telurito (TeO_3^{-2}) é um agente tóxico que possui forte atividade oxidativa. Amostras de *C. diphtheriae* expressam diferentes níveis de resistência a este agente. Até o momento, um gene, *CDCE8392_0813* (*DIP1421*) foi identificado e relacionado à resistência contra este agente e compostos da defesa intracelular, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (SANTOS et al., 2015c).

Mecanismos de virulência relacionados ao estresse oxidativo:

Durante o processo de infecção bacteriana, os macrófagos atuam como a primeira linha de defesa do hospedeiro. A bactéria fagocitada pelo macrófago é envolvida pelo fagossoma que posteriormente se une ao lisossoma para formar o fagolisossoma; nesta organela a bactéria é morta pela liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs) a atuação de enzimas hidrolíticas (MÖLLER et al., 2021).

As corinebactérias possuem mecanismos de evasão para a exposição a níveis altos de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de espécies reativas de nitrogênio (ERNs) (CAPPELLI

et al., 2022). Em *C. diphtheriae,* foram identificadas cinco proteínas relacionadas com a redução de EROs ou ERNs: DIP0574, DIP1231, DIP1362, DIP1779 e DIP1911 (MÖLLER et al., 2021). Além disso, Cappelli e colaboradores (2022) investigaram o papel do regulador transcricional OxyR, sugerindo que este atua na resposta ao H_2O_2 e tem papel nos mecanismos de interação de *C. diphtheriae* com o hospedeiro. As corinebactérias também expressam uma enzima superóxido dismutase depenedente de manganês (*sodA*), identificada como DIP2261, que confere viabilidade celular. As bactérias mutantes apresentaram maior sensibilidade aos radicais superóxidos (MÖLLER et al., 2021).

Genes e proteínas relacionados aos mecanismos de patogenicidade e de sobrevivência de corinebactérias:

Na Tabela 1, estão listadas diversas proteínas e/ou genes relacionados à virulência, resistência aos agentes antimicrobianos e mecanismos de sobrevivência em condições de estresse de amostras *Corynebacterium* spp. potencialmente produtoras de TD.

Tabela 1 – Fatores provavelmente envolvidos com virulência de *Corynebacterium* spp. potencialmente produtoras de toxina diftérica.

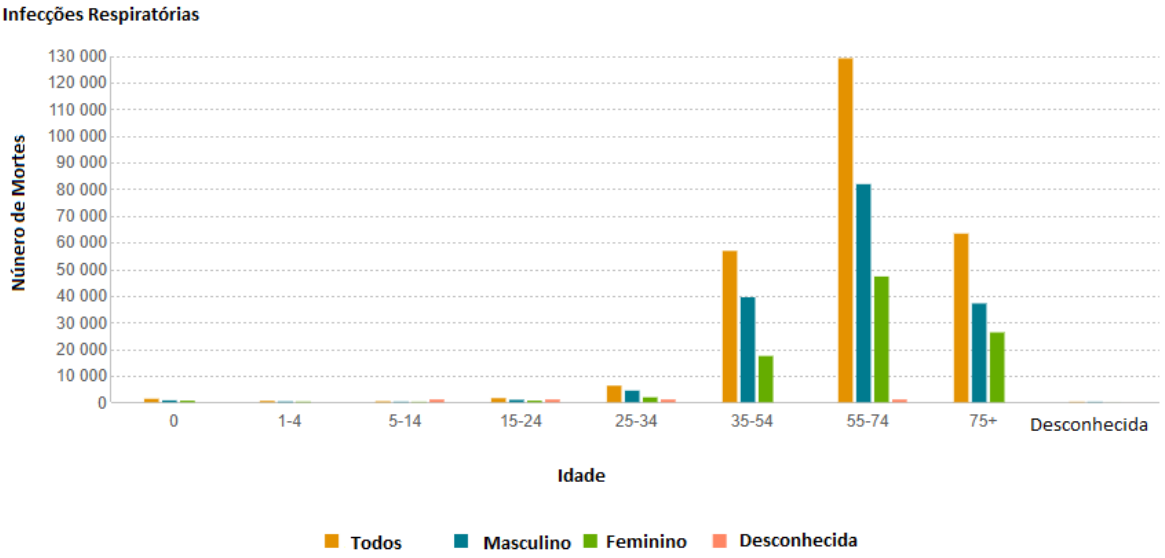
Fator	Funções
DIP0600	Biossíntese e transporte de ferro
DIP1086	
DIP0585	
DIP2327	
DIP0597	
DIP2267	Homeostase de grupamento heme
DIP1394	
DIP2303	Oxirredução ou nitrogênio redução
DIP1231	
DIP1362	
DIP1779	
DIP1911	
DIP2261/SodA	Superóxido dismutase
CdiLAM	Adesina
DIP0733	Hemaglutina, adesina, invasina, indução de apoptose
DIP0823	Interação e sinalização celular
DIP1420/DirA	Interação e sinalização celular; armazenamento de grupamento heme
Spa (A-I)	Pilinas
Str	Sortases (montagem de pilinas)
DIP1281	Proteína de interação/ Adesinas e invasina
DIP1621	Hidrolase associada à parede celular
NanH	Precursor de sialidase (neuraminidase H)
Pld	Fosfolipase D
Rbp	Proteína de ligação ao ribossomo Shiga-like
Toxina diftérica	Exotoxina do tipo AB inibidora da síntese proteica
RhuM	Invasina
Cp40/ GH18	Serina protease
OxyR	Regulador transcricional
HtaA	Proteína de ligação ao grupamento heme
HtaB	Proteína de ligação ao grupamento heme
DIP1421	Resistência ao telurito

Fonte: A autora, 2023.

1.7 **Infecções no trato respiratório inferior**

As infecções das vias respiratórias inferiores, como as pneumonias, são responsáveis por um elevado número de casos e óbitos no ambiente hospitalar e na comunidade, acometendo principalmente paciente idosos (SADER et al., 2001). A Figura 3 apresenta a distribuição de casos de infecções respiratórias por idade ocorridos no Brasil em 2021.

Figura 3 - Casos de infecções das vias respiratórias inferiores ocorridos no Brasil no ano 2021



Notas: Dados obtidos na página <https://platform.who.int/mortality/themes/theme-details/topics/topic-details/MDB/respiratory-infections.
Fonte: A autora, 2023.

A pneumonia é uma infecção do parênquima pulmonar que apresenta elevado índice de morbidade e mortalidade, ocorrendo aproximadamente 400.000.000 por ano no mundo (LEUNG; WONG.; HON, 2018; WHO, 2023). Os principais microrganismos causadores de pneumonia comunitária são *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Moraxella catarrhalis* e microrganismos anaeróbios. No ambiente hospitalar, os microrganismos mais comuns são *Klebsiella*

pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter baumanii e *Staphylococcus aureus* (*Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina - MRSA) (SATTAR; SHARMA, 2023). Entretanto, diversas espécies do gênero *Corynebacterium* spp. já foram reportadas como capazes de causar infecções de tipos diversos no trato respiratório inferior de pacientes de diferentes faixas etárias, incluindo: (i) Potencialmente produtoras de TD – *C. diphtheriae, C. ulcerans*; *C. belfantii, C. pseudotuberculosis;* (ii) Espécies não produtoras de TD - *C. accolens, C. afermentans, C. argentoratense, C. coyleae, C. jekeium, C. macginleyi, C. mucifaciens, C. propinquum, C. pseudodiphtheriticum, C. resistens. C. simulans, C. sputi, C. striatum, C. thomssenii, C. urealyticum* (MATTOS-GUARALDI; SANTOS; VIEIRA, 2023).

Além de casos clássicos de pneumonia foram relatados outros tipos de infecção no trato respiratório inferior causados por algumas amostras MDR e não-MDR de espécies patogênicas corinebactérias, tais como: infecção pleuropulmonar necrotizante, abscesso pulmonar, traqueobronquite, granuloma pulmonar necrotizante, traqueíte, bronquite, pneumonia em pacientes submetidos à ventilação mecânica (MATTOS-GUARALDI; SANTOS; VIEIRA, 2023).

Os principais fatores de risco para pneumonia incluem: idade maior que 65 anos, infecções respiratórias virais, como gripe, tabagismo, doenças imunossupressoras (HIV, transplante, câncer), DPOC (bronquite crônica e enfisema pulmonar), uso drogas, doentes acamados, hospitalizações prolongadas, pacientes em ventilação mecânica (em uso de respirador artificial), pacientes com outra doença pulmonar prévia (sequelas de tuberculose, bronquiectasias, fibrose cística, além de outras) (ASTON, 2017; JAIN et al., 2015; ZAKRZEWICZ et al., 2016).

Pneumonias podem levar à sepse e costumam ser importante causa de morte de pacientes imunocomprometidos. Inversamente, a morte de pacientes com sepse grave é causada principalmente por disfunção de múltiplos órgãos, sendo o sistema respiratório o mais frequentemente afetado. Adicionalmente, quadros de pneumonia ocorrem em 9 a 27% dos pacientes submetidos a ventilação mecânica, sendo a intubação endotraqueal o principal fator de risco (KALIL et al., 2016).

1.8 **Alvéolos pulmonares**

O sistema respiratório é formado pelas vias respiratórias e pelos pulmões. Os órgãos que compõem as vias respiratórias são: cavidades nasais, faringe, laringe, traqueia e brônquios. Cada brônquio penetra em um dos pulmões e divide-se em diversos ramos menores, que se

distribuem por todo o órgão, formando os bronquíolos que se ramificam e subdividem-se várias vezes, formando a árvore brônquica.

Os alvéolos pulmonares são estruturas que apresentam paredes muito delgadas, constituindo a maior parte do parênquima pulmonar, que são responsáveis pelo aspecto esponjoso característico do pulmão. Cada pulmão é envolvido por dupla membrana (pleura) e internamente, apresenta cerca de 200 milhões de alvéolos pulmonares. Cada alvéolo recebe ramificações de um bronquíolo. Nos alvéolos, realizam-se as trocas gasosas entre o ambiente, denominada hematose, em decorrência da presença de membranas muito finas que revestem os alvéolos revestidos por inúmeros capilares sanguíneos (ROSS; PAWLINA, 2012).

O epitélio alveolar é um componente importante da resposta imune inata do pulmão. Ao fornecer uma barreira anatômica que separa o organismo do ambiente externo, o epitélio alveolar serve como uma primeira linha de defesa contra patógenos bacterianos e virais inalados. Enquanto as células do sistema imunológico inato, como macrófagos alveolares e células dendríticas, abrigam a maior parte da responsabilidade de desencadear uma reação imune ao encontrar patógenos inalados, as células que compõem o epitélio alveolar também são implicadas em ajudar a desencadear um processo de resposta inflamatória (DA COSTA et al., 2020).

A barreira ar-sangue é formada principalmente por dois tipos de células epiteliais alveolares: pneumócitos tipo I e II. Os pneumócitos tipo II, de morfologia cubóide e produtoras de surfactante, servem como células progenitoras para os pneumócitos tipo I, que apresentam formato mais achatados e são responsáveis pelas trocas gasosas (BRANDT; MANDIGA, 2022; FEHRENBACH, 2001; WILLIAMS, 2003).

Os alvéolos pulmonares formam uma fina barreira eficaz que expressa conexões intercelulares estreitas, protegendo o corpo humano de estímulos externos, incluindo, toxinas inaladas, partículas e microrganismos (CRANDALL; MATTHAY, 2001; FEHRENBACH, 2001; ROSS; PAWLINA, 2012). Adicionalmente, permitem o transporte transcelular de solutos e gases por difusão passiva ou transporte ativo. Os pneumócitos tipo II, embora representem quase 60% das células epiteliais, constituem aproximadamente 3% das células presentes na superfície alveolar (KUEHN et al., 2016; KLETTING et al, 2018).

A secreção de surfactante no alvéolo pulmonar é essencial para manter as funções pulmonares. Os pneumócitos tipo II, responsáveis pela produção do surfactante pulmonar, têm capacidade regenerativa e ocasionalmente podem substituir os pneumócitos tipo I quando esses são danificados. Os pneumócitos tipo I responsáveis pelas trocas gasosas também são chamados de pneumócitos membranosos e revestem a maior parte da superfície alveolar (> 95%), sendo

células muito susceptíveis a lesões e caracterizadas como tipo permanente uma vez que não possuem a capacidade de proliferação (KLETTING et al, 2018.; DIEM, et al., 2020).

Os macrófagos presentes na estrutura alveolar são responsáveis pela eliminação de partículas e de microrganismos contaminantes do trato respiratório inferior. Os macrófagos possuem importante função na secreção de citocinas que podem tanto estimular como inibir o crescimento celular. Sabe-se que alguns tipos de interferon são capazes de reduzir a replicação celular, interferindo com a substituição celular no alvéolo pulmonar. Da mesma forma, nicotina, alcatrão e outros alcaloides presentes no tabaco podem inibir a secreção de surfactante, podendo induzir a estenose alveolar (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017; NAEEM; RAI; PIERRE, 2022).

1.9 **Pesquisas de mecanismos de interação com tecidos pulmonares**

Em 1959, Russell e Burch propuseram os três Rs: *Replacement, Reduction and Refinement"* (Substituir, Reduzir e Refinamento) como princípios da técnica experimental humana para melhorar o bem-estar animal. Substituição: de animais por métodos alternativos; Redução: redução do número de animais utilizados para obter informações de determinada quantidade e precisão; Refinamento: qualquer diminuição na severidade dos procedimentos desumanos aplicados aos animais que ainda precisam ser utilizados (HUBRECHT, CARTER, 2019). Muitos tipos de trabalho o desenho experimental deve ser cuidadosamente considerado para ver se é possível que os animais possam ser "substituídos", os números usados "reduzidos" ou a técnica experimental "refinada" (FLECKNELL, 2002).

Nas últimas décadas, experimentos empregando modelos com células e tecidos humanos têm sido cada vez mais estudados e aprimorados para serem utilizados como métodos alternativos nos estudos realizados com modelo animal, uma vez que contribuem para o esclarecimento da complexidade da interação com os tecidos humanos observados *in vitro* (KUEHN et al., 2016; CARIUS et al., 2023).

Pneumócitos tipo II de linhagem A-549 (ATCC CCL-185) foram isolados em 1972 de carcinoma pulmonar de homem caucasiano de 58 anos (GIARD et al., 1973; FOSTER et al., 1998; LIEBER et al., 1976). Diversos estudos foram realizados com este modelo celular, para investigar a produção de lectinas e atividades anti-carcinogênicas de fármacos, além de interações com microrganismos incluindo *S. pneumoniae* (ZAKREWICZ et al., 2016), *S. agalactiae* (DA COSTA et al., 2016; SHARMA et al., 2013), *Streptoccocus pyogenes* (ABBOT

et al., 2007), *Pseudomonas aeruginosa* (AZGHANI et al., 2002) e *Staphylococcus lugdunensis* (PEREIRA et. al., 2012).

Macrófagos pulmonares de linhagem U-937 (ATCC CRL-1593.2) isolados de paciente com linfoma histiocítico (efusão pleural) vêm sendo utilizados em experimentos desde 1979. Tais células são capazes de secretar diversas citocinas e quimiocinas, tanto constitutivamente (IL-1 e GM-CSF) quanto em resposta a estímulos solúveis. Tanto o TNF-α quanto o GM-CSF promovem a expressão de IL-10 pelas células U-937. Este modelo celular também tem sido empregado nos estudos de interações com microrganismos, sendo um dos mais utilizados para avaliação de *Mycobacterium tuberculosis* (SHI et al., 2018; ZHANG et al., 2017).

Diversos estudos vêm também buscando mimetizar o alvéolo pulmonar através do co-cultivo de pneumócitos e macrófagos com diferentes finalidades. Uma destas pesquisas investigou se carvão ou outros resíduos eram capazes de atuar no epitélio direta ou indiretamente. Os pneumócitos do tipo II e macrófagos alveolares expostos a partículas em co-culturas demonstraram que os resíduos de carvão aumentaram a síntese de componentes da matriz extracelular por pneumócitos do tipo II. Os macrófagos alveolares cultivados isoladamente não produziram matriz extracelular. Similarmente, nas co-culturas de pneumócitos tipo II com macrófagos foi observado nível baixo na síntese de matriz extracelular epitelial contendo fibronectina (LEE; RANNELS, 1996).

Estudos utilizando co-cultivos de células pneumócitos tipo I hAELVi e macrófagos THP-1 visando caracterizar a morfologia, viabilidade e funções das barreiras celulares foram reportados. Os dados obtidos enfatizaram que os ensaios de co-cultivo representam um modelo *in vitro* adequado para estudo relacionado a inalação de produtos químicos, drogas e nanopartículas, além de infecções por patógenos diversos. Os macrófagos permaneceram viáveis e distribuídos homogeneamente nas monocamadas durante 7 dias. A análise comparativa com monocultivos celulares demonstrou que os pneumócitos tipo I foram mais tolerantes a prata e amido do que os macrófagos. Entretanto, a viabilidade dos pneumócitos em co-cultivos foi similar a observada em monocultivos (CARIUS et al., 2023; KLETTING et al., 2018).

Mycobacterium tuberculosis infecta tanto células epiteliais alveolares como macrófagos, sendo realizados estudos desde o ano de 1996 empregando as linhagens de células epiteliais alveolares A-549 e macrófagos U-937 nas investigações da interação entre micobactérias e células-alvo (AUNG et al. 1996; BERMUDEZ; GOODMAN 1996; CHINGWARU et al., 2016). A análise de componentes da proteína transmembranar Rv2707 de *M. tuberculosis* demonstrou que os peptídeos 16072 e 16084 apresentaram intensa ligação

específica tanto para pneumócitos da linhagem A-549 quanto para os macrófagos da linhagem da U-937. Os peptídeos 16083 e 16084 além de apresentaram elevada afinidade de ligação, também foram capazes de inibir a invasão de pneumócitos tipo II (CHAPETON-MONTES et al., 2008). Posteriormente, sequências peptídicas da proteína de membrana Rv0180c investigadas foram capazes de inibir a invasão de *M. tuberculosis* em pneumócitos A-549 ou macrófagos U-937 em níveis significativos (CÁCERES et al., 2011).

A infecção por *M. tuberculosis* causa diferentes níveis de apoptose e necrose em macrófagos humanos e células epiteliais alveolares. Foi investigada a capacidade destes patógenos de induzir a apoptose e necrose em macrófagos humanos (U-937) e células epiteliais A-549. As análises demonstraram que tanto a amostra de *M. tuberculosis* virulenta quanto a atenuada foram capazes de induzir apoptose em macrófagos. A amostra atenuada causou apoptose significativamente maior do que a amostra virulenta após 5 dias de infecção. Entretanto, a citotoxicidade para as células alveolares foi decorrente de necrose, mas não de apoptose. A infecção com amostras de *M. tuberculosis* resultou em apoptose de 14% das células das monocamadas e 59% de morte celular associada à necrose foi observada das células epiteliais alveolares após 5 dias de infecção. Após *M. tuberculosis* infectar pneumócitos tipo II a apoptose foi inibida pela produção de caspases-1, 3 e 10. A inibição da replicação de bactérias intracelulares resultou em um aumento de apoptose em macrófagos e pneumócitos tipo II (DANELISHVILI et al., 2003).

Burkholderia pseudomallei é agente etiológico da melioidose, doença cada vez mais reconhecida como importante causa de morbidade e mortalidade e que pode se apresentar em uma variedade de formas clínicas, sendo as mais frequentes a pneumonia e a septicemia. Amostras de *B. pseudomallei* tem a capacidade de invadir linhagens de células cultivadas, incluindo pneumócitos tipo II de linhagem A-549, células epiteliais de linhagens HeLa e Vero. Foi verificada a sobrevivência intracelular e a presença no interior de vacúolos em macrófagos alveolares de linhagem U-937. Além disso, a visualização por microscopia eletrônica de células HeLa infectadas por *B. pseudomallei* e leucócitos polimorfonucleares detectou a presença de bactérias no interior de vacúolos intracitoplasmáticos e ligados à membrana celular (JONES; BEVERIDGE; WOODS, 1996).

O patógeno *Mycoplasma pneumoniae* pode causar quadros de traqueobronquite e pneumonia atípica, além de infecções extrapulmonares em humanos. Em ensaios de interação celular com *M. pneumoniae*, a presença de IL-1b foi verificada em pneumócitos de linhagem A-549. Adicionalmente foi observado o aumento dos níveis de mRNA e proteína extracelular nas células macrófagos de linhagem U-937. A infecção por *M. pneumoniae* não influenciou o

mRNA da caspase-1 de ambas as linhagens celulares. A atividade reduzida da caspase-1 em lisados de células A-549 indica a presença de um componente inibidor de caspase-1 em pneumócitos tipo II. Os dados demonstraram que *M. pneumoniae* é um potente indutor de citocinas após o processo de aderência às células-alvo do hospedeiro e liberação de IL-1b (YANG et al., 2003).

