



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

**Centro Biomédico**

**Faculdade de Ciências Médicas**

**Andrezza do Espirito Santo Cucinelli**

**Caracterização funcional do gene *dip1180* e influência na patogenicidade de cepas de *Corynebacterium diphtheriae* de origens diversas**

Rio de Janeiro

2016

Andrezza do Espirito Santo Cucinelli

**Caracterização funcional do gene *dip1180* e influência na patogenicidade de cepas de *Corynebacterium diphtheriae* de origens diversas**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Ana Luiza de Mattos Guaraldi

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Alessandra Mattos Saliba

Rio de Janeiro

2016

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

C963 Cucinelli, Andrezza do Espírito Santo  
Caracterização funcional do gene *dip1180* e influência na  
patogenicidade de cepas de *Corynebacterium diphtheriae* de origens  
diversas / Andrezza do Espírito Santo Cucinelli – 2016.  
114 f.

Orientadora: Ana Luíza de Mattos Guaraldi  
Coorientadora: Alessandra Mattos Saliba

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

1. *Corynebacterium diphtheriae* – Teses. 2. Proteínas  
Hemolisinas. 3. Fatores de virulência. I. Guaraldi, Ana Luíza de  
Mattos. II. Saliba, Alessandra Mattos . III. Universidade do Estado  
do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 576.852.23

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

---

Assinatura

---

Data

Andrezza do Espirito Santo Cucinelli

**Caracterização funcional do gene *dip1180* e influência na patogenicidade de cepas de *Corynebacterium diphtheriae* de origens diversas**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 21 de dezembro de 2016.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Ana Luíza de Mattos Guaraldi

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Alessandra Mattos Saliba

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Banca Examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Ana Cláudia de Paula Rosa

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

---

Prof. Dr. Raphael do Carmo Valente

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Débora Leandro Rama Gomes

Instituto Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2016

## **DEDICATÓRIA**

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

## AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

Ao querido Prof. Dr. Raphael Hirata Junior pela ideias brilhantes, sempre disposto a ajudar e acalmar meu coração. Às risadas e brincadeiras diárias no laboratório, deixando o trabalho mais leve e gostoso do que já era.

Aos queridos professores Dr. Renato Geraldo da Silva Filho (UNIRIO), Dra. Helena Keiko Toma (UFRJ) e Msc. Sérgio Lisboa Machado (UFRJ) e a farmacêutica Ana Lúcia Silva (UFRJ) pela colaboração e atenção imprescindíveis para a realização de partes das atividades desenvolvidas durante o mestrado.

A minha grande amiga Dra. Débora Rama Gomes pela companhia e estímulo, anos antes de entrar para o mestrado. Sempre foi um prazer compartilhar momentos da minha vida pessoal e profissional com você amiga.

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

Aos amigos do Laboratório 3, Dra. Camila Antunes, Msc. Cassius Souza, Msc. Cecília Ferreira, Débora Freires, Dryelle Rodrigues, Géisica Lacerda, Guilherme Goulart, Msc. Liliane Simpson, Msc. Lincoln Sant’anna, Dra Renata Peixoto, Msc. Ricardo Carvalho, Msc.

Vanilda Viana, Yuri Faria, e também aos amigos do laboratório 4, Msc. Alexandre Monteiro, aluna de mestrado Miriam Ferreira, Dr. Rafael Valente e Msc. Sabrina Alves, por estarem sempre torcendo, colaborando e divertindo todos os momentos.

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

Aos técnicos do Departamento de Microbiologia da Faculdade de Ciências Médicas da UERJ, Emanoela Araújo, Rosileude Passos, Vinícius Duarte da Silva e Wagner Brito pelo auxílio técnico, além da receptividade e amizade desde minha chegada ao Departamento.

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

A persistência é o menor caminho do êxito

*Charles Chaplin*



## RESUMO

CUCINELLI, Andrezza do Espirito Santo. **Caracterização funcional do gene *dip1180* e influência na patogenicidade de cepas de *Corynebacterium diphtheriae* de origens diversas**. 2016. 114 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

A difteria é uma doença infectocontagiosa, imunoprevenível e de evolução aguda causada, principalmente, pelo *Corynebacterium diphtheriae*. Além da difteria clássica, o bacilo diftérico tem sido isolado de quadros de infecções invasivas atípicas, associadas a cepas não produtoras de toxina diftérica (TD), indicando o envolvimento de outros fatores de virulência. O primeiro pangenoma desta espécie permitiu identificar 57 ilhas genômicas, com conteúdo gênico altamente diferenciado, evidenciando indícios de transferência gênica horizontal, podendo esta ser uma estratégia para estabelecer diferenças nas interações hospedeiro-patógeno. A importância das hemolisinas na virulência de diferentes espécies bacterianas tem sido cada vez mais enfatizada na literatura, especialmente por serem passíveis de transferência. Algumas cepas de *C. diphtheriae* podem ser produtoras de hemolisinas, uma vez que são classificadas quanto a atividade hemolítica. Contudo, pouco se sabe sobre sua virulência, sendo este o propósito deste trabalho. Inicialmente, foi avaliada a presença de possíveis sequências gênicas codificadoras de hemolisinas em *C. diphtheriae*. Foi encontrada a sequência de uma proteína com função de citotoxina/hemolisina na cepa NCTC13129, utilizada como modelo para: encontrar sequências nas demais cepas desta espécie; prever a estrutura tridimensional e a semelhança funcional com proteínas de outras espécies; confeccionar *primers* para avaliação *in vitro*, através de PCR e construir cepa mutante, por recombinação homóloga. A influência deste gene na patogenicidade da espécie foi avaliada a partir de ensaios sobre a atividade hemolítica, interação em superfícies bióticas e abióticas e avaliação da capacidade de causar infecção hematogênica e do osso, *in vivo*, utilizando camundongos. A sequência codificante da hemolisina DIP1180, encontrada na cepa selvagem, apresentou elevada similaridade nas demais cepas desta espécie, com estrutura tridimensional altamente similar a de hemolisinas de espécies do gênero *Streptococcus*, reiterando sua possível atividade hemolítica. Através do truncamento do gene *dip1180*, foi possível demonstrar a dependência da atividade hemolítica em relação à expressão deste gene em *C. diphtheriae*. Cepas não produtoras de TD apresentaram atividade hemolítica mais intensa. A condição de microaerofilia pareceu favorecer a hemólise, exceto para as cepas não hemolíticas, MA 136 e cepa mutante LDCIC-A1. A redução na capacidade de aderir ao poliestireno e ao vidro, observada na cepa mutante demonstrou a influência deste gene na produção de biofilme. No entanto, a privação de ferro no meio de cultivo foi capaz de promover uma expressiva redução na produção de biofilme demonstrando a relevância deste íon na aderência de *C. diphtheriae*, independente da presença dos genes *tox* e *dip1180*. A análise *in vivo* da influência do gene *dip1180* sobre a atividade artritogênica de *C. diphtheriae*, demonstrou uma redução perceptível da gravidade das lesões apresentadas pelos camundongos infectados com a cepa mutante. Os dados obtidos indicam a importante contribuição do gene *dip1180* para a virulência de cepas de *C. diphtheriae*, sobretudo naquelas não produtoras de TD, por muito tempo negligenciadas e relacionadas com frequência crescente a infecções invasivas.

Palavras-chave: *C. diphtheriae*. Hemolisina . Gene *dip1180*. Infecções invasivas. Biofilme.

## ABSTRACT

CUCINELLI, Andrezza do Espirito Santo. Functional characterization and influence of dip 1180 gene on the pathogenicity of *C. diphtheriae* strains of different origins. 2016. 114 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