2 **RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA**

Infecções invasivas, tais como pneumonia, endocardite e sepse, podem ser causadas por amostras TD-positivas e TD-negativas de *C. diphtheriae* e *C. ulcerans*, independentemente da imunização prévia contra difteria. Contudo, os fatores de virulência destas espécies que contribuem para o desenvolvimento de tais processos infecciosos ainda não foram compreendidos. Logo, estudos buscando investigá-los são ainda necessários.

Até o momento, não é possível mimetizar a estrutura alveolar na sua integridade *in vitro*, em grande parte devido ao fato dos pneumócitos do tipo I não poderem ser replicados em tais condições. Apesar de não possuírem as mesmas funções dos pneumócitos do tipo I, que estão presente em maior frequência na estrutura de superfície alveolar, os pneumócitos tipo II de linhagem contínua A-549 teêm sido utilizados nas interações com microrganismos em modelos celulares. Alguns pesquisadores também vêm trabalhando com células diferenciadas em macrófagos ativados de linhagem U-937.

Considerando que, até o presente momento, não foram reportadas na literatura pesquisas com modelos de experimentos *in vitro* que simulassem a estrutura do alvéolo pulmonar infectado com amostras de *Corynebacterium* spp., propomos este estudo utilizando co-cultivos de pneumócitos do tipo II A-549 e macrófagos pulmonares de linhagem U-937.

3 **OBJETIVOS**

3.1 **Objetivo Geral**

Investigar a interação de amostras de *Corynebacterium diphtheriae* e *Corynebacterium ulcerans* com pneumócitos tipo II (linhagem A-549) e macrófagos humanos (linhagem U-937), cultivadas isoladamente ou em co-cultivo no modelo alveolar *in vitro*, correlacionando com as propriedades adesivas em susperfícies abióticas e com a produção de *slime*.

3.2 **Objetivos específicos**

a) Analisar qualitativamente a interação bacteriana com pneumócitos A-549;
b) Analisar qualitativamente a interação bacteriana com macrófagos U-937;
c) Construir um modelo de alvéolo pulmonar *in vitro* empregando co-cultivo de células U-937 e A-549;
d) Analisar qualitativamente a interação bacteriana com as células U-937 e A-549 co-cultivadas no modelo alveolar;
e) Analisar quantitativamente a interação bacteriana com as células U-937 e A-549 co-cultivadas no modelo alveolar;
f) Avaliar a capacidade de produção de *slime* em meio vermelho do Congo pelas amostras de *C. diphtheriae* e *C. ulcerans*;
g) Investigar a capacidade de produção de biofilme pelas amostras em superfícies abióticas (poliestireno e vidro);
h) Correlacionar as propriedades adesivas investigadas.

4 **MATERIAIS E MÉTODOS**

4.1 **Origem e características das amostras bacterianas**

As seis amostras estudadas, cujas características se apresentam descritas na Tabela 2, pertencem às espécies potencialmente produtoras de TD *C. diphtheriae* (n=03) e *C. ulcerans* (n=03). Elas foram previamente isoladas do trato respiratório de humanos (n=05) e de cão (n=01).

As amostras estavam estocadas em caldo *Tripticase Soy Broth* (TSB; HiMedia, Índia) contendo 20% de glicerol a -80ºC no Laboratório de Difteria e Corinebactérias de Importância Cínica (LDCIC), lotado na Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), e tiveram sua identificação previamente realizada por espectrometria de massas MALDI-TOF. Após a recuperação do estoque em meio ágar sangue de carneiro 5%, as amostras foram utilizadas nos experimentos.

Tabela 2 - Características das amostras de *Corynebacterium* spp. utilizadas no presente estudo

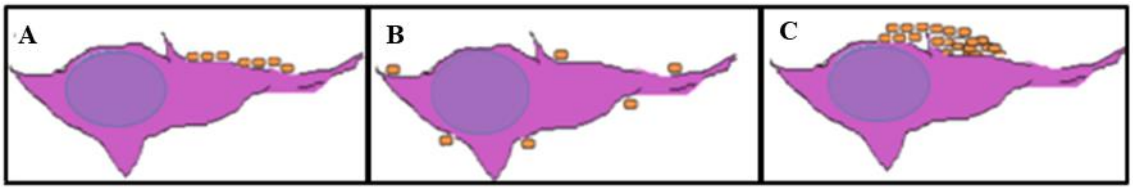
Amostras	Biovar/Origem	Características
C. diphtheriae		
CDC-E8392	*mitis* /Difteria (USA)	TD-positiva; não fermentadora de sacarose
TR-241	*mitis* /Difteria (Rio de Janeiro, Brasil, 1981)	TD-positiva; fermentadora de sacarose
INCA-402	*belfanti*/ Pneumonia em paciente com neoplasia (INCA - Rio de Janeiro, 2000)	TD-negativa; não fermentadora de sacarose
C. ulcerans		
809	Pneumonia fatal em humano (Rio de Janeiro, 2000)	TD-negativa; Shiga-like-positiva; PLD-positiva
2590	Difteria associada a mononucleose infecciosa em adolescente (Pernambuco, Brasil, 2010)	TD-negativa; PLD-negativa
BR-AD22	Nasofaringe de cão assintomático (Rio de Janeiro, 2014)	TD-negativa; PLD-positiva

Legenda: CDC, Centers for Disease Control and Prevention; INCA, Instituto Nacional do Câncer, DT, toxina diftérica, PLD, fosfolipase D.
Fonte: A autora, 2023.

4.2 **Ensaios de interação bacteriana com células eucarióticas co-cultivadas (modelo experimental de alvéolo pulmonar)**

Cultivo das células eucarióticas e preparo das monocamadas - As linhagens de células A-549 (linhagem de epiteliais pulmonares - ATCC/CCL-185) e U-937 (linhagem de monócitos oriundas de efusão pleural– ATCC/CRL-1593.2) foram mantidas em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Gibco, EUA) contendo 50 µg/ml de agentes antimicrobianos (fungizona e gentamicina) e 10% de soro fetal bovino (Gibco) (HIRATA et al., 2002, DOS SANTOS et al., 2010). As monocamadas celulares foram preparadas com 5 x 10^5 células/ml sobre lamínulas de vidro em placas de 24 poços e em microplacas de 96 poços, próprias para cultura de tecidos, para realização dos ensaios qualitativos e quantitativos, respectivamente. A aderência das células U-937 foi induzida pela adição de 0,25 ng/ml de PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate; Sigma-Aldrich, EUA) ao meio de cultura. Figura 4 apresenta o padrão de aderência bacteriana.

Figura 4 - Padrão de aderência bacteriana



Legenda: A, Localizado (LA); B, Difuso (DA); C, Agregativo (AA).
Fonte: A autora.

Células eucarióticas co-cultivadas - Para construção do modelo experimental de alvéolos pulmonares, as células U-937 e A-549 em concentrações de 1 x 10^4 células/ml e 5 x 10^5 células/ml, respectivamente, foram co-cultivadas sobre as lamínulas de vidro e nas microplacas de 96 poços, com base em métodos previamente descritos para outros patógenos (Yuan et al., 2014) e como descrito no item anterior.

Preparo das suspensões bacterianas - Para a utilização nos ensaios de interação com as células de linhagem cultivadas separadamente ou em co-cultivos, as amostras de *C. diphtheriae* e *C. ulcerans* foram previamente cultivadas em meio TSA (*Tripticase Soy Agar*, HiMedia) e

incubadas em aerobiose a 37ºC por 48 h. Posteriormente, as amostras foram cultivadas em meio TSB sob agitação por 18h a 37°C e lavadas três vezes com PBS (*Phosphate Buffered Saline*) 1M e ressuspensas em DMEM na turbidez equivalente a densidade óptica de 0,6 em λ=580nm 580 nm, em concentração de 2,5 x 10^5 Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/ml.

Ensaios qualitativos de interação bacteriana com células eucarióticas separadamente ou co-cultivadas (modelo experimental de alvéolo pulmonar) – Após realizados os procedimentos descritos acima, as placas contendo monocamadas de células foram inoculadas com 500 µl/poço de suspensões bacterianas. Alguns poços foram reservados para o controle, não sendo infectados. As placas foram incubadas a 37ºC em atmosfera de 5% CO_2 por 1h, 2h e 4h. Após cada período de incubação, foram removidos os sobrenadantes, lavadas as monocamdas com PBS e adicionados 400µl de solução paraformaldeído 2%. Em seguida, os tapetes celulares foram lavados três vezes PBS e corados com GIEMSA (DOS SANTOS et al., 2010, SHI et al., 2018; ZHANG et al., 2017). Finalmente, as lamínulas foram montadas com Entellan (Merck) sobre lâminas de vidro e analisadas por microscopia óptica de luz em microscópio Axioplan II (Zeiss).

Ensaios quantitativos de interação bacteriana com células eucarióticas separadamente ou co-cultivadas (modelo experimental de alvéolo pulmonar) - Os ensaios quantitativos de interação celular foram realizados através da contagem de bactérias viáveis (UFC/ml). Orifícios das microplacas contendo as células cultivadas em monocamadas foram inoculados com 200 µl de suspensão bacteriana. Em seguida, as placas foram incubadas durante 3h, 6h e 24h a 37ºC em atmosfera de aproximadamente 5% de CO_2 com umidade relativa do ar de 95%. Posteriormente, as monocamadas foram lavadas seis vezes com solução salina tamponada contendo 0,5% v/v de solução de sais minerais de Dulbecco (PBS-D) e lisadas através da adição de PBS-D contendo 0,1% de Triton X100 (Biorad, EUA). Após a diluição do inóculo em PBS-D, alíquotas de 10µl foram semeadas na superfície de placas de TSA e incubadas por 48h a 37ºC. Para os ensaios de invasão e viabilidade bacteriana no ambiente intracelular, após o intervalo de tempo de aderência, as monocamadas foram tratadas com gentamicina (150 µg/ml por 60 min). Em seguida, as monocamadas foram lisadas com PBS-D contendo 0,1% de Triton X100 e novas alíquotas de 10 µl diluídas e plaqueadas para contagem das viáveis (HIRATA et al., 2002).

Análise estatística -Todos os ensaios foram executados em triplicata e repetidos pelo menos três vezes. Os testes estatísticos apropriados foram realizados no software GraphPad Prisma versão 9.0, sendo considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

4.3 **Avaliação da capacidade de produção de *slime* em meio vermelho do Congo**

A expressão da produção de *slime* de natureza polissacarídica foi avaliada através do método de crescimento em Ágar Vermelho do Congo (CRA), segundo Freeman e colaboradores (1989). A produção de *slime* foi investigada no meio Vermelho do Congo, constituído de caldo infusão cérebro-coração 37g/l, sacarose 50g/l, ágar 10g/l e do corante vermelho Congo 0,8g/l. O corante Vermelho do Congo foi preparado em solução aquosa concentrada, autoclavado separadamente a 121ºC por 15 minutos, sendo o ágar adicionado quando o meio atingiu a temperatura de 55ºC. As amostras foram semeadas sobre o meio vermelho do Congo, incubadas a 37ºC em aerobiose por 24h e, em seguida, mantidas em temperatura ambiente por mais 48h. As amostras que apresentam colônias negras são consideradas *slime* positivas, enquanto as que exibem colônias de coloração vermelha são definidas como não produtoras de *slime*. No presente estudo foram utilizadas como controles negativo e positivo, as amostras *Staphylococcus epidermidis* ATCC1228 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC-35984, respectivamente.

4.4 **Ensaios de formação de biofilme**

Ensaios de produção de biofilme em superfícies abiótica hidrofóbica de poliestireno - A produção de biofilme na superfície de poliestireno foi avaliada de forma semiquantitativa em placas de 96 orifícios através do método descrito por Stepanovic e colaboradores (2000) modificado por Gomes e colaboradores (2009). As amostras foram cultivadas em meio TSA a 37ºC por 48h e utilizadas para preparar as suspensões bacterianas com densidade ótica equivalente a 0.2 em 580 nm. Alíquotas destas suspensões foram, então, transferidas para os poços de microplacas de poliestireno e mantidas por 48h a 37ºC. Findo o tempo, os poços da placa foram lavados duas vezes com 200µl em PBS e, posteriormente 200µl de metanol foram

adicionados a cada poço e neles mantidos por 15 minutos. Após secagem, 200µl de cristal violeta a 0,2% foram colocados em cada poço por 5 minutos e a placa foi lavada exaustivamente com água destilada. Depois de seca, foram adicionados aos poços 200µl de ácido acético a 33% para eluição do corante. A avaliação de formação de biofilme foi realizada através da leitura dos poços utilizando espectrofotômetro (570 nm). Como controle positivo para o teste foi utilizada a amostra de *S. epidermidis* ATCC-35984 e o meio TSB estéril como controle negativo.

As amostras foram classificadas em quatro categorias com base na DO: não aderente e não produtora de biofilme (-) = DO obtida menor que a DO do controle negativo (DOc); fracamente aderente e fracamente produtora de biofilme (+) = DOC <DO ≤ (2xDOc); moderadamente aderente e moderadamente produtora de biofilme (++) = (2x) DOC<DO ≤ (4xDOc); fortemente aderente e fortemente produtora de biofilme (+++) = DO>(4xDOc).

Ensaios de produção biofilme na superfície hidrofílica de vidro - A técnica de ensaio de aderência aos tubos de vidro foi realizada conforme descrito por Mattos-Guaraldi & Formiga (1991). Para tal, os tubos de ensaio (15x100 mm) contendo 6 ml de TSB foram inoculados com as amostras bacterianas (~5,0 x 10^7 UFC/ml) e incubados por 48 horas a 37°C. Após esse período, o meio de cultivo foi cuidadosamente dispensado. Novo meio de cultura foi adicionado aos tubos que foram reincubados por mais 48 horas. Este processo foi repetido duas vezes. Após o terceiro descarte do meio de cultura, os tubos foram gentilmente lavados com PBS, colocados para secar a 37ºC por 16h e corados por 5 minutos com solução de cristal violeta a 2%.

As amostras foram classificadas em padrões de aderência de acordo com os seguintes critérios: I – bactérias aderidas nas laterais do tubo de vidro e na interface entre o meio de cultura e o ar; II – bactérias aderidas nas laterais do tubo de vidro; III – bactérias formando um anel na interface entre o meio de cultura e o ar; e IV – ausência de bactérias aderidas.

4.5 **Parâmetros de análise da interação bacteriana no modelo *in vitro* de alvéolo pulmonar humanno**

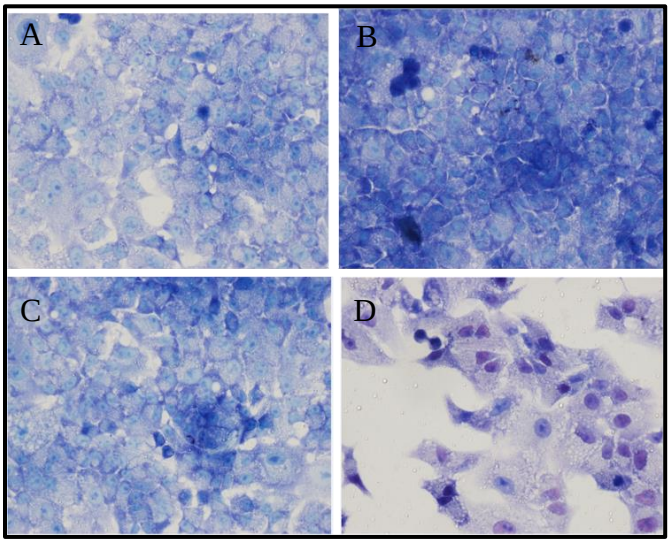
A análise comparativa das amostras permitiu classificá-las em intensidade de virulência, tendo com parâmetros: a lise do tapete celular; quantidade de bactérias aderidas no tapete celular; efeitos citotóxicos em macrófagos e/ou pneumócitos.

5 **RESULTADOS**

5.1 **Formação de monocamadas de células epiteliais pulmonares de humanos A-549**

As células da linhagem A-549 (ATCC/CCL-185) originalmente obtidas de carcinoma pulmonar humano, vem sendo usadas isoladamente como modelo experimental da função dos alvéolos pulmonares em diversos estudos com outros patógenos. A Figura 5 ilustra os tapetes que foram obtidos com as pneumócitos humanos A-549 durante o desenvolvimento de nossas pesquisas, tanto nos controles quanto nos utilizados nos ensaios de infecção.

Figura 5 - Controles de células epiteliais de linhagem A-549 (ATCC/CCL-185) observadas por microscopia óptica em diferentes tempos de formação de monocamadas

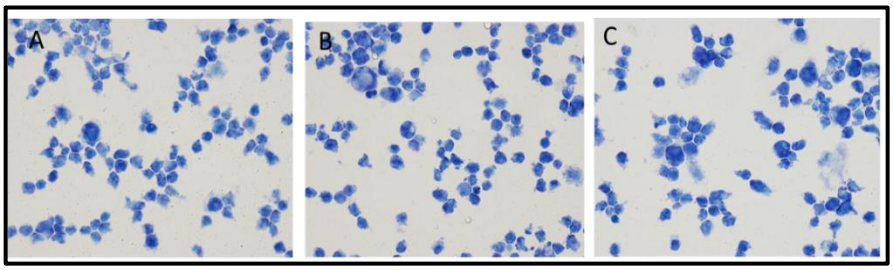


Legenda: A - 1h; B - 2h e C- 4h
Nota: aumento 40X (A, B e C) e em aumento de 100X (D).
Fonte: A autora, 2023.

5.2 **Formação de monocamadas de macrófagos pulmonares humanos U-937**

As fotomicrografias apresentadas na Figura 6 representam monocamadas que foram obtidas durante o desenvolvimento de nossas pesquisas com a linhagem U-937 de monócitos oriundos de efusão pleural.

Figura 6 - Controle de monocamadas de células de linhagem U-937 (ATCC CRL-1593.2) oriundas de linfoma histiocítico humano, visualizadas por microscopia óptica.

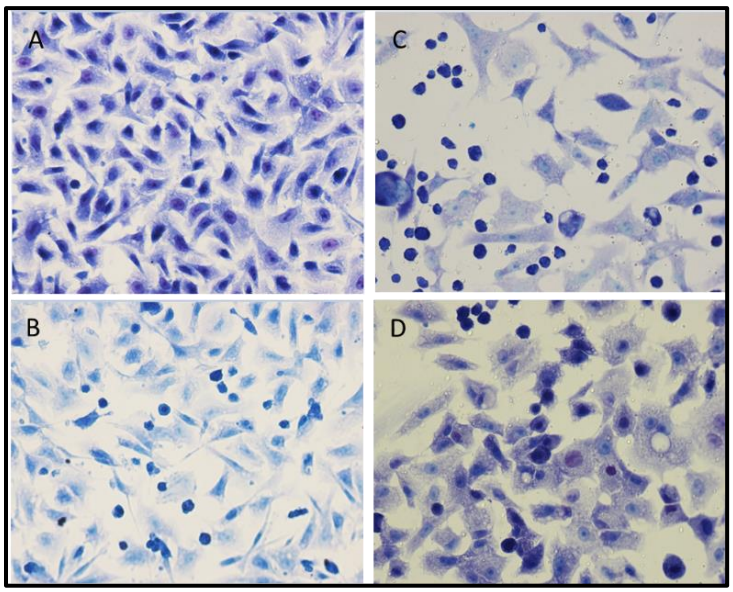


Legenda: A - 1h; B - 2h e C- 4h.
Notas: aumento 100X.
Fonte: A autora, 2023.

5.3 **Modelo de alvéolo pulmonar *in vitro* empregando co-cultivos de células U-937 e A-549**

A Figura 7 demonstra o desenvolvimento deste modelo alveolar *in vitro* empregando o co-cultivo das linhagens celulares A-549 e U-937. Durante o presente estudo, em todos os controles dos ensaios de infecção com corinebactérias, as monoscamadas apresentaram as mesmas características morfológicas e quantitativas.

Figura 7 - Modelo de alvéolo pulmonar *in vitro* empregando co-cultivos de pneumócitos da linhagem A-549 (ATCC/CCL-185) e macrófagos pulmonares da linhagem U-937 (ATCC CRL-1593.2).

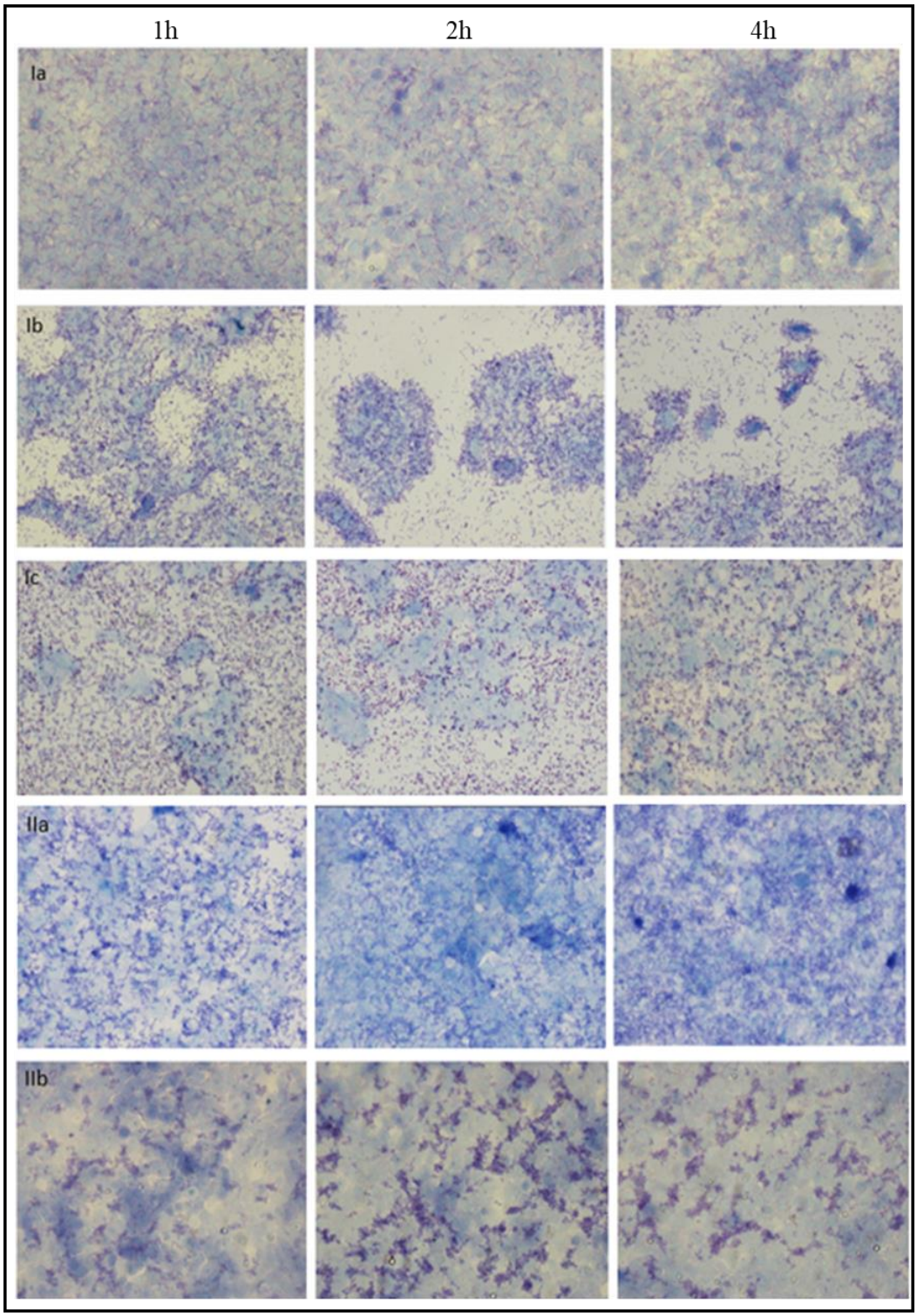


Legenda: A – Início do experimento; B - 1h; C- 2h; D – 4h.
Nota: observação por microscópia óptica em aumento de 40X (A, B e C) e 100 X (D).
Fonte: A autora, 2023.

5.4 **Interação de amostras de *Corynebacterium* spp potencialmente produtoras de TD com pneumócitos humanos da linhagem A-549**

As Figuras 8 Ia-c apresentam a interação de *C. diphtheriae* com pneumócitos de linhagem A-549. Em relação ao tempo de interação, foram observadas diferenças na capacidade desses patógenos lesarem pneumócitos de origem humana. Foram visualizadas inúmeras bactérias nas monocamadas de pneumócitos. Entretanto, a partir de 1h de incubação as duas amostras, TR-241 e INCA-402, já tinham sido capazes de lesar as monocamadas de pneumócitos, porém em diferentes intensidades. Após 4h de incubação a amostra TR-241 (*mitis*, TD-positiva; sacarose-positiva; oriunda de quadro de difteria respiratória clássica) expressou maior potencial de virulência para as células A-549, seguida da amostra INCA-402 (*belfanti*; sacarose-negativa; TD-negativa; pneumonia em paciente com neoplasia). Entretanto, a lesão de pneumócitos humanos pela amostra CDC-E8392 (*mitis*; sacarose-negativa; TD-positiva; difteria respiratória clássica) só foi observada após 4h de interação.

Figura 8 - Interação de amostras de *Corynebacterium* potencialmente produtoras de toxina diftérica com células epiteliais de linhagem A-549 (ATCC/CCL-185) observadas por microscopia óptica em diferentes tempos de infecção.



Legenda: (Ia) *Corynebacterium diphtheriae* CDC-E8392; (Ib) *C. diphtheriae* TR-241; (Ic) *C. diphtheriae* INCA-402; (IIa) *Corynebacterium ulcerans* 809; (IIb) *C. ulcerans* BR-AD22.
Nota: Observação em aumento de 100X.
Fonte: A autora, 2023.

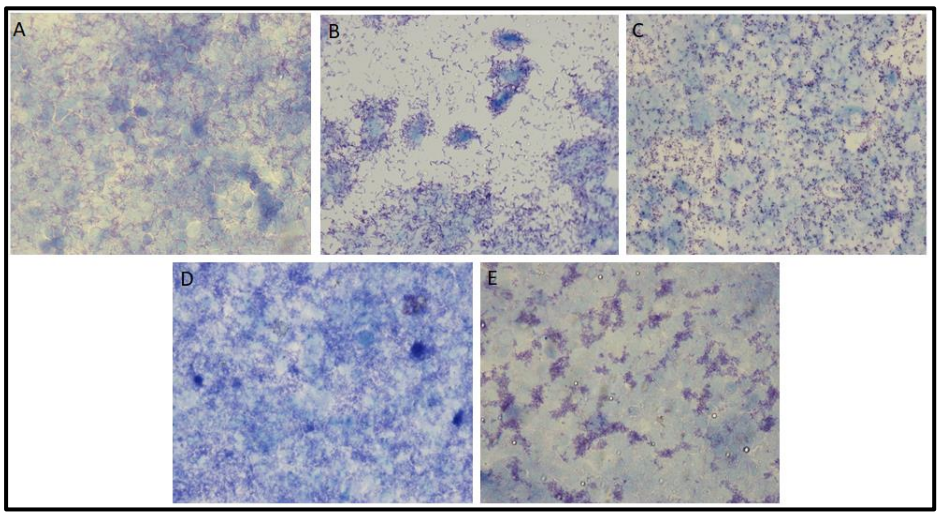
As amostras *C. diphtheriae* CDC-E8392, *C. diphtheriae* INCA-402 e *C. ulcerans* 809 exibiram padrões de aderência do tipo difuso (DA), enquanto a amostra *C. diphtheriae* TR-241expressou aderência do tipo localizada (LA) e a amostra *C. ulcerans* BR-AD22 apresentou padrão de aderência autoagregativa (AA) quando analisadas nos ensaios com células epiteliais pulmonares de linhagem A-549.

As Figuras 8 IIa e IIb, relacionadas aos processos de interação de *C. ulcerans* com pneumócitos de linhagem A-549, também demonstraram diferenças na capacidade desses patógenos de lesarem as monocamadas celulares. A amostra 809 de *C. ulcerans* isolada de humano (TD-negativa; Shiga-like-positiva; PLD-positiva), apresentou inúmeras bactérias de forma difusa na monocamada de pneumócitos a partir de 1h de incubação, causando lesões em pneumócitos com baixa intensidade de acordo com o tempo (1h, 2h e 4h). Interessantemente, a amostra BR-AD22 de *C. ulcerans*, isolada de nasofaringe de cão assintomático (TD-negativa, PLD-positiva) exibiu bactérias autoagregativas (aderência do tipo AA) a partir de 1h de interação e com maior intensidade com 2h e 4h. Apesar de ser isolada de cão, a amostra BR-AD22 expressou maior potencial de virulência para as células A-549 do que a amostra 809 isolada de quadro de pneumonia humana.

A análise comparativa entre as amostras das duas espécies permitiu observar que os níveis de lesão de monocamadas de pneumócitos corresponderam a *C. diphtheriae* TR-241 > *C. diphtheriae* INCA-402 > *C. ulcerans* BR-AD22 > *C. ulcerans* 809 > *C. diphtheriae* CDC-E8392 (Figura 9).

As amostras *C. diphtheriae* CDC-E8392, *C. diphtheriae* INCA-402 e *C. ulcerans* 809 exibiram padrões de aderência do tipo difuso (DA), enquanto a amostra *C. diphtheriae* TR-241expressou aderência do tipo localizada (LA) e a amostra *C. ulcerans* BR-AD22 apresentou padrão de aderência autoagregativa (AA) quando analisadas nos ensaios com células epiteliais pulmonares de linhagem A-549.

Figura 9- Fotomicrografias dos aspectos morfológicos e semiquantitativos dos mecanismos de interação com monocamadas de pneumócitos da linhagem A-549 de amostras de *Corynebacterium diphtheriae* e *Corynebacterium ulcerans* observadas por microscopia ótica em 4h de incubação



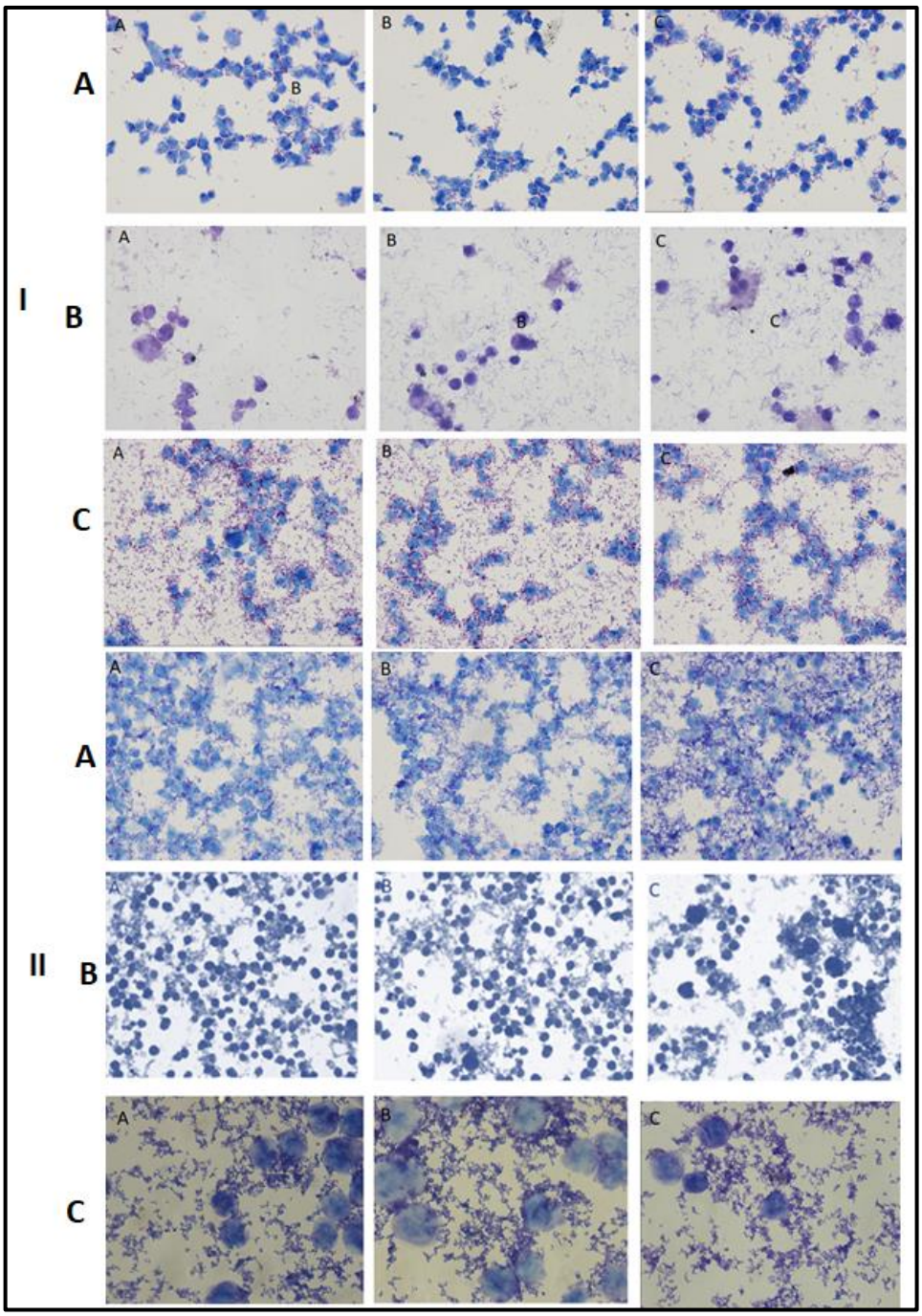
Legenda: (A) *C. diphtheriae* CDC-E8392; (B) *C. diphtheriae* TR-241; (C) *C. diphtheriae* INCA-402; (D) *C. ulcerans* 809; (E) *C. ulcerans* BR-AD22.
Nota: observação em aumento 100X.
Fonte: A autora, 2023.

5.5 **Interação de amostras de *Corynebacterium* spp. potencialmente produtoras de TD com macrófagos pulmonares humanos da linhagem U-937**

A Figura 10 I ilustra os ensaios de interação de amostras de *C. diphtheriae* com macrófagos pulmonares de linhagem U-937. Todas as amostras expressaram capacidade de desestruturar as monocamadas de macrófagos humanos a partir de 1h de incubação. Foram observadas diferenças no número de patógenos presentes nas monocamadas de macrófagos. Após 4h de incubação, a amostra INCA-402 (*belfanti*; TD-negativa) foi capaz de sobreviver e destruir os macrófagos pulmonares, seguida das amostras TR-241 (sacarose-positiva) que

expressou maior potencial de virulência para as células de pneumócitos A-549, e da amostra CDC-E8392 (sacarose-negativa), ambas produtoras de toxina diftérica.

Figura 10- Interação de amostras de *Corynebacterium diphtheriae* e *Corynebacterium ulcerans* com macrófagos de linhagem U-937 (ATCC CRL-1593.2) obtidos de linfoma histiocítico humano, observados por microscopia ótica em diferentes tempos de formação de infecção.



Legenda: A -1h; B - 2h e C- 4h. IA - *C. diphtheriae* CDC-E8392, IB - *C. diphtheriae* TR-241, IC – *C. diphtheriae* INCA-402; IIA – *C. ulcerans* 809, IIB – *C. ulcerans* 2590 e IIC - *C. ulcerans* BR-AD22.
Nota: Aumento de 100X.
Fonte: A autora, 2023.

Na Figura 10 II, as imagens relacionadas aos processos de interação de *C. ulcerans* com macrófagos pulmonares de linhagem U-937 também demonstraram diferenças na capacidade desses patógenos de interagir e sobreviver na presença de células do sistema imune de humanos. A amostra 809 de *C. ulcerans*, isolada de paciente idoso com quadro de pneumonia fatal, mostrou-se capaz de sobreviver e multiplicar na monocamada de macrófagos pulmonares, sendo observado uma crescente replicação e sobrevivência bacteriana durante a interação com os macrófagos, conforme observado na leitura dos experimentos no período de 4h de incubação.

A amostra 2590 além de ser capaz de sobreviver e de replicar intensamente nas monocamadas celulares, adicionalmente foi capaz de lesar os macrófagos a partir de 1h do início dos ensaios de interação. Vale apena ressaltar que a amostra BR-AD22 *C. ulcerans*, isolada de nasofaringe de cão assintomático, que já tinha sido capaz de sobreviver e lesar intensamente as monocamadas de pneumócitos, adicionalmente exibiu maior capacidade de virulência para os macrófagos U-937, quando comparada com a amostra 809 isolada de quadro de pneumonia humana.

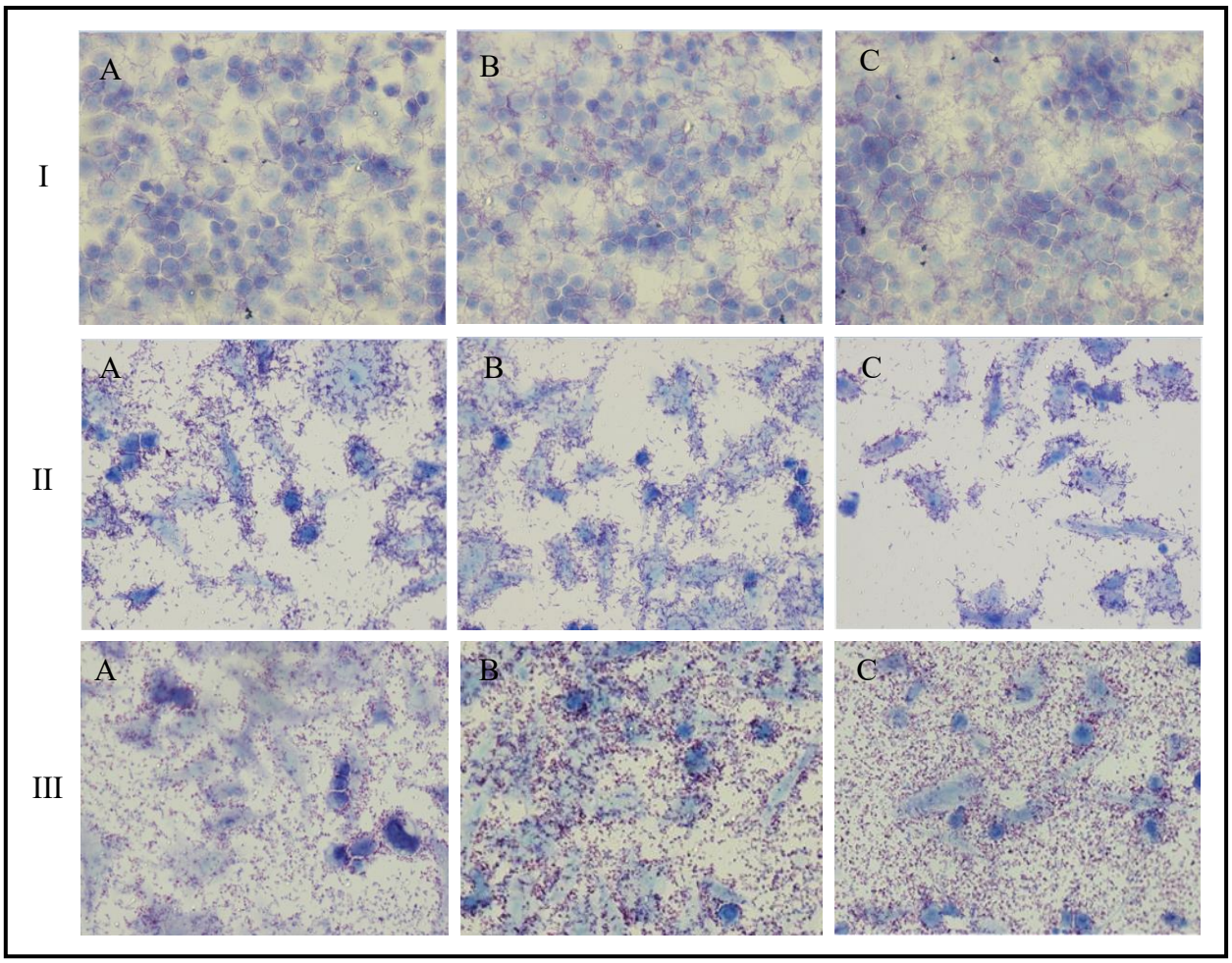
Ao analisar comparativamente as amostras das duas espécies de corinebactérias, verificou-se que os níveis de lesão em monocamadas de macrófagos correspondem a *C. diphtheriae* TR-241 > *C. diphtheriae* INCA-402 > *C. ulcerans* 809 > *C. ulcerans* 2590 > *C. ulcerans* BR-AD22 > *C. diphtheriae* CDC-E8392.