Diphtheria is an acute and immunopreventable disease caused by *Corynebacterium diphtheriae*. Besides classical diphtheria, *C. diphtheriae* has also been isolated from invasive infections, mainly caused by non-toxigenic strains, revealing the involvement of other virulence factors. The sequencing of the first pangenomic study of this species allowed the identification of 57 genomic islands, with highly differentiated genetic content, suggesting the horizontal transference of genetic material, and those differences could be involved in host-parasite interaction. The importance of hemolysins on the virulence of different bacterial species has been emphasized in the literature, alongside its possibility of transference between bacterial strains. Some *C. diphtheriae* strains may produce hemolysins, and some authors have classified *C. diphtheriae* strains according to its hemolytic activity. Nevertheless, little is still known about the virulence associated to hemolytic activity in *C. diphtheriae*, and this is the proposal of this investigation. At first, we have investigated the presence of putative protein sequences related to cytotoxin/hemolysin in the sequenced NCTC 13129, as a model to search for the sequences in other sequenced Brazilian strains deposited in NCBI; to predict the tridimensional structure and analyze the functional similarity to hemolysins of other species; to design primers and to evaluate the amplification after PCR reactions, and to construct a mutant strain through homologous recombination. The influence of this gene on the pathogenicity was evaluated based on hemolytic activity assays, interaction on both biotic and non-biotic surfaces, and evaluation of the strain to cause hematogenous infection and bone infection, *in vivo*, using mice model. The codifying sequence of hemolysin DIP 1180, was found in the wild type strain, and presented high similarity with other *C. diphtheriae* strains deposited in NCBI. The tridimensional structure was very similar to hemolysins of *Streptococcus* genera, reinforcing the probable hemolytic activity. The gene truncation by homologous recombination in the gene *dip1180*, demonstrated the hemolytic properties was related to the expression of this gene in *C. diphtheriae*. Non-toxigenic *C. diphtheriae* strains presented an intense hemolytic activity when compared to toxigenic strains. Capnophilic environment appeared to favor the hemolytic activity, except to non-hemolytic strains MA 136 and the mutant LDCIC-A1. A reduction in the capability to adhere to polystyrene and glass and to form biofilm was observed in the mutant LDCIC-A1 strain, demonstrating the influence of this gene in biofilm production. Iron deprivation in the culture medium was able to promote a significant reduction in biofilm production, demonstrating the relevance of this ion in the adhesion of *C. diphtheriae*, regardless of the presence of both *tox* and *dip1180* genes. The *in vivo* analysis of the influence of the *dip1180* gene on the arthritogenic activity of *C. diphtheriae* demonstrated a noticeable reduction in the severity of the lesions presented by the mice infected with the mutant strain. The data obtained indicate the important contribution of the *dip1180* gene to the virulence of *C. diphtheriae* strains, especially in non-TD producing strains, which have long been neglected and associated with increasing frequency of invasive infections.

Keywords: *C. diphtheriae*. Hemolysin . Gen *dip1180*. Invasive infections. Biofilm.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Cobertura vacinal (vacina tríplice bacteriana – DTP3) e número de casos de difteria reportados no período de 1980-2014 .....	23
Figura 2 - Regiões endêmicas para a difteria .....	25
Figura 3 - Mecanismo de ação da toxina diftérica em célula hospedeira .....	31
Figura 4 - Representação esquemática da estrutura do envelope celular de corinebactérias.....	33
Figura 5 - Representação esquemática do vetor pCR 2.1 TOPO® .....	49
Figura 6 - Comparação entre as sequências oligonucleotídicas das cepas de <i>C. diphtheriae</i> com a sequência da hemolisina DIP1180 .....	58
Figura 7 - Apresentação dos domínios conservados referente à proteína DIP1180 .....	60
Figura 8 - Modelos tridimensionais para a hemolisina em <i>Streptococcus thermophilus</i> e <i>C. diphtheriae</i> .....	64
Figura 9 - Ausência de hélices transmembranares para a DIP1180 .....	65
Figura 10 - Eletroforese em gel de agarose 1,2% com o produto da amplificação do gene <i>dip1180</i> de cepas de <i>C. diphtheriae</i> não produtoras de toxina diftérica .....	67
Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose 1,2% com o produto da amplificação do gene <i>dip1180</i> de cepas de <i>C. diphtheriae</i> produtoras de toxina diftérica .....	67
Figura 12 - Confirmação da presença do inserto <i>dip1180</i> no vetor TOPO® .....	69
Figura 13 - Avaliação da expressão dos genes <i>tox</i> e <i>dTXR</i> na cepa mutante LDCIC-A1 .....	69
Figura 14 - Análise morfo-tintorial de cepas de <i>C. diphtheriae</i> .....	70
Figura 15 - Caracterização fenotípica pelo sistema API®Coryne das cepas de <i>C. diphtheriae</i> NCTC 13129 e LDCIC-A1 .....	70
Figura 16 - Percentuais de aderência e internalização a células HEp-2 de <i>C. diphtheriae</i> .....	71
Figura 17 - Comparação da capacidade hemolítica entre as cepas <i>C. diphtheriae</i> NCTC 13129 e a cepa mutante LDCIC-A1 .....	73
Figura 18 - Quantificação da atividade hemolítica por <i>C. diphtheriae</i> .....	74
Figura 19 - Avaliação da capacidade hemolítica da cepa <i>C. diphtheriae</i> NCTC	

	13129 em microaerofilia .....	75
Figura 20 -	Formação de biofilme em poliestireno por cepas de <i>C. diphtheriae</i> , produtoras e não produtoras de toxina diftérica .....	76
Figura 21 -	Padrão de aderência e formação de biofilme em vidro por cepas de <i>C. diphtheriae</i> .....	77
Figura 22 -	Análise quantitativa da formação de biofilme por <i>C. diphtheriae</i> em poliestireno e vidro .....	78
Figura 23 -	Influência do ferro na formação de biofilme em vidro em <i>C. diphtheriae</i> .....	79
Figura 24 -	Micrografias histopatológicas de articulações de membros posteriores de camundongos infectados experimentalmente pela veia caudal com cepas de <i>C. diphtheriae</i> NCTC 13129 e LDCIC-A1 .....	81

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Origem e características biológicas das cepas de <i>C. diphtheriae</i> .....	44
Tabela 2	Caracterização de cepas de <i>C. diphtheriae</i> quanto a presença dos genes <i>tox</i> e <i>dip1180</i> .....	59
Tabela 3	Sequências oligonucleotídicas iniciadoras para o gene <i>dip1180</i> em cepas de <i>C. diphtheriae</i> .....	66
Tabela 4	Origem e caracterização de cepas <i>C. diphtheriae</i> quanto ao potencial de produção de toxina diftérica e atividade hemolítica .....	72
Tabela 5	Análise da influência do gene <i>dip1180</i> sobre a formação de biofilme em vidro por <i>C. diphtheriae</i> .....	78

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A549	Células de adenocarcinoma de pulmão humana
ADPR	<i>Adenosine diphosphate-ribose</i>
AG	Arabinogalactano
AM	Ácido micólico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CAMP	Christie, Atkins e Munch-Petersen
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
CdiLAM	Lipomanana ou Lipoarabinomanana de <i>Corynebacterium diphtheriae</i>
cDNA	DNA complementar
Cmyt	micoliltransferase de corinebactérias
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
Detroit 562	Células de faringe humana
DNA	Ácido desoxiribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
DO	Densidade óptica
DT	<i>Diphtheria-tetanus</i>
DTP3	<i>Diphtheria-tetanus-pertussis</i>
DTxR	<i>Diphtheria toxin repressor</i>
ECDC	<i>European Center for Disease Control</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
EF-2	Fator de alongamento 2
EUA	Estados Unidos da América
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
HB-EGF	<i>Heparin-binding EGF-like growth factor</i>
HeLa	Células epiteliais de carcinoma cervical
HEp-2	Células epiteliais de carcinoma de laringe humana
HUVEC	Células endoteliais de veia umbilical humana
IL	Interleucina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LAM	Lipoarabinomanana

LB	Luria Bertani
LCDIC	Laboratório de Difteria e Corinebactérias de Importância Clínica
LM	Lipomanana
MEM	<i>Eagle's Minimal Essential Medium</i>
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NAD	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NCTC	<i>National Collection of Type Cultures</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAIs	Ilhas de patogenicidade
pb	Pares de base
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PG	Peptideoglicano
PIM	Fosfatidil-mio-inositol
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
rRNA	Ácido ribonucleico ribossomal
SAC+	Sacarose positivo
SAD	Soro anti-diftérico
SFB	Soro Fetal Bovino
Spa	<i>Sortase-mediated pilus assembly</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TD	Toxina diftérica
TD-A	Fragmento A da toxina diftérica
TD-B	Fragmento B da toxina diftérica
TDCM	Dicorinomicolato trealose
$Te^R$	Resistência ao telurito
TMCM	Monocorinomicolato trealose
Tn	Transposon
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TOX-	Não produtora de toxina diftérica