5.6 **Interação de amostras de *Corynebacterium* spp. potencialmente produtoras de TD avaliadas pelo modelo experimental celular de alvéolo pulmonar humano *in vitro***

5.6.1 Análises qualitativas e semiquantitativas da interação de *C. diphtheriae* com pneumócitos da linhagem U-937 e macrófagos pulmonares da linhagem A-549 em co-cultura no modelo experimental celular de alvéolo pulmonar humano

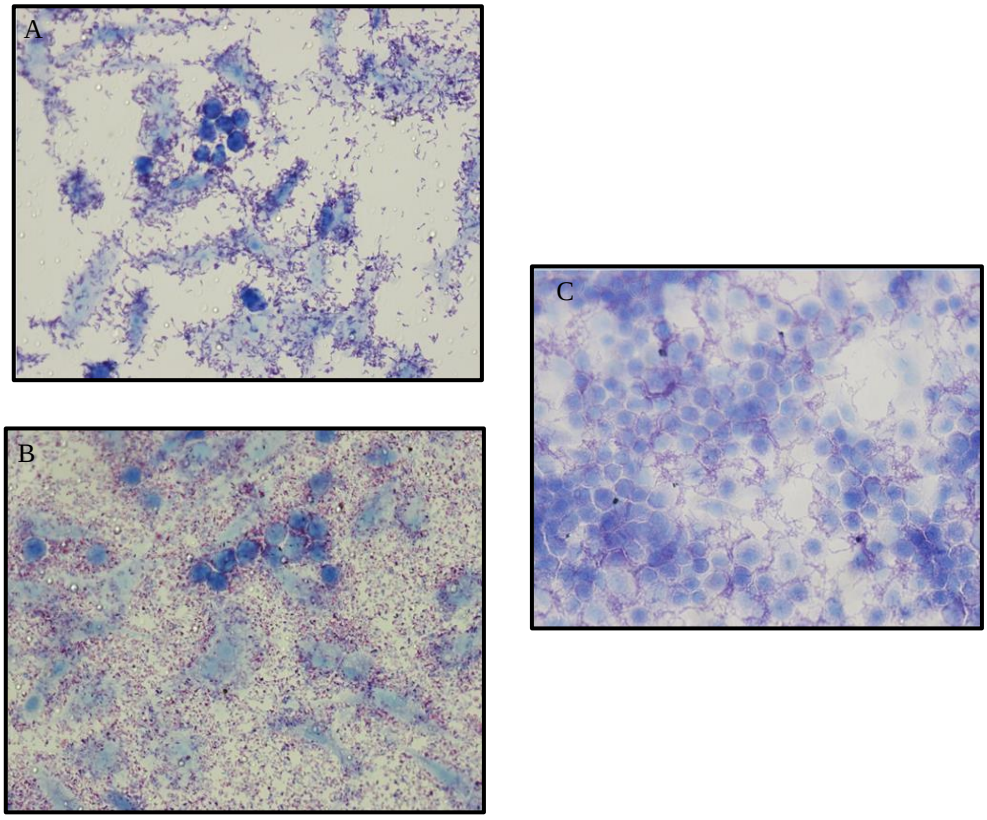
As Figuras 11 e 12 apresentam imagens que ilustram as avaliações morfológicas qualitativas e semiquantitativas da padronização e aplicação do modelo experimental *in vitro* de alvéolo pulmonar humano utilizando co-cultivos de pneumócitos da linhagem U-937 e macrófagos pulmonares da linhagem A-549.

Figura 11 - Aspectos morfológicos e semiquantitativos dos processos de interação de amostras de *Corynebacterium diphtheriae* utilizando o modelo experimental *in vitro* de alvéolo pulmonar humano com co-cultivos de pneumócitos da linhagem U-937 e macrófagos pulmonares da linhagem A-549.



Legenda: I, *C. diphtheriae* CDC-E8392 - Difuso (DA); II, *C. diphtheriae* TR-241 - Localizado (LA); III, *C. diphtheriae* INCA-402 - Difuso (DA); (A)1h; (B) 2h e (C) 4h de incubação.
Nota: Aumento 100X.
Fonte: A autora, 2023.
.

Figura 12 - Heterogeneidade da capacidade de interação de amostras de *Corynebacterium diphtheriae* em ensaios com modelo alveolar humano *in vitro* utilizando co-cultivo de pneumócitos de linhagem A-459 e macrófagos pulmonares humanos de linhagem U-937.



Legenda: (A) *C. diphtheriae* TR-241, Localizada (LA); (B) *C. diphtheriae* INCA-402, Difuso (DA); (C) *C. diphtheriae* CDC-E8392, Diifuso (DA).
Notas: fotomicrografias obtidas após 4h de infecção por microscopia óptica em aumento de 100X.
Fonte: A autora, 2023.

As amostras de *C. diphtheriae* apresentaram os seguintes padrões de interação com as monocadas de co-cultivo de células de origem pulmonar:

C. diphtheriae CDC-E8392:

Previamente foi demonstrada a habilidade do patógeno (TD – positiva, sacarose-negativa, agente causador de difteria) de interagir, sobreviver, replicar além de lesar as monocamadas de pneumócitos ou macrófagos cultivados isoladamente. Quando cultivadas no modelo de alvéolo pulmonar, estes microrganismos permaneceram viáveis, apesar de não terem

sido observados danos significativos nas células pulmonares humanas nestas condições até 4h de infecção (Figuras 11 I e 12 C).

C. diphtheriae TR-241:

Ao contrário do observado com a amostra CDC-E8392, a amostra TR-241 (TD – positiva, sacarose-positiva, agente causador de difteria) foi capaz de interagir com as células em co-cultivo da mesma forma do que com as células cultivadas isoladamente. A partir de 1h de interação, a amostra foi capaz de expressar a maior capacidade de replicação e de causar lesões nas células das monocamadas, destruindo-as (Figuras 11 II e 12 A).

C. diphtheriae INCA-402:

Nos experimentos utilizando monocamadas de células cultivadas isoladamente, a amostra INCA-402 (*belfanti*; TD-negativa) só foi capaz de lesar alguns pneumócitos após 4h de interação. O patógeno isolado de quadro de pneumonia também foi capaz de sobreviver, replicar em elevado número, além de destruir os macrófagos. A amostra INCA-402 quando cultivada no modelo de alvéolo pulmonar apresentou capacidade de replicar em elevada intensidade e de lesar os pneumócitos a partir de 1h de interação, e com 4h de interação observou-se elevado número de bactérias e de lesão celular em macrófagos e pneumócitos (Figuras 11 III e 12 C).

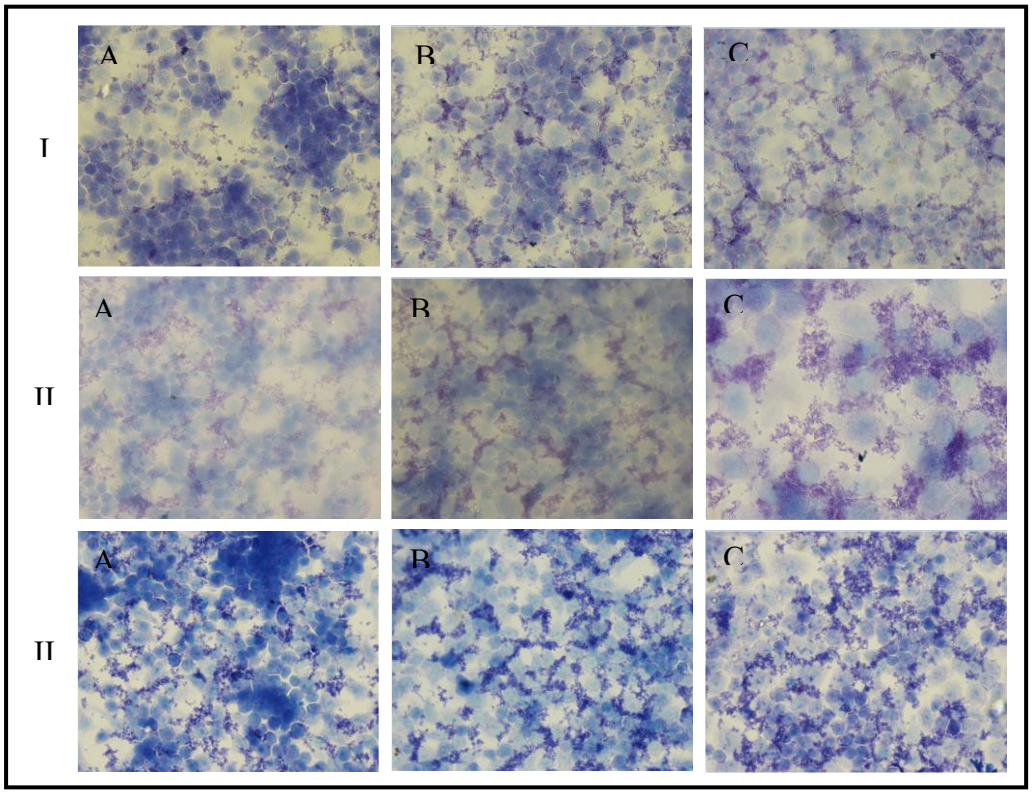
5.6.2 Análises qualitativas e semiquantitativas da interação de *C. ulcerans* com pneumócitos da linhagem U-937 e macrófagos pulmonares da linhagem A-549 em co-cultura no modelo experimental celular de alvéolo pulmonar humano

Para as amostras de *C. ulcerans*, os aspectos dos estudos morfológicos, qualitativos e semiquantitativos da padronização e aplicação do modelo experimental *in vitro* de alvéolo pulmonar humano utilizando co-cultivos de pneumócitos da linhagem U-937 e macrófagos pulmonares da linhagem A-549 foram apresentadas na Figura 13.

Os mecanismos de interação de *C. ulcerans* neste modelo também foram caracterizados como amostra-dependente, à semelhança do observado com as amostras de *C. diphtheriae*. Similarmente, *C. diphtheriae* e *C. ulcerans* apresentaram mecanismos capazes de causar efeitos

citotóxicos tanto nos pneumócitos quanto nos macrófagos, destruindo as monocamadas de alvéolo pulmonar.

Figura 13 - Aspectos morfológicos e semiquantitativos dos processos de interação de amostras de *Corynebacterium ulcerans* utilizando o modelo experimental *in vitro* de alvéolo pulmonar humano com co-cultivos de pneumócitos da linhagem U-937 e macrófagos pulmonares da linhagem A-549



Legenda: I – 809, II - BR-AD22, III - 2590; (A)1h; (B) 2h e (C) 4h de incubação.
Nota: Aumento 100X.
Fonte: A autora, 2023.

As amostras de *C. ulcerans* expressaram as seguintes características durante o processo de interação com as monocadas de co-cultivo de células de origem pulmonar:

C. ulcerans 809:

A amostra *C. ulcerans* 809, isolada de paciente idoso com quadro de pneumonia fatal, (TD-negativa; Shiga-like-positiva; PLD-positiva), já havia apresentado crescimento de

inúmeras bactérias de forma difusa em monocamada de pneumócitos quando cultivados isoladamente. Além disso, foi observada uma crescente replicação e sobrevivência bacteriana durante a interação com macrófagos pulmonares. Semelhantemente, nos ensaios de modelo alveolar utilizando o co-cultivo de ambas as células de linhagem pulmonar A-549 e U-937, observou-se que a amostra 809 foi capaz de sobreviver e replicar, além de apresentar células bacterianas predominantemente aderidas de forma difusa aos pneumócitos (padrão de aderência do tipo DA). Entretanto, com 4h de incubação não foram observados danos com lise em muitas células do tapete celular (Figura 13 I).

C. ulcerans BR-AD22:

A amostra *C. ulcerans* BR-AD22, isolada de nasofaringe de cão assintomático (TD-negativa, PLD-positiva), foi capaz de sobreviver durante as 4h de interação, exibindo comportamento autoagregativo (aderência do tipo AA) e lesando intensamente as monocamadas de pneumócitos de linhagem A-549 e macrófagos pulmonares de linhagem U-937 (Figura 13 II).

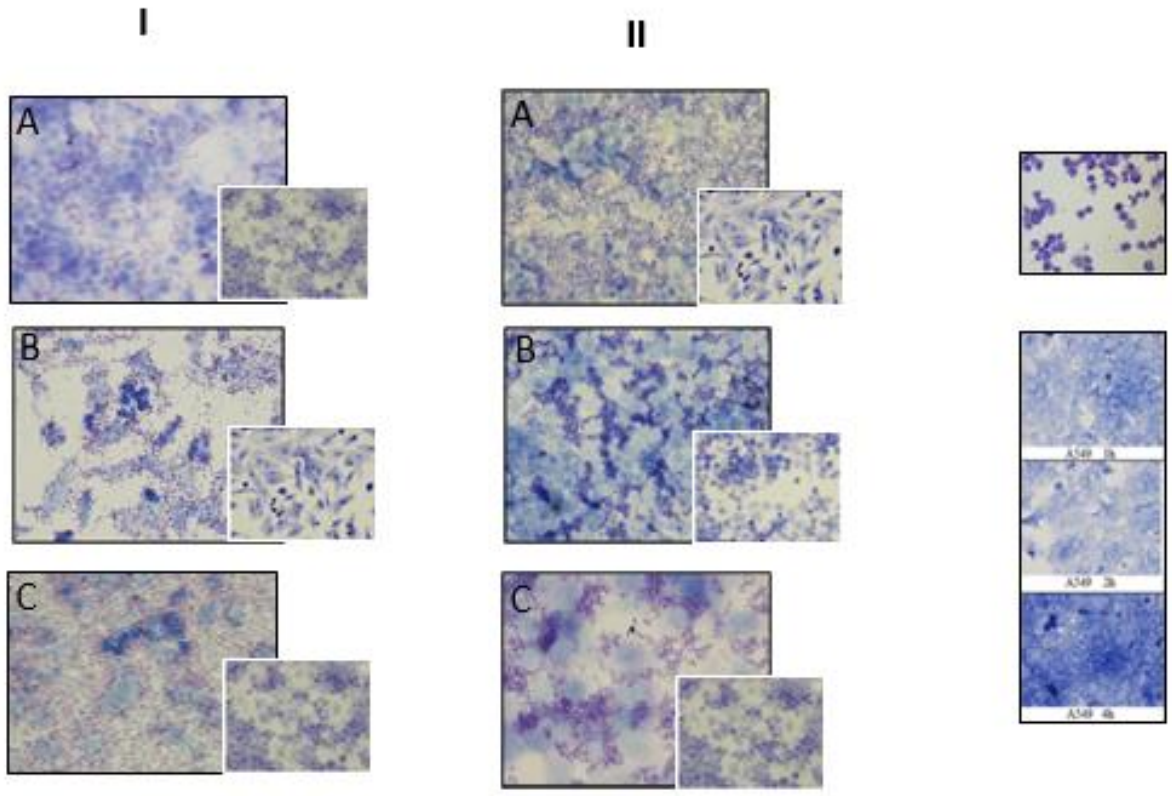
C. ulcerans 2590:

A amostra *C. ulcerans* 2590, isolada de paciente adolescente com quadro de difteria associado a mononucleose infecciosa (TD – negativa, PLD – negativa), foi capaz de sobreviver e de replicar intensamente nas monocamadas de macrófagos pulmonares. Infelizmente não foram obtidos resultados com pneumócitos A-549 cultivados isoladamente no presente estudo. Nos ensaios *in vitro* de modelo alveolar, a amostra 2590, além de ser capaz de sobreviver e de replicar nas monocamadas de celulares, foi capaz de aderir aos pneumócitos de forma difusa (padrão de aderência do tipo DA) e lesar os pneumócitos a partir de 1h de interação. Após 4h de interação, o patógeno também expressou a capacidade de destruir os macrófagos e degradar a monocamada (Figura 13 III).

5.6.3 Potencial de interação de *Corynebacterium* spp. com pneumócitos da linhagem U-937 e macrófagos pulmonares da linhagem A-549 em co-cultura no modelo experimental celular de alvéolo pulmonar humano

No presente estudo, o potencial de interação e sobrevivência de cada amostra foi classificado em + (fraco), ++ (moderado), e +++ (forte), tendo como base as seguintes observações morfológicas e semiquantitativas, realizadas de forma comparativa com as monocamadas de células sem bactérias (controles) e com as infectadas com as outras amostras de *Corynebacterium* spp. estudadas: a) quantidade de bactérias aderidas nas monocamadas de células componentes do alvéolo pulmonar; b) capacidade de destruição do tapete celular independente do tipo celular; c) citotoxicidade para macrófagos; d) citotoxicidade para pneumócitos. Os resultados desta análise foram ilustrados na Figura 14 e na Tabela 3.

Figura 14- Análise comparativa dos aspectos morfológicos dos processos de interação de amostras de *Corynebacterium diphtheriae* e *Corynebacterium ulcerans* com monocamadas de macrófagos pulmonares da linhagem U-937 com pneumócitos de linhagem A-549 co-cultivadas e observadas antes (controle) e durante 4h de infecção.



Legenda: I - amostras de *C. diphtheriae*: (A) CDC-E8392, Difuso (DA); (B) TR-241, Localizado (LA); (C) INCA-402, Difuso (AD); II - amostras de *C. ulcerans*: (A) 809, Difuso (DA); (B) 2590, Difuso (DA); (C) BR-AD22, Localizado (LA). III – Controles de monocamadas de células cultivadas isoladamente: (A) macrófagos de linhagem U-937 (4h); (B) pneumócitos de linhagem A-549.
Notas: observação por microscopia óptica em aumento 100X.
Fonte: A autora 2023.

Na Tabela 3 é possível observadar diferenças na habilidade de interação de amostras de *C. diphtheriae* e *C. ulcerans* com monocamadas de células de linhagem A-549 e U-937 utilizadas nos ensaios *in vitro* de alvéolo pulmonar humano, caracterizadas por métodos morfológicos e semiquantitativos. Neste sentido, os patógenos demonstraram heterogeneidade amostra-dependente quanto a capacidade de: degradar as monocamadas independente do tipo celular; quantidade de bactérias aderidas nas monocamadas de células componentes do alvéolo pulmonar; citotoxicidade de macrófagos e/ou de pneumócitos.

Tabela 3 - Diferenças nas propriedades de interação de amostras de *Corynebacterium diphtheriae* e *Corynebacterium ulcerans* em monocamadas de células de linhagem A-549 e U-937 utilizadas nos ensaios *in vitro* alvéolo pulmonar humano caracterizadas por métodos morfológicos e semiquantitativos

Amostras	**Parâmetros da interação bacteriana no modelo *in vitro* alvéolo pulmonar humano**				
	Lise do tapete celular	**Quantidade de bactérias aderidas**	**Efeito citotóxicos**		**Intensidade de virulência**
			Macrófagos	**Pneumócitos**	
C. diphtheriae					
CDC-E8392	+	+	+	+	V –VI
TR-241	+++	++	+	+++	V- I
INCA-402	+	+++	+++	++	V – III
C. ulcerans					
809	++	+++	+++	++	V – II
2590	+	++	+++	+	V – V
BR-AD22	+	++*	+++	+	V – IV

Legenda: (+), fraco; ++, moderado; +++, forte; * Aderência agregativa (AA).
Fonte: A autora, 2023.

A análise comparativa destas características permitiu demonstrar que a amostra *C. diphtheriae* TR-241 (+++) seguida da amostra *C. ulcerans* 809 (++) lisaram mais o tapete celular. Em relação à quantidade de bactérias aderidas nas monocamadas, observou-se um maior número para as amostras *C. diphtheriae* INCA-402 e *C. ulcerans* 809 (+++). Adicionalmente as demais amostras estudadas apresentaram elevada capacidade de sobrevivência nos tapetes celulares (++), com excessão da *C. diphtheriae* CDC-E8392 (+).

Interessantemente, as duas amostras que apresentaram menor efeito citotóxico para os macrófagos pulmonares foram *C. diphtheriae* CDC-E8392 e *C. diphtheriae* TR-241 (+). A amostra *C. ulcerans* BR-AD22 isolada de cão exerceu citotoxidade similar para os macrófagos

à semelhança das demais amostras isoladas de humanos (+++). Em contraste, a amostra *C. diphtheriae* TR-241 apresentou maior citotoxidade para os pneumócitos (+++), seguida pelas amostras *C. diphtheriae* INCA-402 e *C. ulcerans* 809 (++). As amostras que menos lesaram pneumócitos foram: *C. ulcerans* 2590 e BR-AD22 e *C. diphtheriae* CDC-E8392 (+).

Deste modo, de acordo com as análises destes aspectos acima mencionados, as amostras foram classificadas quanto à intensidade de virulência aos tecidos pulmonares como: V-I: *C. diphtheriae* TR-241; > V-II: *C. ulcerans* 809; > V-III: *C. diphtheriae* INCA-402; > V-IV: *C. ulcerans* 2590; > V-V: *C. ulcerans* BR-AD22; > *C. diphtheriae* CDC-E8392.

As amostras originalmente isoladas de pneumonia, *C. diphtheriae* INCA-402 (paciente com câncer) e *C. ulcerans* 809 (caso fatal), apresentaram número elevado de bactérias disseminadas em monocamadas de células pulmonares co-cultivadas, sugerindo elevada capacidade de sobrevivência e replicação. Essas amostras foram capazes de expressar maior potencial de citotoxidade aos macrófagos (+++) além de exercer citotoxidade aos pneumócitos (++). A amostra *C. ulcerans* 809 (V - II) causou maior lise celular e foi categorizada como mais virulenta do que a *C. diphtheriae* INCA-402 (V – III), isolada de paciente imunocomprometido.

5.6.4 Análise quantitativa do potencial de interação, invasão e sobrevivência investigada pelo modelo experimental celular de alvéolo pulmonar humano

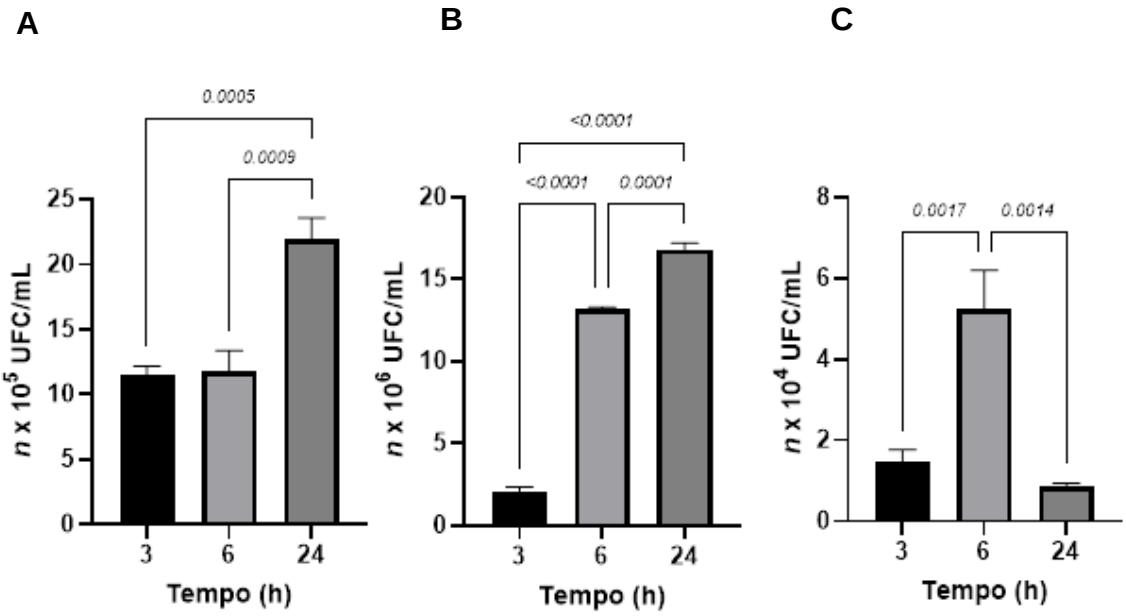
Os experimentos quantitativos apresentados na Figura 15 confirmaram que as amostras analisadas pelos ensaios de microscopia óptica apresentaram-se viáveis durante os processos de interação com as monocamadas de células pulmonares cultivadas isoladamente ou em co-cultivo de 1h a 4h de incubação.

Os resultados realizados com a amostra TR-241 demonstraram que as bactérias permaneceram viáveis até 24h de infecção. Esses patógenos ativos foram detectados aderidos às superfícies celulares, nos compartimentos intracitoplasmáticos e nos sobrenadantes das monocamadas.

O maior número de bactérias viáveis detectado intracelularmente foi observado 6h após o início de experimento. Os dados também indicaram ocorrência replicação bacteriana nos compartimentos intracelulares. Ao contrário, seria esperado a detecção de poucas bactérias viáveis no interior das células, caso ocorresse morte dos patógenos no tecido pulmonar.

A capacidade de sobrevivência, replicação e disseminação no tecido pulmonar amostra-dependente de *C. diphtheriae* foi parcialmente constatado pelo número elevado de patógenos víaveis detectados no sobrenadante 24h após estabelecido o processo de infecção do alvéolo pulmonar humano desenvolvido *in vitro* utilizando a amostra TR-241.

Figura 15 – Contagem de bactérias viáveis da amostra *Corynebacterium diphtheriae* TR-241, produtora de toxina diftérica, em diferentes tempos de incubação durante o processo de interação com células utilizadas no modelo experimental de alvéolo pulmonar humano



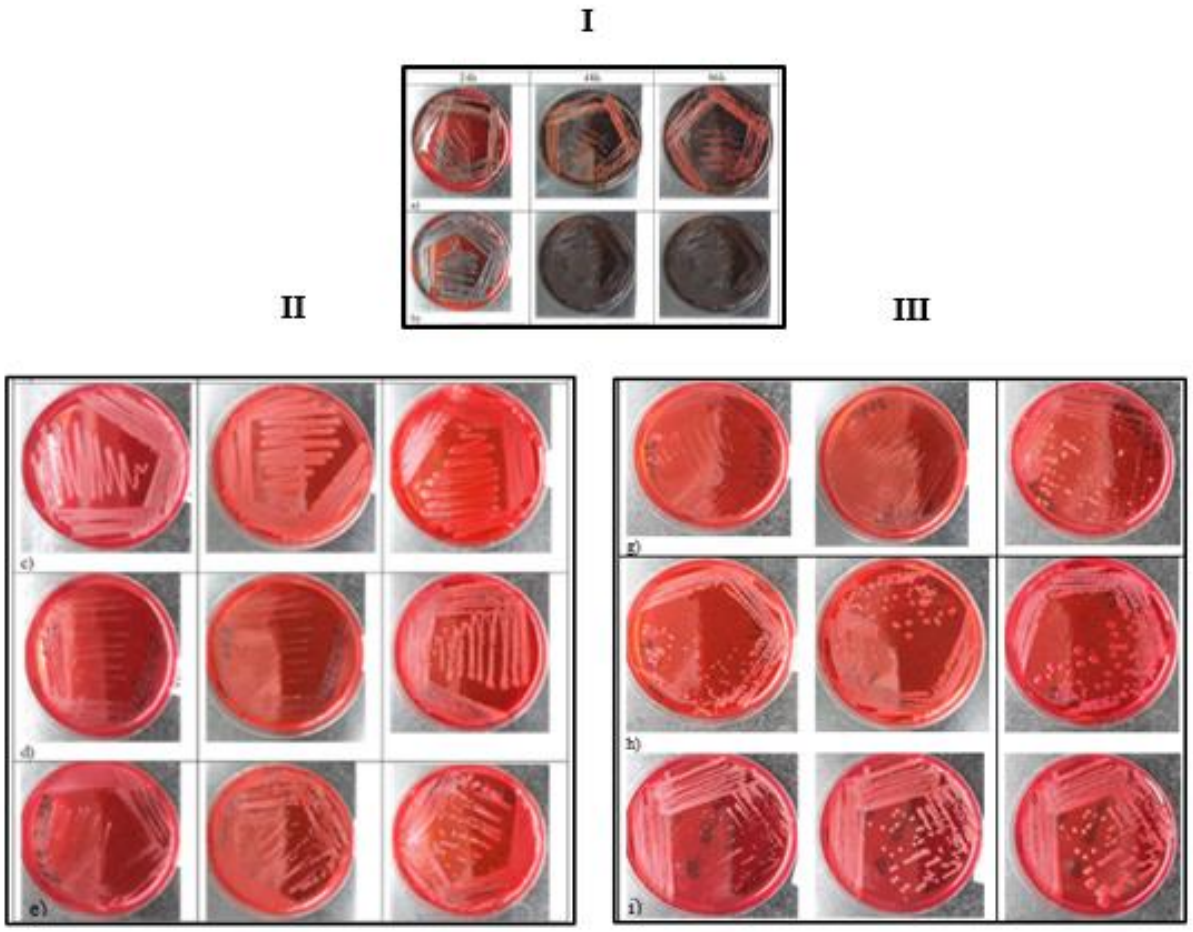
Legenda: (A) sobrenadante; (B) em associação ao tapete; (C) intracelulares.
Notas: Os dados correspondem à média ± desvio padrão de três experimentos independentes realizados, pelo menos, em triplicata; apenas os valores de $p < 0.05$, indicativo de diferença significativa, estão mostrados nos gráficos.
Fonte: A autora, 2023.

5.7 **Produção de *slime***

Os resultados da pesquisa da capacidade de produção de *slime* por amostras de origens diversas de *C. diphtheriae* e *C. ulcerans* utilizando o meio Vermelho do Congo em diferentes tempos de leitura (24h, 48h e 96h) e comparando com as amostras controle de *Staphylococcus epidermidis* (positiva - 35984 e negativa - 12228) estão apresentados na Figura 16. Embora a técnica empregando o Agar Vermelho de Congo seja capaz de detectar fenotipicamente

componentes de superfícies bacterianas de natureza polissacarídicas, com a aplicação desta metodologia no presente estudo, todas as seis amostras de *C. diphtheriae* e *C. ulcerans* testadas apresentaram-se como não produtoras de *slime*.

Figura 16 - Pesquisa da capacidade de produção de *slime* por *Corynebacterium diphtheriae* e *Corynebacterium ulcerans* em meio Vermelho do Congo em diferentes tempos de cultivo.



Legenda: I - Controles: (a) positivo - *Staphylococcus epidermidis* 35984; (b) negativo - *S. epidermidis* 12228; II - *C. diphtheriae:* (c) amostra CDC-E8392; (d) amostra TR-TR-241; (e) amostra INCA-402; (f) III - *C. ulcerans:* (g) amostra 809; (h) amostra 2590; (i) amostra BR-AD22.
Notas: Experimentos realizados em duplicata e leituras com 24h, 48h e 96h.
Fonte: A autora, 2023.

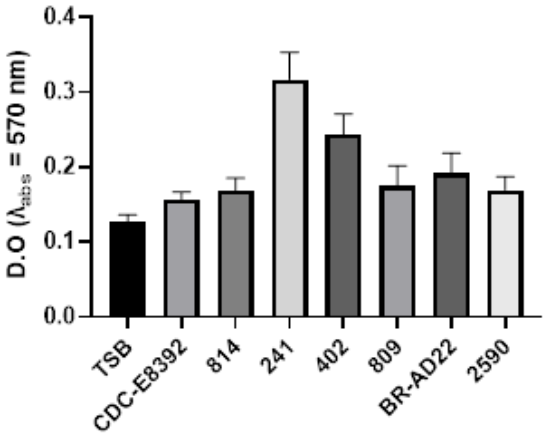
5.8 **Formação de biofilme em superfícies abióticas**

Os resultados obtidos nos ensaios de formação de biofilme em superfícies abióticas forma demonstrados na Figura 16 e Tabela 4.

5.8.1 Formação de biofilme na superfície hidrofóbica de poliestireno

Os dados demonstraram que todas as amostras de *C. diphtheriae* e de *C. ulcerans* permaneceram viáveis e foram capazes de formar biofilme nas superfícies de poliestireno em intensidades variadas. Após 48h de incubação as amostras testadas foram classificadas em categorias com base na DO dos ensaios: amostras *C. diphtheriae* TR-241 - moderadamente produtora de biofilme (++) e as demais amostras de *C. diphtheriae* CDC-E8392 e INCA-402 e INCA-814 e de *C. ulcerans* 809, 2590 e BR-AD22 fracamente produtoras de biofilme (+) (Figura 17).

Figura 17 – Análise semiquantitativa da formação de biofilme na superfície hidrofóbica de poliestireno por amostras de *Corynebacterium diphtheriae* e *Corynebacterium ulcerans*.



Legenda: TSB, Trypticase Soy Broth (controle negativo)
Nota: Os dados correspondem à média ± desvio padrão de três experimentos independentes realizados, pelo menos, em triplicata.
Fonte: A autora, 2023.

5.8.2 Formação de biofilme na superfície hidrofílica de vidro

Os resultados apresentados na Tabela 4 indicaram que a maioria das amostras de *C. diphtheriae* e de *C. ulcerans* permaneceram viáveis e foram capazes de formar biofilme nas superfícies do vidro em intensidades variadas.

As amostras testadas de *C. diphtheriae* e de *C. ulcerans* apresentaram os seguintes perfis de classificação: *C. diphtheriae* TR-241 e INCA-402: I – Fortemente aderentes e produtoras de biofilme, bactérias aderidas nas laterais do tubo de vidro e na interface entre o meio de cultura e o ar; *C. diphtheriae* 814 e de *C. ulcerans* 2590 e BR-AD22: II – Moderadamente produtoras de biofilme bactérias aderidas nas laterais do tubo de vidro; *C. ulcerans* 809: III – Fracamente aderentes e fracamente produtoras de biofilme, bactérias formando um anel na interface entre o meio de cultura e o ar; *C. diphtheriae* CDC-E8392: IV – Não produtora de biofilme, ausência de bactérias aderidas.

Tabela 4 - Formação de biofilme na superfície hidrofílica de tubos de vidro e hidrofóbica de microplacas de poliestireno por amostras de *Corynebacterium diphtheriae* e *Corynebacterium ulcerans*

Amostra	**Superfície**	
	Poliestireno (hidrofóbica)	**Vidro (hidrofílica)**
C. diphtheriae		
CDC-E8392	+	IV
TR-241	++	I
814	+	II
INCA-402	+	I
C. ulcerans		
809	+	III
2590	+	II
BR-AD22	+	II

Legenda: +, fracamente formadora de biofilme; ++, moderadamente formadora de biofilme; I, bactérias aderidas nas laterais do tubo de vidro e na interface entre o meio de cultura e o ar; II, bactérias aderidas nas laterais do tubo de vidro; III, bactérias formando um anel na interface entre o meio de cultura e o ar; IV, ausência de bactérias aderidas.
Notas: experimentos realizados em triplicata.
Fonte: A autora, 2023.

5.9 **Correlação dos resultados obtidos**

Os dados analisados por métodos morfológicos e semiquantitativos apresentados na Tabela 5 demonstraram que as amostras de *C. diphtheriae* e *C. ulcerans* expressaram diferenças nas propriedades de interação com as monocamadas de células de linhagem A-549 e U-937 utilizadas nos ensaios *in vitro* de modelo alvéolo pulmonar humano.

As amostras de ambas as espécies interagiram com as células pulmonares independente da capacidade de produção TD. Entretanto, as amostras DT-positivas, isoladas de casos clássicos de difteria respiratória, *C. diphtheriae* TR-241 e CDC-E8392 foram caracterizadas inversamente como mais e menos virulentas nos ensaios com células pulmonares (V-I e V-VI), respectivamente.

A amostra *C. diphtheriae* TR-241 que apresentou maior virulência para as células pulmonares co-cultivadas apresenta propriedades de fermentar a sacarose, de produzir biofilme no poliestireno e no vidro em intensidade elevada, além de expressar perfil de aderência localizada (LA) em células epiteliais humanas.

Entre as amostras isoladas de quadro de pneumonia e não produtoras de TD, observou-se que a amostra *C. ulcerans* 809 lisou mais (++) as monocamadas celulares quando comparada com a *C. diphtheriae* INCA-402 (+), possivelmente em decorrência da produção das toxinas PLD e/ou Shiga-like. Ambas as amostras aderiram e replicaram com elevada intensidade (+++) na superfície das monocamadas celulares apesar de não produzirem *slime*. A amostra *C. diphtheriae* INCA-402 produziu maior quantidade de biofilme no vidro (+++) enquanto as duas apresentaram intensidade semelhantes para a formação de biofilme em superfície hidrofóbica de poliestireno (+). Baseado nos dados, a amostra *C. ulcerans* 809 (V – II; pneumonia fatal) foi considerada mais virulenta do que a amostra *C. diphtheriae belfanti* INCA-402 (V – III; paciente com câncer).

O efeito citotóxico às monocamadas apresentado pela amostra *C. ulcerans* 2590 (PLD – negativa) pareceu ser independente da capacidade de produção de PLD, uma vez que o resultado foi similar ao de *C. ulcerans* BR-AD22 (PLD – positiva). As amostras isoladas de cão e de humano apresentam capacidade de formação de biofilme similares tanto no vidro quanto no poliestireno. Entretanto, expressaram diferenças nos perfis de aderência aos tapetes celulares, principalmente aos pneumócitos: *C. ulcerans* BR-AD22 perfil AA (indicativo de patógeno invasor) e V – IV; *C. ulcerans* 2590 com perfil DA e V – V.

Tabela 5 - Características microbiológicas, produção de *slime*, formação de biofilme em superfícies abióticas e interação com células de linhagem A-549 e U-937 utilizadas nos ensaios *in vitro* de alvéolo pulmonar humano de amostras de *Corynebacterium* spp. utilizadas no presente estudo

Amostras **Biovar/Origem**	**Outros dados**	***Slime***	**Biofilme**		**Modelo alveolar**
			Poliestireno	**Vidro**	
Corynebacterium diphtheriae					
CDC-E8392 *mitis*/Difteria	TD-positiva; sacarose negativa; DA	-	+	-	**V –VI**
TR-241 *mitis*/Difteria	TD-positiva; sacarose positiva; LA	-	++	+++	**V – I**
INCA-402 *belfanti* Pneumonia (paciente com câncer)	TD-negativa; sacarose positiva; DA	-	+	+++	**V- III**
Corynebacterium ulcerans					
809 Humano; Pneumonia fatal	TD-negativa; Toxina Shiga-like-positiva; PLD-positiva; DA	-	+	+	**V – II**
2590 Humano (adolescente); Difteria com Mononucleose infecciosa	TD-negativa; PLD-negativa; DA	-	+	++	**V – V**
BR-AD22 Cão; Assintomático (nasofaringe)	TD-negativa; PLD-positiva; AA	-	+	++	**V – IV**

Legenda: TD, toxina diftérica; PLD, fosfolipase; LA, aderência localizada em células HEp-2; DA, aderência difusa; AA, aderência agregativa; +, fracamente aderente; ++, moderadamente aderente; +++, fortemente aderente; I,
Fonte: A autora, 2023.

6 **DISCUSSÃO**

Na presente investigação foi desenvolvida a estrutura de alvéolos pulmonares *in vitro* e observadas características dos mecanismos de interação com tecidos pulmonares de amostras de *C. diphtheriae* e *C. ulcerans* de origens diversas, correlacionando com outras propriedades adesivas destes patógeno. Os resultados demonstraram que esse ensaio de modelo alveolar *in vitro* pode ser utilizado como metodologia adequada, uma vez que todas as amostras de *C. diphtheriae* e de *C. ulcerans* estudas foram capazes de interagir com as monocamadas de linhagem celulares em co-cultivo de pneumócitos tipo II A-549 com macrófagos pulmonares U-937.

O epitélio alveolar atua como importante componente da resposta imune inata do pulmão e exerce uma barreira anatômica separando o organismo humano do ambiente externo, servindo como uma primeira linha de defesa contra patógenos bacterianos e virais inalados. O alvéolo pulmonar constitui uma fina barreira eficaz que expressa conexões intercelulares estreitas e protege o corpo humano de estímulos externos contra toxinas, além de partículas e microrganismos (KLETTING et al, 2018; WONG; JOHNSON, 2013).

Os pneumócitos tipo II são responsáveis pela produção do surfactante pulmonar, essencial para reduzir a tensão superficial dos alvéolos e pela capacidade regenerativa de pneumócitos tipo I danificados (DIEM, et al., 2020; KLETTING et al, 2018). Não foi encontrado na literatura disponível, estudos evidenciando atividade antibacteriana para o surfactante pulmonar.