TOX+	Produtora de toxina diftérica
TRS	Trato Respiratório Superior
TSA	Ágar triptico de soja
TSB	Caldo soja tripticaseína
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UNICEF	Fundo das Nações Unidas para a Infância
UV	Radiação ultravioleta
VERO	Células de rim de macaco verde africano
WHO	<i>World Health Organization</i>



## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
1	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	39
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	41
2.1	<b>Objetivos gerais</b> .....	41
2.2	<b>Objetivos específicos</b> .....	41
3	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	43
3.1	<b>Origem das cepas bacterianas e condições de cultivo</b> .....	43
3.2	<b>Análise da estrutura e domínios conservados de DIP1180 através de ferramentas de bioinformática</b> .....	45
3.3	<b>Caracterização molecular pela reação em cadeia da polimerase (PCR) ..</b>	46
3.3.1	<u>Extração do DNA genômico</u> .....	46
3.3.2	<u>PCR para detecção do gene <i>dip1180</i></u> .....	46
3.3.3	<u>Análise dos produtos de amplificação por eletroforese em gel de agarose</u> .....	47
3.4	<b>Clonagem da sequência codificadora do gene alvo <i>dip1180</i> no sistema TOPO<sup>®</sup></b> .....	47
3.4.1	<u>Preparo de cepas de <i>C. diphtheriae</i> eletrocompetentes</u> .....	47
3.4.2	<u>Transformação de cepa de <i>Escherichia coli</i></u> .....	48
3.4.3	<u>Eletroporação de <i>C. diphtheriae</i></u> .....	48
3.4.4	<u>Extração do DNA plasmidial da linhagem de <i>E. coli</i> recombinante</u> .....	49
3.4.5	<u>Extração do DNA genômico de <i>C. diphtheriae</i></u> .....	50
3.4.6	<u>PCR e extração do DNA amplificado</u> .....	50
3.4.7	<u>Confirmação da presença do inserto <i>dip1180</i> no vetor TOPO<sup>®</sup> em <i>C. diphtheriae</i></u> .....	51
3.5	<b>Ensaio de interação celular</b> .....	51
3.5.1	<u>Manutenção e preparo de células HEP-2</u> .....	51
3.5.2	<u>Ensaio quantitativo de interação bacteriana</u> .....	52
3.6	<b>Avaliação da atividade hemolítica em cepas de <i>C. diphtheriae</i></b> .....	52
3.7	<b>Avaliação da formação de biofilme em superfície de poliestireno</b> .....	53
3.8	<b>Avaliação da formação de biofilme em superfície de vidro</b> .....	54
3.9	<b>Avaliação da formação de biofilme em vidro sob condições limitantes</b>	

	de ferro .....	54
3.10	Experimentação em animais utilizando camundongos .....	55
3.11	Estudos histopatológicos .....	56
3.12	Análise estatística .....	56
4	<b>RESULTADOS</b> .....	57
4.1	Análise de Bioinformática para a proteína DIP1180 .....	57
4.2	Análise do modelo tridimensional e predição da porção transmembrana da DIP1180 .....	61
4.3	Detecção do gene <i>dip1180</i> por PCR convencional .....	66
4.3.1	<u>Oligonucleotídios iniciadores</u> .....	66
4.3.2	<u>Produtos amplificados por PCR</u> .....	66
4.4	Transformação de <i>E. coli</i> eletrocompetente <i>One Shot</i> <sup>®</sup> <i>TOP10</i> com o vetor TOPO:: <i>dip1180</i> e confirmação da presença do inserto <i>dip1180</i> .....	68
4.5	Ensaio de interação bacteriana com células HEp-2 .....	71
4.6	Avaliação da atividade hemolítica em cepas de <i>C. diphtheriae</i> .....	72
4.7	Análise quantitativa da aderência ao poliestireno de cepas de <i>C. diphtheriae</i> .....	75
4.8	Avaliação da influência do gene <i>dip1180</i> na formação de biofilme em diferentes superfícies abióticas .....	77
4.9	Avaliação da influência do ferro na formação de biofilme em vidro por <i>C. diphtheriae</i> .....	79
4.10	Papel de DIP1180 no potencial artritogênico de <i>C. diphtheriae</i> .....	80
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	82
	<b>CONCLUSÃO</b> .....	91
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	93
	<b>ANEXO</b> – Aprovação no Comitê de Ética .....	114