Estudos utilizando ensaios com co-cultivos de pneumócitos e macrófagos pulmonares visando caracterizar a morfologia, viabilidade e funções das barreiras celulares foram previamente reportados. Os dados obtidos também enfatizaram que os ensaios de co-cultivo representam um modelo *in vitro* adequado para obtenção de dados relacionados a inalação de produtos químicos, drogas e nanopartículas, além de infecções por patógenos diversos (ABRAMSON; KEDEM; RELMAN, 2001; CARIUS et al, 2023; KLETTING et al, 2018). Similarmente ao reportado nesses estudos, presentemente os macrófagos pulmonares permaneceram viáveis e distribuídos homogeneamente, tanto em monocultivos como nos alvéolos pulmonares. A viabilidade dos pneumócitos tipo II em co-cultivos foi semelhante a observada em monocultivos.

Conforme observado para *M. tuberculosis* (AUNG et al. 1996; BERMUDEZ; GOODMAN 1996; CHINGWARU et al., 2016), as amostras presentemente estudadas de *C.*

diphtheriae e *C. ulcerans* exibiram capacidade de aderência para os pneumócitos tipo II e os macrófagos pulmonares.

Os bacilos causadores de tuberculose são fagocitados por macrófagos alveolares, podendo ser eliminados pela resposta imune do hospedeiro ou crescerem no interior de células ocasionando necrose dos tecidos pulmonares (YANG et al., 2003). A infecção por *M. tuberculosis* causa diferentes níveis de apoptose e necrose em macrófagos humanos e células epiteliais alveolares. As pesquisas demonstraram que tanto a amostra virulenta quanto a atenuada foram capazes de induzir apoptose em macrófagos de linhagem U-937. Entretanto, a citotoxicidade das células alveolares foi decorrente de necrose, mas não de apoptose. A infecção com amostras de *M. tuberculosis* resultou em apoptose de 14% das células das monocamadas e 59% de morte celular associada à necrose dos pneumócitos tipo II. Após *M. tuberculosis* infectar pneumócitos tipo II a apoptose foi inibida pela produção de caspases. A inibição da replicação de bactérias intracelulares resultou em um aumento de apoptose em macrófagos e pneumócitos tipo II (DANELISHVILI et al., 2003).

Estudos anteriores demonstraram que exotoxinas bacterianas, como TD, podem expressar intensa capacidade de ativação de macrófagos (MOOKERJEE; KANEGASAKI; KATO, 1982). Uma vez que a atividade microbicida de macrófagos pode ser aumentada pela presença da TD, foi investigada pela nossa equipe de pesquisa a influência da ativação de macrófagos na sobrevivência intracelular de *C. diphtheriae* (DOS SANTOS et al., 2010). O trabalho teve como objetivo avaliar a interação de macrófagos de linhagem U-937 com amostras de *C. diphtheriae* analisando a ausência de anticorpos opsonizantes e a influência do gene *tox* neste processo. A amostra tipo TD-negativa ATCC 27010 (gene *tox* negativo) *C. diphtheriae* biovar *mitis* e a homóloga TD-positiva ATCC 27012 (gene *tox* positivo) foram usadas nos experimentos de aderência, internalização e sobrevivência intracitoplasmática em macrófagos de linhagem U-937 em diferentes períodos de incubação. A amostra TD-negativa de *C. diphtheriae* aderiu pouco aos macrófagos U-937, e apenas uma pequena quantidade de bactérias viáveis foram fagocitadas, indicando que *C. diphtheriae* é capaz de evitar a fagocitose pelos macrófagos na ausência de opsonina. Este mecanismo pode facilitar a sobrevivência e disseminação de *C. diphtheriae* nos tecidos, causando doenças infecciosas independente de infiltrados de células do sistema imunológico como PMN e macrófagos (DOS SANTOS et al., 2010). Embora a amostra TD-negativa tenha aderido em menor número às células U-937, as células bacterianas que foram fagocitadas permaneceram vivas intracelularmente por 24 horas, sugerindo que *C. diphtheriae* sem o gene *tox* pode permanecer vivo na presença de macrófagos por longos períodos, como anteriormente observado para *S. agalactiae* (CORNACCHIONE et

al., 1998). Os macrófagos U-937 exerceram efeito bacteriostático para a amostra TD-negativa ATCC 27010, uma vez que foi observado crescimento bacteriano em sobrenadantes de culturas 24 horas após a infecção. Os efeitos bacteriostáticos dos macrófagos podem permitir o crescimento e colonização de bacterianas nos tecidos do hospedeiro, conforme observado para outros patógenos (MITCHELL; CHEN; PORTNOY, 2016). Em contraste, a amostra homóloga TD-positiva ATCC 27012 foi incapaz de replicar ou sobreviver no citoplasma dos macrófagos U-937, morrendo 24 horas após a infecção (DOS SANTOS et al., 2010). Deste modo, pesquisas adicionais relacionadas a estes mecanismos permaneciam necessários para amostras *C. diphtheriae* e *C. ulcerans*.

No presente estudo, amostras de *C. diphtheriae* foram capazes de interagir e de sobreviver na presença de macrófagos pulmonares de linhagem U-937 em diferentes intensidades. Todas as amostras expressaram capacidade de lesar macrófagos humanos em monocultivos, a partir de 1h de incubação. Observadas diferenças quantitativas no número de patógenos presentes nas monocamadas de macrófagos. Após 4h de incubação a amostra INCA-402 (*mitis/belfanti*; TD-negativa) foi capaz de sobreviver, replicar em maior número, além de destruir os macrófagos pulmonares, seguidos das amostras TR-241 (sacarose-positiva) que expressou maior potencial de virulência para os pneumócitos tipo II de linhagem A-549. As amostras de *C. ulcerans*, além de terem sido capazes de sobreviver e de replicar intensamente nas monocamadas celulares, também foram capazes de lesar os macrófagos em diferentes intensidades.

Conforme demonstrado na Tabela 1, *C. diphtheriae* e *C. ulcerans* podem expressar diversos outros fatores de virulência além da produção de TD, que podem influenciar os mecanismos de patogenicidade das amostras de ambas as espécies. As amostras analisadas no presente estudo exibiram heterogeneidade quanto a presença de propriedades metabólicas e fatores de virulência: toxinas TD, Shiga-like, PLD e fermentação de sacarose (Tabela 1). Os resultados demonstraram diferenças na habilidade de interação com macrófagos pulmonares de linhagem U-937 e pneumócitos tipo II de linhagem A-549 expressa pelas amostras *C. diphtheriae* e *C. ulcerans* apresentando diferentes padrões de virulência, sendo, portanto, essa propriedade de interação com alvéolo pulmonar caracterizada como amostra-dependente. Entre as amostras isoladas de quadro de pneumonia, e não produtoras de TD, observou-se que a amostra *C. ulcerans* 809 lisou mais as monocamadas celulares quando comparada com a *C. diphtheriae* INCA-402, possivelmente em decorrência da produção das toxinas PLD e/ou Shiga-like. O efeito citotóxico às monocamadas apresentado pela amostra *C. ulcerans* 2590 (PLD – negativa), pareceu ser independente da capacidade de produção de PLD, uma vez que

o resultado foi similar ao de *C. ulcerans* BR-AD22 (PLD – positiva). As amostras foram classificadas quanto à intensidade de virulência aos tecidos pulmonares como: V-I: *C. diphtheriae* TR-TR-241(TD – positiva, sacarose-positiva, difteria); > V-II: *C. ulcerans* 809 (TD-negativa; Shiga-like-positiva; PLD-positiva, pneumonia fatal); > V-III: *C. diphtheriae* INCA-402 (*mitis/belfanti*; TD-negativa, pneumonia); > V-IV: *C. ulcerans* 2590 (TD – negativa, PLD – negativa, difteria); > V-V: *C. ulcerans* BR-AD22 (TD-negativa, PLD-positiva); > *C. diphtheriae* CDC-E8392 (TD – positiva, sacarose-negativa, difteria).

Estes dados auxiliam a compreender a patogenicidade das amostras de *C. diphtheriae* e de *C. ulcerans* e ocorrência de casos de difteria maligna, dos tipos clássico e zoonótico, comentados na introdução, assim como de infecções invasivas acometendo os tecidos pulmonares. Tanto os patógenos *C. diphtheriae* e *C. ulcerans* foram capazes de infectar, sobreviver e replicar nos tecidos pulmonares. Deste modo, essas propriedades são de extrema relevância na patogenicidade de ambas as espécies independente da capacidade de produção de TD.

Conforme reportado em trabalhos anteriores, as amostras de *C. diphtheriae* e de *C. ulcerans* permaneceram viáveis e foram capazes de formar biofilme em intensidades variadas em superfícies abióticas - hidrofóbica de poliestireno e hidrofílica do vidro. As amostras de ambas as espécies interagiram com as células pulmonares independente da capacidade de formação de biofilme. Entretanto, as amostras DT-positivas, isoladas de casos clássicos de difteria respiratória, *C. diphtheriae* TR-241 (sacarose - positiva) e CDC-E8392 (sacarose - negativa), que expressaram aderência ao vidro forte e negativa e foram caracterizadas como mais e menos virulentas nos ensaios com células pulmonares (V-I e V-VI), dentre as amostras estudadas.

Interessantemente a amostra *C. diphtheriae* TR-241 (sacarose-positiva) foi caracterizada como mais virulenta nos ensaios com células pulmonares, enquanto a amostra CDC-E8392 (sacarose-negativa) foi a menos virulenta (V-I e V-VI), entre as seis amostras estudadas. A amostra *C. diphtheriae* TR- 241 foi capaz de produzir biofilme na superfície do vidro em intensidade elevada, além de expressar perfil de aderência localizada (LA) em monocamadas de alvéolo pulmonar.

Estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa com as amostras TR-241 e CDC-E8392 de *C. diphtheriae* (DT-positivas; difteria) demonstraram diferentes intensidades de ligação às monocamadas de células epiteliais de linhagem HEp-2, e expressão dos perfis de aderência: localizado (LA) e difuso (DA), respectivamente. O fenótipo LA predominou sobre o fenótipo DA quando investigado maior número de amostras. Entretanto, as amostras não

fermentadoras de sacarose que expressavam perfil de aderência DA foram mais aderentes a células HEp-2 do que as amostras fermentadoras de sacarose. As amostras também apresentaram capacidade de induzir polimerização de actina. As proteínas de superfície não fimbriais 67-72p (DIP 0733) de *C. diphtheriae* interagiram com as membranas das células HEp-2 (HIRATA et al., 2004).

Amostras de *C. diphtheriae* biovar *mitis* (n = 4) e *C. diphtheriae* biovar *gravis* (n = 1) isoladas de sangue exibiram perfis de aderência do tipo agregativo (AA) em células de linhagem HEp-2. Amostras invasivas com perfis de aderência AA agregativa de *C. diphtheriae* apresentaram cinco perfis clonais distintos avaliados por ensaios de RAPD. Apesar da diversidade clonal, todas as cinco isoladas de quadros de endocardite pareceram exibir propriedades adesivas bacterianas especiais capazes de favorecer a ruptura da barreira sanguínea e a disseminação sistêmica dos patógenos. Consequentemente, o perfil de aderência agregativa pode ser usado como uma indicação de algum potencial invasivo de amostras de *C. diphtheriae* (HIRATA et al., 2008).

Corynebacterium pseudodiphtheriticum, geralmente encontrado como parte da microbiota normal de pele e mucosa nasofaríngea, tem sido cada vez mais reconhecida como uma espécie patogênica para humanos, causando infecções com alta letalidade tanto em indivíduos imunocomprometidos como imunocompetentes, portadores ou não de comorbidades, incluindo crianças. Na França, foi relatado um surto de infecção por C. pseudodiphtheriticum em crianças com fibrose cística. *C. pseudodiphtheriticum*, principalmente reconhecido como patógeno do trato respiratório, também tem sido relacionado a casos de endocardite valvar nativa e protética, infecções hematogênicas e relacionadas a cateter intravenosos, artrite séptica, osteomielite, infecções peritoneais, genitais e do trato urinário, linfadenite supurativa, conjuntivite/ceratite/córnea, úlceras, ferida cirúrgica (MATTOS-GUARALDI; SANTOS; VIEIRA, 2023). Estudo prévio também reportado pelo nosso grupo de pesquisa com essa espécie TD-negativa de *Corynebacterium*, observou que todas as amostras testadas exibiram perfil de aderência agregativa (AA) às células de epiteliais de linhagem HEp-2. Embora as amostras de *C. pseudodiphtheriticum* não tenham demonstrado capacidade de se replicar intracelularmente, as células HEp-2 foram incapazes de eliminar totalmente o patógeno em 24 horas. Essas características podem explicar como algumas amostras de *C. pseudodiphtheriticum* causam infecção grave em pacientes humanos (SOUZA et al., 2012).

Na presente investigação utilizando o modelo alveolar *in vitro,* tanto as amostras de *C. diphtheriae e C. ulcerans* foram incapazes de expressar perfil de aderência agregativa (AA) aos

pneumócitos tipo II A-549 e macrófagos pulmonares U-937, ao contrário do observado previamente com amostras invasivas (endocardite) de *C. diphtheriae* e todas as amostras de *C. pseudodiphtheriticum* que exibiram perfil de aderência agregativa (AA) com células HEp-2. Nos ensaios com células pulmonares, a maioria das amostras estudadas apresentou perfil de aderência do tipo difuso (DA), sendo que apenas as amostras *C. diphtheriae* TR-TR-241 e *C. ulcerans* BR-AD22 apresentaram perfil de aderência localizado (LA). A análise dos dados demonstrou a ausência de correlação da capacidade de interação e de lesão do tecido pulmonar *in vitro* com os perfis de aderência expressos pelos patógenos.

Embora raramente reportado, os pneumócitos tipo II são capazes de inibir o crescimento microbiano devido às suas propriedades surfactantes e são capazes de recrutar células imunes efetoras, incluindo várias populações de macrófagos, além de secretar uma variedade de peptídeos antimicrobianos, por exemplo, b-defensinas 2, lipocalina 2 e lisozima. Os pneumócitos tipo II orquestram a imunidade inata pulmonar suprimindo ou estimulando a resposta inflamatória de macrófagos, neutrófilos e outras células imunes (RUARO et al., 2021). A imunidade inata pulmonar é liderada por células epiteliais, macrófagos, neutrófilos e células T gama-delta secretoras de interleucina 17 (IL-17). O epitélio compõe uma barreira física à infecção e expressa peptídeos antimicrobianos para eliminar microrganismos extracelulares. As toxinas bacterianas formadoras de poros permitem a entrada de DNA bacteriano no citoplasma de macrófagos alveolares, levando a produção de interferon-beta (INF-β) via sinalização STAT1/2. Este INF pode se ligar a receptores em células epiteliais e/ou induzir a produção de quimiocinas pelo macrófago. Estas quimiocinas recrutam neutrófilos da corrente sanguínea, que também podem fagocitar o patógeno. Tanto neutrófilos quanto macrófagos possuem o inflamassoma NLRP3 proteína que ativa caspase-1 e outras enzimas que clivam os membros da família de citocinas IL-1. Os macrófagos impedem o excesso de inflamação removendo as células mortas ou por apoptose ou por necrose por um processo denominado eferocitose. A gripe viral induz a suscetibilidade à infecção bacteriana através da inibição das defesas imunológicas antibacterianas. A fagocitose de bactérias por macrófagos e neutrófilos torna-se atenuada, concomitante com uma diminuição nas espécies reativas de oxigênio intracelular importante para a morte bacteriana no fagossoma (GROUSD; RICH; ALCORN, 2019).

No presente estudo foi observado efeito citotóxico nos alvéolos pulmonares com destruição das monocamadas predominante nas amostras *C. diphtheriae* TR-TR-241 e *C. ulcerans* 809, provavelmente em decorrência de necrose celular. Estudos adicionais serão feitos para averiguar se a morte celular é decorrente de apoptose e/ou necrose. Para a maioria das amostras os pneumócitos morfologicamente alterados permaneceram sendo visualizados,

possivelmente devido a processos de apoptose. Em contraste, uma amostra *C. ulcerans* que foi capaz de sobreviver e multiplicar na monocamada de macrófagos pulmonares em monoculturas, expressou maior potencial de virulência para os pneumócitos tipo II nas monocamadas de alvéolo pulmonar em co-cultivo, provavelmente em decorrência da influência do processo de interação macrófago-pneumócito (Tabela 5).

CONCLUSÕES

Experimentos utilizando o modelo alveolar *in vitro* podem ser empregados como metodologia eficaz para os estudos de mecanismos patogenicidade de *Corynebacterium* spp.

As amostras *C. diphtheriae* e *C. ulcerans* apresentaram diferentes padrões de virulência, sendo a propriedade de interação com alvéolo pulmonar caracterizada como amostra-dependente. As amostras foram classificadas quanto à intensidade de virulência aos tecidos pulmonares: V-I: *C. diphtheriae* TR-241 > V-II: *C. ulcerans* 809 > V-III: *C. diphtheriae* INCA-402 > V-IV: *C. ulcerans* 2590 > V-V: *C. ulcerans* BR-AD22 > *C. diphtheriae* CDC-E8392.

Todas as amostras de *C. diphtheriae* e de *C. ulcerans* estudas foram capazes de interagir com as monocamadas de linhagem celulares em co-cultivo de pneumócitos tipo II A-549 com macrófagos pulmonares U-937, apresentando diferenças na capacidade de células bacterianas aderidas, e no número de pneumócitos e macrófagos lesados em co-cultivos quando comparadas com células cultivadas individualmente.

A heterogeneidade da capacidade de interagir com macrófagos pulmonares de linhagem U-937 e pneumócitos tipo II de linhagem A-549 foi independente da habilidade de produção de biofilme na superfície hidrofílica do vidro e hidrofóbica do poliestireno, além da ausência da produção de *slime* em meio vermelho do Congo pelas amostras de *C. diphtheriae* e *C. ulcerans*.

Casos de morbidade e mortalidade associadas às pneumonias adquiridas após a infecção por *C. diphtheriae* e *C. ulcerans* devem ser motivo de atenção e preocupação entre os profissionais de saúde e de pesquisa. A avaliação do potencial de virulência de *Corynebacterium* spp. nos alvéolos pulmonares e dos mecanismos de defesa antibacterianos devem auxiliar com informações para as estratégias terapêuticas em um principalmente em ambientes hospitalares e surtos epidêmicos.

Pesquisas futuras empregando o modelo de alvéolo pulmonar *in vitro* serão realizadas para investigar aspectos da resposta imune do hospedeiro assim como a análise da influência da presença dos genes que codificam a toxina Shiga-like e OxyR, um componente regulador do estresse oxidativo, utilizando amostras mutantes.

REFERÊNCIAS

ABBOT, E. L.; et al. Pili mediate specific adhesion of Streptococcus pyogenes to human tonsil and skin. Cellular Microbiology. v. 9, n. 7, p. 1822-33. 2007.

ABRAMSON, T.; KEDEM, H.; RELMAN, D. A. Proinflammatory and proapoptotic activities associated with Bordetella pertussis filamentous hemagglutinin. *Infection and Immunity*. v. 69, n. 4, p. 2650-2658, 2001.

ALIBI, **S.;** et al. Occurrence of *Corynebacterium striatum* as an emerging antibiotic-resistant nosocomial pathogen in a Tunisian hospital. *Scientific Reports*. v. 7, n. 1, p. 1-8, aug. 2017.

ANDERSON, P.; et al. Diphtheria re-emerges in the unimmunized. *IDCases*. 2020 v. 23, n. e01020, p. 1-4, dec. 2020. doi: 10.1016/j.idcr.2020.e01020.

ANTUNES, C. A.; et al. Characterization of DIP0733, a multi-functional virulence factor of *Corynebacterium diphtheriae*. *Microbiology* (Reading). v. 161, n. 3, p. 639-647, mar. 2015.

ASTON, S. J. Pneumonia in the developing world: Characteristic features and approach to management. *Respirology*. v. 22, n. 7, p. 1276-1287, 2017.

AUNG, H.; et al. Induction of monocyte expression of tumor necrosis factor alpha by the 30-kD alpha antigen of *Mycobacterium tuberculosis* and synergism with fibronectin. *Journal of Clinical Investigation*. v. 98, n. 5, p. 1261-1268, sep. 1996.

AZGHANI, A. O.; et al. *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein F is an adhesin in bacterial binding to lung epithelial cells in culture. *Microbial Pathogenesis*. v. 33, n. 3, p. 109-114, sep. 2002.

BADELL, E.; et al. *Corynebacterium rouxii* sp. nov., a novel member of the diphtheriae species complex. *Research in Microbiology*. v. 171, p. 122-127, 2020.

BENAMROUCHE, N.; et al. Microbiological and molecular characterization of *Corynebacterium diphtheriae* isolated in Algeria between 1992 and 2015. *Clinical Microbiology Infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. v. 22, n. 12, p. 1-30, dec. 2016.

BERGER, A.; et al. Two cases of cutaneous diphtheria associated with occupational pig contact in Germany. *Zoonoses Public Health*. 2013 Dec; v. 60, n. 8, p. 539-542, dec. 2013.

BERGIN, I. L.; et al. Isolation and characterization of *Corynebacterium ulcerans* from cephalic implants in macaques. *Comparative Medicine*. v. 50, n. 5, p. 530-535, 2000.

BERMUDEZ, L. E.; GOODMAN, J. *Mycobacterium tuberculosis* invades and replicates within type II alveolar cells. *Infection and Immunity*. v. 64, n. 4, p. 1400-1406, apr. 1996.

BERNARD, K. The genus *Corynebacterium* and other medically relevant coryneform-like bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 50, n. 10, p. 3152- 3158, 2012.

BEZJAK, V. Differentiation of Corynebacterium diphtheriae of the mitis type found in diphtheria and ozaena. I. Biochemical properties. Antonie van Leeuwenhoek. v. 20, p. 269–272, 1954.

BIBB, L. A.; Schmitt, M. P. The ABC transporter HrtAB confers resistance to hemin toxicity and is regulated in a hemin-dependent manner by the ChrAS two-component system in *Corynebacterium diphtheriae*. *Journal Bacteriology*. v. 1922, n. 18, p. 4606-4617, sep. 2010.

BOLT, F.; et al. Multilocus sequence typing identifies evidence for recombination and two distinct lineages of *Corynebacterium diphtheriae*. *Juornal of Clinical Microbiology*. 2010 Nov; v. 48, n. 11, p. 4177-4185, nov. 2010.

BONMARIN, I.; et al. Diphtheria: a zoonoticdisease in France? *Vaccine.* 2009; v. 27, p. 4196-4200, 2009.

BOTH, L.; et al. Molecular and epidemiological review of toxigenic diphtheria infections in England between 2007 and 2013. *Juornal of Clinical Microbiology*. v. 53, n. 2, p. 567-572, fev. 2015.

BRAGA, R. L. L.; et al. Intracellular persistence of enteroaggregative *Eschericha coli* induces a proinflammatory cytokines secretion in intestinal epitelial T84 cells. *Arq. Gastroenterol.* v. 55, n. 2, p. 133-137, apr-jun. 2018.

BRANDT, J. P.; MANDIGA P. Histology, Alveolar Cells. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. jan, 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. Guia de Vigilância em Saúde: volume único [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. – 3ª. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2019.

BURKOVSKI, A**.** Cell envelope of Corynebacteria: structure and influence on pathogenicity. *ISRN Microbiol*ogy. v. 2013, n. 935736, p. 1-11, 2013

BURKOVSKI, A**.** (Ed). *Corynebacterium diphtheriae* and Related Toxigenic Species. Genomics, Pathogenicity and Aplications. Ebook, chaper 6. Springer. 2014.

BURKOVSKI, A. The role of corynomycolic acids in *Corynebacterium*-host interaction. Antonie Van Leeuwenhoek. v. 111, n. 5, p. 717-725, may. 2018.

BUSSE, H. J. Family I, Corynebacteriaceae Lehmannand Neumann 1907AL emend. Stackebrandt, Raineyand Ward-Rainey 1997,485 emend. Zhi, Li and Stackebrandt 2009, 593. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Whitman W B, Goodfellow M, Kämpfer P et al. (Eds). Springer, NY, USA, p. 244–245, 2012.

CÁCERES, S. M.; et al. The *Mycobacterium tuberculosis* membrane protein Rv0180c: Evaluation of peptide sequences implicated in mycobacterial invasion of two human cell lines. *Peptides*. 2011 Jan;v. 32, n. 1,p. 1-10, jan. 2011.

CANÁRIO VIANA, M. V.et al. Evidence of episodic positive selection in *Corynebacterium diphtheriae* complex of species and its implementations in identification of drug and vaccine targets. *PeerJ*. v. 10, n. 12662, p. 1-20, fev. 2022.

CAPPELLI, E. A. et al. Insights of OxyR role in mechanisms of host-pathogen interaction of Corynebacterium diphtheriae. Brazilian Journal Microbiology. v. 53, n. 2, p. 583-594, jun. 2022.

CARIUS, P. et al. A Monoclonal Human Alveolar Epithelial Cell Line ("Arlo") with Pronounced Barrier Function for Studying Drug Permeability and Viral Infections. *Advanced Science.* v. 10, n. 8, p. 1-23, 2023.

CHAPETON-MONTES, J. A. et al. Characterizing the *Mycobacterium tuberculosis* Rv2707 protein and determining its sequences which specifically bind to two human cell lines. *Protein science : a publication of the Protein Society*. v. 17, n. 2, p. 342-351, fev. 2008.

CHINGWARU, W. et al. Mammalian cell cultures as models for *Mycobacterium tuberculosis* - human immunodeficiency virus (HIV) interaction studies: A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. v. 9, n. 9, p. 832-838, sep. 2016.

COLOMBO, A. V.; et al. *Corynebacterium diphtheriae* surface proteins as adhesins to human erythrocytes. *FEMS Microbiology Letters*. v. 197, n. 2, p. 235-239, 2001.

CORNACCHIONE, P. et al. Group B streptococci persist inside macrophages. *Immunology*. v. 93, n. 1 p. 86-95, jan. 1998.

CORRÊA, J. I., et al. Gene expression of *Corynebacterium pseudotuberculosis* virulence factors and their role in the pathogenesis of caseous lymphadenitis. *Research, Society and Development*. v. 11, n. 14, p. 1-13, 2022.

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

COYLE, M. B.; et al**.** Erythromycin and clindamycin resistance in *Corynebacterium diphtheriae* from skin lesions. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v. 16, n. 4, p. 525-527, oct. 1979.

CRANDALL, E. D; MATTHAY, M. A. Alveolar epithelial transport. Basic science to clinical medicine. *Am J Respir Crit Care Med*. v. 163, n. 4, p. 1021-1029, mar. 2001.

DA COSTA L L. et al. Pulmonary surfactant phosphatidylcholines induce immunological adaptation of alveolar macrophages. *Molecular immunology*. v. *122*, p. 163–172, jun. 2020. doi: 10.1016/j.molimm.2020.04.010.

DA COSTA, A. F.et al. Reactive oxygen species involved in apoptosis induction of human respiratory epithelial (A549) cells by *Streptococcus agalactiae. Microbiology.* v. 162 n. 1, p. 94-99, 2016.

DANELISHVILI, L. et al. *Mycobacterium tuberculosis* infection causes different levels of apoptosis and necrosis in human macrophages and alveolar epithelial cells. *Cellular Microbiology*. 2003 Sep;v. 5, n. 9, p. 649-660, 2003.

DANGEL, A.; et al. NGS-based phylogeny of diphtheria-related pathogenicity factors in *different Corynebacterium spp. implies species-specific virulence transmission. BMC Microbiology.* 2019 Feb v. 19, n. 28, p. 1-16, 2019.

DANGEL, A.; et al. *Corynebacterium silvaticum* sp. nov., a unique group of NTTB corynebacteria in wild boar and roe deer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. v. 70, n. 6, p. 3614-3624, jun 2020.

DAZAS, M.; et al. Taxonomic status of *Corynebacterium diphtheriae* biovar Belfanti and proposal of *Corynebacterium belfantii* sp. nov. *International Journal Systematic and Evolucionary Microbiology*. v. 68, n. 12, p. 3826-3831, dec. 2018.

DE PINHO RB, et al. *Mycobacterium bovis* BCG expressing the proteins CP40 or CP09720 of *Corynebacterium pseudotuberculosis* promotes protection in mice after challenge. Vaccine. v. 42, n. 1, p. 33-39, 2024.

DEWINTER, L. M; BERNARD, K. A; ROMNEY, M. G. Human clinical isolates of *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans* collectedin Canada from 1999 to 2003 but not fitting reporting criteria for cases of diphtheria. *Journal of Clinical Microbiology.* v. 43, p. 3447-3449, 2005.

DE ZOYSA, A. et al. Characterization of toxigenic *Corynebacterium ulcerans* strains isolated from humans and domestic cats in the United Kingdom. *Journal of Clinical Microbiology.* v. 43, p. 4377-4381, 2005. doi: 10.1128/JCM.43.9.4377-4381.2005.

DIAS, A. A. S. O. et al. *Corynebacterium ulcerans* diphtheria: an emerging zoonosis in Brazil and worldwide. *Revista de Saúde Pública*. v. 45, p. 1176-1191, 2011

DIAS, A. A. S. F. C. Jr.; et al. *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*. v. 10, n. 8, p.743-748, oct. 2010.

DIEM, K. et al. Mechanical stretch activates piezo1 in caveolae of alveolar type I cells to trigger ATP release and paracrine stimulation of surfactant secretion from alveolar type II cells. *FASEB J*. v. 34, n. 9; p. 12785-12804, sep. 2020.

DOS SANTOS, C. S. et al. Non-opsonic phagocytosis of homologous non-toxigenic and toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains by human U-937 macrophages. *Microbiology and Immunoogyl*. v. 54, n. 1, p. 1-10, 2010.

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

FEHRENBACH, H. Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited. *Respiratory Research*. v. 2, n. 1 p. 1-20, 2001.

FITZGERALD, R.P.; ROSSER, A. J.; PERERA, D. N. Non-toxigenic penicillin-resistant cutaneous *C. diphtheriae* infection: a case report and review of the literature. *Journal of Infection and Public Health*. v. 8, n. 1, p. 98-100, 2015.

FLECKNELL P. Replacement, reduction and refinement. *ALTEX*. v. 19, n. 2, p. 73-78, 2002.

FORMIGA, F.; et al. Loss of bone mineral density in premenopausal women with systemic lupus erythematosus. Ann Rheum Dis. 1995 Apr;v. 54, n. 4, p. 274-276.

FOSTER, G.; et al. *Corynebacterium ulcerans* in free-ranging otters. *The Veterinary Record*. v. 150, n. 16. p. 524, 2002,

FOSTER, K. A.; et al. Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism. *Experimental Cell Research*. v. 243, n. 2, p. 359-366, 1998.

FREEMAN, D. J.; FALKINER, F. R.; KEANE, C. T. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal of Clininical Pathology*. v. 42, n. 8, p. 872-874, 1989.

FUNKE, G.; BERNARD, K. A. Coryneform gram-positive rods. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. *Manual of Clinical Microbiology*. 9th. Washington DC, United States of America: Ed. ASM Press. p. 485-514, 2007.

FUNKE, G.; et al. Clinical microbiology of coryneform bacteria. Clin Microbiol Rev. v. 10, n. 1, p. 125-159, jan. 1997. doi: 10.1128/CMR.10.1.125. PMID: 8993861; PMCID: PMC172946.

GAJEWSKA, J.; CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA, W. Biofilm Formation Ability and Presence of Adhesion Genes among Coagulase-Negative and Coagulase-Positive Staphylococci Isolates from Raw Cow's Milk. *Pathogens*. v. 9, n. 8, p. 1-12, 2020.

GALAZKA, A. M; ROBERTSON, S. E; OBLAPENKO, G. P. Resurgence of diphtheria. Eur J Epidemiol. v. 11, n. 1, p. 95-105, 1995.

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

GIARD, D.J. et al. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. J. nut. Cancer Inst.,1973; 51, 1417-1423.

GILBERT, R.; STEWART, F. C. *Corynebacterium ulcerans*: a pathogenic microorganism resembling *C. diphtheriae*. *Journal of Laboratory and Clininical Medicine.* v. 12, p. 756-761, 1926.

GOMES, D. L. R., et al. *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, nov. 2009.

GOMES, D. L. R., et al. Sub MICs of penicillin and erythromycin enhance biofilm formation and hydrophobicity of *Corynebacterium diphtheriae* strains. *Journal Medicine Microbiology*. v. 62, p. 754-760, 2013.

GROUSD, J. A; RICH, H. E; ALCORN, J. F. Host-Pathogen Interactions in Gram-Positive Bacterial Pneumonia. *Clinical Microbiology Review*. v. 32, n. 3, p. 1-22, may. 2019.

GUEDES, M. T.; et al. Infecção por *Corynebacterium pseudotuberculosis* em equinos: aspectos microbiológicos, clínicos e preventivos. Pesq. Vet. Bras 2015, v. 35, n. 8, p. 701-708, 2015.

GUGLIELMINI, J.; et al. Genomic Epidemiology and Strain Taxonomy of *Corynebacterium diphtheriae*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2021 Nov 18; v. 59, n. 12, p. 1-16, 2021.

HACKER, E., et al. *Corynebacterium ulcerans*, an emerging human pathogen. *Future Microbiology*. v. 11, p. 1191-1208, set. 2016.

HADFIELD, T. L., et al. The pathology of diphtheria. *The Journal of infectious diseases*. v. 181, n.1, p. 116-120, 2000.

HATANAKA, A. et al. *Corynebacterium ulcerans* diphtheria in Japan. *Emerging Infectious Diseases.* v. 9, p. 752-753, 2003.

HENNART, M.; et al. Population genomics and antimicrobial resistance in *Corynebacterium diphtheriae*. Genome Med. 2020 Nov 27; v. 12, n. 107, p. 1-18, nov. 2020.

HIRATA, R. Jr.; et al. Intracellular viability of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains in HEp-2 cells. *FEMS Microbiol Letters*. v. 215, p. 115-119, 2002.

HIRATA, R. Jr.; et al. Similarity of *rpoB* gene sequences of sucrose-fermenting and non-fermenting *Corynebacterium diphtheriae* strains. *Antonie van Leeuwenhoek.* v. 99, p. 733-737, 2011.

HIRATA, R. Jr. et al. 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.

HIRATA, R. Jr. et al. Patterns of adherence to HEp-2 cells and actin polymerisation by toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* strains. *Microbial Pathogenesis*. v. 36, p. 125-130, 2004.

HOEFER, A.; et al. Molecular and Epidemiological Characterization of Toxigenic and Nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium belfantii*, *Corynebacterium rouxii*, and *Corynebacterium ulcerans* Isolates Identified in Spain from 2014 to 2019. *Journal of Clininical Microbiology*. v. 59, n. 3, p. 1-15, 2021.

HÖFLER, W. Cutaneous diphtheria. *Infections Journal Dermatology.* 1991; v. 30, p. 845–847, 1991.

HOGG, R. A.; et al. Possible zoonotic transmission of toxigenic *Corynebacterium ulcerans* from companion animals in a human case of fatal diphtheria. *Veterinary Record*. v. 165, n. 23, p. 691-692, 2009.

HOMMEZ, J.; et al. Identification of non-lipophilic corynebacteria isolated from dairy cows with mastitis. *Journal of Clinical Microbiology.* v. 37, p. 954-957, 1999.

HUBRECHT C R, CARTER E. The 3Rs humane experimental technique: implementing change. Animals (Basel). v. 9, n. 754, p. 1-10, set, 2019.

JAIN, S. et al. Community-Acquired Pneumonia Requiring Hospitalization among U.S. Adults. *The New Engadl Journal of Medicine*. v. 373, n. 5, p. 415-427, 2015.

JONES, A. L; BEVERIDGE, T. J.; WOODS, D. E. Intracellular survival of *Burkholderia pseudomallei*. *Infection Immunology*. v. 64, n. 3, p. 782-790, 1996.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Histologia Básica. 13ª edição. Rio de Janeiro- RJ: Guanabara Koogan, 2017.

KALIL, A. C. et al. Management of Adults With Hospital-acquired and Ventilator-associated Pneumonia: 2016 Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the American Thoracic Society. *Clinical infectious diseases*. v. 63, n. 5, p. 1-13, sep. 2016. doi: 10.1093/cid/ciw353.

KAMALI DOLATABADI, R. et al. Phenotypicand Genotypic Characterization of Clinical Isolates of Intracellular Adherent-Invasive *Escherichia coli* Among Different Stages, Family

History, and Treated Colorectal Cancer Patients in Iran. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. v. 12, n. 938477, p. 1-12, jul. 2022.
KATSUKAWA, C.; et al. Toxigenic Corynebacterium ulcerans isolated from domestic dog for the first time in Japan. *Jpnese Journal of Infection Diseases*. v. 62, n. 2, p. 171-172, 2009.
KAUFMANN, D.; OTT, P.; ZBINDEN, R. Laryngopharyngitis by *Corynebacterium ulcerans*. *Infection*. v. 30, p. 168–170, 2002.

KIMURA, Y.; et al. Acute peritonitis due to *Corynebacterium ulcerans* in a patient receiving continuous ambulatory peritoneal dialysis: a case report and literature review. *Clinical and Experimental Nephrology*. v. 15, n. 1, p. 171-174, 2011.

KLETTING, S.et al. Co-culture of human alveolar epithelial (hAELVi) and macrophage (THP-1) cell lines. *ALTEX*. v. 35, n. 2, p. 211-222, 2018.

KOLODKINA, V.; DENISEVICH, T.; TITOV, L. Identification of *Corynebacterium diphtheriae* gene involved in adherence to epithelial cells. *Infection, Genetic and Evolution*. v. 11, p. 518-521, 2011.

KOMIYA, T.; et al. Two Japanese *Corynebacterium ulcerans* isolates from the same hospital: ribotype, toxigenicity and serum antitoxin titre. *Journal of Medical Microbiology.* 2010; v. 59, p. 1497-1504, 2010.

KUEHN, A.et al. Human alveolar epithelial cells expressing tight junctions to model the air-blood barrier. *ALTEX*. v. 33, n. 3, p. 251-260, 2016.

LARTIGUE, M. F. Et al. *Corynebacterium ulcerans* in an immunocompromised patient with diphtheria and her dog. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 43, p. 999-1001, 2005.

LEE, Y. C.; RANNELS, D. E. Alveolar macrophages modulate the epithelial cell response to coal dust in vitro. *The American Journal of Physiology*. v. 270, n. 14, p. 123-132, jan. 1996.

LEUNG, A. K.; WONG, A. H. C.; HON, K. L. Community-Acquired Pneumonia in Children. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery*. v. 12, n. 2, p. 136-144, 2018.

Li, Z. C., et al. Identification and analysis of 2 *Corynebacterium diphtheria* strains in Guangdong Province. Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi *[Chinese journal of preventive medicine]* V. 56, n. 4, p. 427-432, apr. 2022.

LIEBER, M. et al. A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *International journal of cancer*. v. 17, n.1, p. 62–70. 1976.

LPSN. List of prokaryotic names with standing in nomenclature. http://www.bacterio.net/corynebacterium.html. Acessado em 01/12/2023

LUONG, T. T; et al. Ribonuclease J-Mediated mRNA Turnover Modulates Cell Shape, Metabolism and Virulence in *Corynebacterium diphtheriae*. *Microorganisms*. 2021 Feb 14;v. 9, n. 389, p. 1-17, 2021.

MANDLIK, A. et al. *Corynebacterium diphtheriae* employs specific minor pilins to target human pharyngeal epithelial cells. *Molecular microbiology*, v. 64, n. 1, p. 111-124, abr. 2007.

MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; ORTEGA, M. C.; SUÁREZ, A. I. Comparison of E-test with broth microdilution and disk diffusion for susceptibility testing of coryneform bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*. 1995; v. 33, n. 5, p. 1318-1321.

MATTOS-GUARALDI, A. L. et al. Characterization of surface saccharides in two *Corynebacterium diphtheriae* strains. *FEMS Microbioogyl Letters*. v. 170, n. 1, p. 159-166, jan. 1999.

MATTOS-GUARALDI, A. L.; DUARTE FORMIGA, L. C.; PEREIRA, G. A. Cell surface components and adhesion in *Corynebacterium diphtheriae*. *Microbes and infection*, v. 2, n. 12, p. 1507-1512, out. 2000.

MATTOS-GUARALDI, A.L.; FORMIGA, L. C. Relationship of biotype and source to the hemagglutination and adhesive properties of *C. diphtheriae*. Braz *Journal of Medicine and Biological Ressearch*. 1991; v. 24, n. 4, p. 399-406, 1991.

MATTOS-GUARALDI, A. L.; FORMIGA, L. C.; ANDRADE, A. F. Trans-sialidase activity for sialic acid incorporation on *Corynebacterium diphtheriae*. *FEMS Microbiology Letters*. v. 168, n. 2, p. 167-172, 1998.

MATTOS-GUARALDI, A. L.; HIRATA, R. JR.; AZEVEDO, V. A. C. *Corynebacterium diphtheriae, Corynebacterium ulcerans* and *Corynebacterium pseudotuberculosis* – General Aspects. In Burkovski, A (eds) *Corynebacterium diphtheriae* and Related Toxigenic Species. *Springer.* Nov, 2014:p. 15-37, nov. 2014. doi.org/10.1007/978-94-007-7624-1_2.

MATTOS-GUARALDI, A. L. et al. Diphtheria remains a threat to health in the developing world: an overview. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. v. 98, n. 8, p. 987-993, 2003.

MATTOS-GUARALDI, A. L. et al. 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**.** *Mem Inst Oswaldo Cruz*. v. 103, n. 4, p. 396-400, 2008.

MATTOS-GUARALDI, A. L.; SANTOS, L. S.; VIEIRA, V. V**.** Coryneform Gram-Positive Rods. In: Karen C. Carroll and Michael A. Pfaller (ed) Manual of Clinical Microbiology, 13 Ed *American Society for Microbiology Press*, Washington, D.C. *ISBN*. 2023.

MITCHELL, G.; CHEN, C.; PORTNOY, D. A. Strategies Used by Bacteria to Grow in Macrophages. *Microbiology Spectrum*. v. 4, n. 3, p. 1-38, jun. 2016.

MEINEL, D. M.; et al. Next generation sequencing analysis of nine *Corynebacterium ulcerans* isolates reveals zoonotic transmission and a novel putative diphtheria toxin-encoding pathogenicity island. *Genome Medicine*. v. 6, n. 11p. 1-13, 2014.

MOKROUSOV, I. *Corynebacterium diphtheriae*: genome diversity, population structure and genotyping perspectives. *Infection Genetics Evololution*. v. 9, n. 1,p. 1-15, jan. 2009.

MÖLLER, J., et al. *Corynebacterium diphtheriae* Proteome Adaptation to Cell Culture Medium and Serum. *Proteomes*. v. 9, n. 14, p. 1-16, mar. 2021.

MOOKERJEE, B. K.; KANEGASAKI, S.; KATO, I. Effects of diphtheria toxin and other exotoxins on oxidant generation by human and murine phagocytes. *Developmental and Comparative Immunology*. v. 6, n. 1, p. 161-170, 1982.

MOREIRA, L. O. et al. 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, out. 2003.

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

MORRIS, W. E.; UZAL, F. A.; CIPOLLA, A. L. Pyogranulomatous meningoencephalitis in a goat due to *Corynebacterium ulcerans*. *Veterinary Record*. v. 156, n. 10, p. 317-318, 2005.

MURPHY, JR. *Corynebacterium diphtheriae*. In: Baron S, editor. Medical Microbiology. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston. Chapter 32, 1996.

MUTTAIYAH, S.; et al. *Corynebacterium diphtheriae* endocarditis: a case series and review of the treatment approach. *International Journal of Infectious Diseases.* v. 15, n. 9, p. 584-588, sep. 2011.

NAEEM, A.; RAI, S. N.; PIERRE, L. Histology, Alveolar Macrophages. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. jan. 2023.

NASIM, F.; DEY, A.; QURESHI, I. A. Comparative genome analysis of *Corynebacterium* species: The underestimated pathogens with high virulence potential. *Infection, Genetics and Evolution*. v. 93, n. 104928, p. 1-10, sep. 2021.

NUREKI, S.; et al. *Corynebacterium ulcerans* infection of the lung mimicking the histology of Churg--Strauss Syndrome. *Chest*. v. 131, n. 4, p. 1237-1239, apr. 2007.

OLSON, M. E.; et al. Gangrenous dermatitis caused by *Corynebacterium ulcerans* in Richardson ground squirrels. *Journal of American Veterinary Medical Association*. v. 193, n. 3, p. 367-368, 1988.

OPAS/OMS- Organização Pan-Americana da Saúde. Atualização Epidemiológica Difteria 25 de Junho de 2021. Disponível em: https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/54474/OPASBRAPHE210047_por.pdf?sequence=1&isAllowed=y#:~:text=No%20Brasil%2C%20entre%202019%20e,foram%20confirmados%2C%20sem%20%C3%B3bitos%20notificados

OTSUJI, K.; et al. The first fatal case of *Corynebacterium ulcerans* infection in Japan. *JMM Case Reports*. v. 4, p. 1-5, 2017.

OTT, L. Adhesion properties of toxigenic corynebacteria. *AIMS microbiology*, v. 4, n. 1, p. 85-103, 2018.

OTT, L. et al. *Corynebacterium diphtheriae* invasion-associated protein (DIP1281) is involved in cell surface organization, adhesion and internalization in epithelial cells. *BMC Microbiology*, v. 10, 2010.

PARVEEN, S.; BISHAI, W. R.; MURPHY, JR. *Corynebacterium diphtheriae*: Diphtheria Toxin, the *tox* Operon, and Its Regulation by $Fe2^{+}$ Activation of apo-DtxR. *Microbiol Spectr*. v. 4, p. 1-25, 2019.

PASTERNAK, J. New methods of microbiological identification using MALDI-TOF. Eistein (São Paulo), v. 10, n. 1, p. 118-119, 2012.

PEIXOTO, R. S.; et al. Phenotypic aspects and pathogenic potential of *Corynebacterium diphtheriae* strains isolated from cancerpa tientwith osteomyelitis. *RBAC*. v. 43, n. 3, p. 230-236, 2011.

PENG, E. D.; et al. Iron and Zinc Regulate Expression of a Putative ABC Metal Transporter in *Corynebacterium diphtheriae*. *Journal of Bacteriology*. 2018 Apr 24;v. 200, n. 10, p. 1-18, may.2018. doi: 10.1128/JB.00051-18.

PENG, E. D.; SCHMITT, M. P. Identification of zinc and Zur-regulated genes in *Corynebacterium diphtheriae*. PLoS One. v. 14, n. 8, p. 1-19, aug. 2019.

PEREIRA, E. M. et al. A Brazilian lineage of *Staphylococcus lugdunensis* presenting rough colony morphology may adhere to and invade lung epithelial cells. *Journal of medical microbiology.* v. 61, n. 4, p. 463-469, apr. 2012.

PEREIRA, G. A.; et al. Antimicrobial resistance among Brazilian *Corynebacterium diphtheriae* strains. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. v. 103, n. 5, p. 507-510, aug. 2010.

PERKINS, S. et al. Investigations and control measures following a non-travel-associated case of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae*. *Euro Surveillance*. 2010; v. 15, n. 16, p. 1-3, apr. 2010.

PIVOT, D. et al. Carriage of a Single Strain of Nontoxigenic *Corynebacterium diphtheriae* bv. Belfanti (*Corynebacterium belfantii*) in Four Patients with Cystic Fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2019 Apr 26; v. 57. N. 5, p. 1-8, may. 2019.

PRYGIEL, M.; et al. New *Corynebacterium* Species with the Potential to Produce Diphtheria Toxin. *Pathogens*. v. 11 n. 1264, p. 1-13, 2022.

REZAEIFARD, M. et al. Production of IgY polyclonal antibody against diphtheria toxin and evaluation of its neutralization effect by Vero cell assay. *BMC Biotechnology*. 2021 May 12; v. 21, n. 34, p. 1-7, 2021.

ROGERS, E. A.; DAS, A.; TON-THA, T. H. Adhesion by pathogenic corynebacteria. *Advances in Experimental Medicine Biology*. v. 715, p. 91-103, 2011.

ROSS, M. H.; PAWLINA, W. Histologia: texto e atlas. Em correlação com biologia celular e molecular. – Rio de Janeiro - RJ: Guanabara Koogan, 2012.

RUARO, B.; et al. The History and Mystery of Alveolar Epithelial Type II Cells: Focus on Their Physiologic and Pathologic Role in Lung. *International Journal of Molecular Sciences*. v. 22, n. 2566, p. 1-16, 2021.

SABBADINI, P. S.; et al. *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.

SADER, H. S.; et al. Sensibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas do trato respiratório de pacientes com infecções respiratórias adquiridas na comunidade: resultados brasileiros do Programa SENTRY de Vigilância de Resistência a Antimicrobianos dos anos de 1997 e 1998. *Journal Pneumology*. v. 27, n. 1, p. 25-34, 2001.

SANGAL, V.; BURKOVSKI, A. Chapter 4 - Insights into and old new foes: Pan-genomics of *Corynebacterium diphtneriae* and *Corynebacterium ulcerans*. Editor (s): Debmalya Barh, Siomar Soares, Sandeep Tiwari, Vasco Azevedo, Pan-genomics: Applications, Challenges, and Future Prospects, Academic Press, 2020, Pages 81-100. Disponível em: https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817076-2.00004-4

SANGAL, V.; HOSKISSON, P. A**.** Corynephages: infections of the infectors. In Burkovski A, editor. *Corynebacterium diphtheriae* and related toxigenic species. Dordrecht: *Springer*; 67-81, 2014.

SANGAL, V.; 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.

SANGAL, V.; et al. Diphtheria-like disease caused by toxigenic *Corynebacterium ulcerans* strain. *Emerging Infectious Diseases*. v. 20, n. 7, p. 1257-1258, jul. 2014. doi: 10.3201/eid2007.140216.

SANTOS, A. S.; et al. Searching whole genome sequences for biochemical identification features of emerging and reemerging pathogenic *Corynebacterium* species. *Functional and Integrative Genomics.* v. 18, n. 5, p. 593-610, sep. 2018.

SANTOS, L. S.; et al. Diphtheria outbreak in Maranhão, Brazil: microbiological, clinical and epidemiological aspects. *Epidemiology and Infection*. v. 143, n. 4, p. 791-798, mar. 2015a.

SANTOS, L. S.; et al. Tellurite resistance: a putative pitfall in *Corynebacterium diphtheriae* diagnosis? Antonie Van Leeuwenhoek. v. 108, n. 5, p. 1275-1279, nov.2015b.

SANTOS, L. S. et al. *Corynebacterium diphtheriae* putative tellurite-resistance protein (CDCE8392_0813) contributes to the intracellular survival in human epithelial cells and lethality of Caenorhabditis elegans. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. v. 110, n. 5, p.662-668, aug. 2015c.

SATTAR, S. B. A.; SHARMA. S. Bacterial Pneumonia. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. jan. 2023.

SBIM. *Sociedade Brasileira de Imunologia.*São Paulo, 2023. Disponivel em: https://familia.sbim.org.br/vacinas/vacinas-disponiveis/vacinas-combinadas-a-dtpa. Acesso em novembro de_2023.

SCHLEZ, K.; et al. *Corynebacterium rouxii*, a recently described member of the *C. diphtheriae* group isolated from three dogs with ulcerative skin lesions. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2021 Sep; v. 114, n. 9, p. 1361-1371, sep. 2021. doi: 10.1007/s10482-021-01605-8. Epub 2021 Jun 25. PMID: 34170418; PMCID: PMC8379122.

SCHUHEGGER, R.; KUGLER, R.; SING, A. Pitfalls with diphtheria-like illness due to toxigenic *Corynebacterium ulcerans. Clinial Infectios Diseases.* v. 47, n. 2, p. 288 - 289, 2008.

SCHUHEGGER, R.; et al. Pigs as source for toxigenic *Corynebacterium ulcerans*. *Emerging Infectious Diseases.* v. 15: p. 1314–1315, 2009.

SETO, Y.; et al. Properties of coryne phage attachment site and molecular epidemiology of *Corynebacterium ulcerans* isolated from humans and animals in Japan. *The Journal of Infections Diseases.* v. 61, p. 116–122, 2008.

SHADNEZHAD, A.; NAEGELI, A.; COLLIN, M. CP40 from *Corynebacterium pseudotuberculosis* is an endo-β-N-acetylglucosaminidase. *BMC Microbiology*. v. 16, n. 261, p. 1-10, 2016.

SHARMA, N.; et al. Resurgence of diphtheria in Northern Gujarat: A retrospective study done in Banas Medical College and Research Centre, Palanpur, Gujarat. J Family Med Prim Care. v. 11, n. 11, p. 7163-7167, nov. 2022.

SHARMA, N. C.; et al. Diphtheria. *Nature Review Diseases Primers.* v. 5**,** n. 81, p. 1-18, 2019. doi.org/10.1038/s41572-019-0131-y. PMID: 31804499.

SHARMA, P.; et al. Role of pilus proteins in adherence and invasion of *Streptococcus agalactiae* to the lung and cervical epithelial cells. *Jornal of Biology Chemistry*. v. 288, n. 6, p. 4023-4034, fev. 2013.

SHERMAN, P.. et al. Surface properties of the Vero cytotoxin-producing Escherichia coli O157:H7. *Infection and Immunity*. v. 55, n. 8, p.1824-1829, aug. 1987. doi: 10.1128/iai.55.8.1824-1829.1987.

SHI, G. et al. MiR-1178 regulates mycobacterial survival and inflammatory responses in *Mycobacterium tuberculosis*-infected macrophages partly via TLR4. *Journal of Cellular Biochemistry*. v. 119, n. 9, p. 7449-7457. Sep. 2018.

SIMONOVA, M. A.; et al. Determination of Diphtheria Toxin in Bacterial Cultures by Enzyme Immunoassay. *Diagnostics.* v. 12, n. 2204, p. 1-8, 2022. doi: 10.3390/diagnostics12092204.

SING, A.; BIERSCHENK, S.; HEESEMANN, J. Classical Diphtheria Caused by *Corynebacterium ulcerans* in Germany: Amino Acid Sequence Differences between Diphtheria Toxins from *Corynebacterium diphtheriae* and *C. ulcerans*. *Clinical Infectious Diseases.* v. 40, p. 325–326, 2005.

SOUZA, M. C. et al. Aggregative adherent strains of *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* enter and survive within HEp-2 epithelial cells. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2012 Jun; v. 107, n. 4, p. 486-93, jun. 2012.

SOUZA, C. D.; et al. Biofilm production by multiresistant *Corynebacterium striatum* associated with nosocomial outbreak. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. v. 110, n. 2, p. 242-248, 2015.

STEPANOVIC, S. et al. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*. v. 40, n. 2, p. 175-179, apr. 2000.

SUBEDI, R.; et al. Genomic analyses reveal two distinct lineages of *Corynebacterium ulcerans* strains. *New Microbes and New Infectinfections*. v. 25, p. 7-13, may. 2018.

SWIERCZYNSKI, A.; TON-THAT, H. Type III pilus of corynebacteria: Pilus length is determined by the level of its major pilin subunit. *Journal of bacteriology,* v.188, n.4, p. 6318-6325, set. 2006.

TAGINI, F.; et al. Distinct Genomic Features Characterize Two Clades of *Corynebacterium diphtheriae*: Proposal of *Corynebacterium diphtheriae* Subsp. *diphtheriae* Subsp. nov.

and *Corynebacterium diphtheriae* Subsp. *lausannense* Subsp. nov. *Frontiers in Microbiology.* v. 17, v. 9, n. 1743, p. 1-15, aug. 2018.

TAUCH, A.; SANDBOTE, J. The Family *Corynebacteriaceae*. In: Rosenberg E., DeLong E.F., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F. (eds) The Prokaryotes. Springer, Berlin, Heidelberg, 2014.

TAYLOR, J.; et al. Toxigenic *Corynebacterium ulcerans* infection in a veterinary student in London, United Kingdom, May 2010. *Euro Surveillance.* 2010 Aug 5;v. 15, n. 31, p. 1-3.
TEJEDOR, M. T.; et al. Caseous lymphadenitis caused by *Corynebacterium ulcerans* in the dromedary camel. *The Canadian Veterinary Journal*. 2000; v. 41, n. 2, p. 126-127.

THOMAS, A.; Active Circulation of *Corynebacterium ulcerans* among Nonhuman Primates. *Microbioogyl Spectrum.* v. 10, n. 4, p.1-9, aug. 2022.

TON-THAT, H.; SCHNEEWIND, O. Assembly of pili on the surface of *Corynebacterium diphtheriae*. *Molecular microbiology*, v. 50, n. 4, p. 1429–1438, nov. 2003.

TORTORA G J. Microbiologia In: Tortora G J, Kunke B R, Case C L; tradução: Aristóbolo Mendes da Silva...[et al.]; revisão técnica: Flávio Guimarães da Fonseca.-10 ed.-Porto Alegre: Artimed, 2012.

TROST, E. et al. Comparative analysis of two complete *Corynebacterium ulcerans* genomes and detection of candidate virulence factors. *BMC genomics*, v. 12, p. 383, jul. 2011.

TRUELOVE, S. A.; et al. Clinical and Epidemiological Aspects of Diphtheria: A Systematic Review and Pooled Analysis. *Clinical Infection Diseases*. v.71, n. 1, p. 89-97, 2020.

TYLER, R. JR.; et al. Toxigenic *Corynebacterium diphtheriae* Infection in Cat, Texas, USA. *Emerging Infection Diseases*. v. 28, n. 8, p. 1686-1688, aug. 2022.

VAN DAM, A. P. et al. Difterie door infectie met *Corynebacterium ulcerans* in Nederland. *Nederlands tijdschrift voor geneeskunde.* v. 147, n.9, p. 403–406, 2003

VIEIRA S., et al. Atualização em difteria. Rev Med Minas Gerais 2019;29 (Supl 13): S21-S26. doi: 10.5935/2238-3182.20190084.

VITEK, C.R.; WHARTON, M**.** Diphtheria in the former Soviet Union: reemergence of a pandemic disease. *Emerging Infection Diseases*. 1998 Oct-Dec; v. 4, n. 4, p. 539-550, oct-dec, 1998. doi: 10.3201/eid0404.980404.

VON HUNOLSTEIN, C. et al. Molecular epidemiology and characteristics of *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans* strains isolated in Italy during the 1990s. *Journal of Medical Microbiology*. v. 52, p. 181–188, 2003.

WAGNER, K. S,; et al. Diphtheria in the United Kingdom, 1986-2008: the increasing role of *Corynebacterium ulcerans*. *Epidemiology and Infection.* v. 138, n. 11, p. 1519- 1530, 2010.

WEERASEKERA, D.; et al. Live cell imaging of macrophage/bacterium interaction demonstrates cell lysis induced by *Corynebacterium diphtheriae* and *Corynebacterium ulcerans*. *BMC Research Notes.* v. 12, n. 695, p. 1-3, 2019.

WEERASEKERA, D.; et al. The C-terminal coiled-coil domain of *Corynebacterium diphtheriae* DIP0733 is crucial for interaction with epithelial cells and pathogenicity in invertebrate animal model systems. *BMC Microbiol*. v. 18, n. 106, p. 1-13, 2018.

WELLINGHAUSEN, N.; et al A fatal case of necrotizing sinusitis due to toxigenic *Corynebacterium ulcerans*. *Journal of Medicine and Microbiology.* v. 292, p. 59-63, 2002.

WHO *World Health Organization*. 2023. Disponível em: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/pneumonia, consultado em 14/09/22.

WILLIAMS, M. C. Alveolar type I cells: Molecular Phenotype and Development *Annual Review Physiology.* v. 65, p. 669–95, 2003.

WILSON, M. J.; BRANDON, M.R.; WALKER J. Molecular and biochemical characterization of a protective 40-kilodalton antigen from *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Infection and Immunity. v. 63, n. 1, p. 206-211, jan. 1995.

WONG, M.H.; JOHNSON, M. D. Differential response of primary alveolar type I and type II cells to LPS stimulation. *PLoS One*. v. 8, n. 1, p. 1-13, 2013.

YANG, J.; et al. Interleukin-1beta responses to *Mycoplasma pneumoniae* infection are cell-type specific. *Microbial Pathogenesis*. v. 34, n. 1, p. 17-25, jan. 2003. doi: 10.1016/s0882-4010(02)00190-0.

YASUDA, I.; et al. Severe Pneumonia Caused by Toxigenic *Corynebacterium ulcerans* Infection. *Emerging Infection Diseases*. v. 24, n. 3,p. 588-591, 2018.

YUAN, Z.; et al. TREM-1 is induced in tumor associated macrophages by cyclo-oxygenase pathway in human non-small cell lung cancer. *PLoS One*. v. 9, n. 5, p. 1-10, may. 2014.

ZAKRZEWICZ, D. et al. Host-derived extra cellular RNA promotes adhesion of *Streptococcus pneumoniae* to endothelial and epithelial cells. *Scientific Reports*. v. 6, n. 37758, p. 1-13, 2016.
The Principles of Humane Experimental Technique: Timeless Insights and Unheeded Warnings

ZHANG, X. et al. Inhibitory Effect of Low-Intensity Pulsed Ultrasound on the Expression of Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Factors in U937 Cells. *Journal of Ultrasound in Medicine*. v. 36, n. 12, p. 2419-2429, 2017.