## INTRODUÇÃO

### **Difteria e *Corynebacterium diphtheriae***

A difteria é uma doença infectocontagiosa, imunoprevenível e de evolução aguda causada, principalmente, pelo *Corynebacterium diphtheriae*. Em sua forma clássica, caracteriza-se pelo desenvolvimento de faringite, acompanhada de manifestações toxêmicas sistêmicas. O bacilo diftérico é capaz de produzir uma exotoxina de natureza proteica, denominada toxina diftérica (TD), que tem a capacidade de atuar nos tecidos humanos, com tropismo especial para o miocárdio, sistema nervoso, rins e glândulas supra-renais (BASEMAN *et al.*, 1970; HADFIELD *et al.*, 2000; MATTOS-GUARALDI *et al.*, 2003; CERDEÑO-TÁRRAGA *et al.*, 2003; KHAN *et al.*, 2007).

Outras duas espécies de corinebactérias, *Corynebacterium ulcerans* e *Corynebacterium pseudotuberculosis* também apresentam a capacidade de produção de toxina diftérica, embora a produção por *C. diphtheriae* seja a mais comum (WAGNER *et al.*, 2010).

Epidemias de difteria vêm sendo relatadas desde o século XVII. Os primeiros relatos nas Américas datam do século XVIII e início do século XIX. Entretanto, somente em 1884, Loeffler conseguiu cultivar o bacilo da difteria, denominando-o *C.diphtheriae* (FORMIGA, 1985).

A transmissão do bacilo diftérico ocorre através do contato direto entre um indivíduo portador, sintomático ou assintomático, e outro susceptível, por meio de perdigotos, eliminados na tosse, espirro ou fala (CERDEÑO-TÁRRAGA *et al.*, 2003). Outra importante forma de contágio se dá pelo contato com lesões de pele, que contribuem para a imunização natural (MOREIRA, 1999; BURKOVSKI, 2013a). Desta forma, hábitos de higiene pessoal podem modular o processo de colonização do bacilo antes de alcançar o trato respiratório superior (QUICK *et al.*, 2000).

Os primeiros sinais/sintomas da doença iniciam-se após dois a seis dias de incubação e, geralmente, são inespecíficos, semelhantes aos quadros de viroses respiratórias, tais como mal-estar geral, febre relativamente baixa, dor de garganta (odinofagia) e perda do apetite (LEGGETT *et al.*, 2010; DAMASCO, HIRATA & MATTOS-GUARALDI, 2011).

Com a evolução da doença, pode-se observar a formação da pseudomembrana branco-acinzentada, invasiva e muito aderente, podendo se estender desde a amígdala até o trato

respiratório inferior. A presença desta é o sinal patognomônico da difteria clássica, determinante para a notificação dos casos aos órgãos de Saúde Pública. A pseudomembrana é composta por células epiteliais necróticas, leucócitos, eritrócitos e bactérias embebidas em uma rede de fibrina (MACAMBIRA, FORMIGA, E FORMIGA, 1994; KADIROVA, KARTOGLU & STREBEL, 2000; HADFIELD *et al.*, 2000; MAN *et al.*, 2010).

A partir do desenvolvimento da faringite, efeitos sistêmicos graves e letais podem se desenvolver, decorrentes da absorção da TD, proteína secretada pelo *C. diphtheriae*. A TD é capaz de promover a inibição do fator de alongamento, bloqueando a tradução e, conseqüentemente, a síntese de proteínas, levando à morte celular e comprometendo a atividade de diversos tecidos e órgãos, em especial, o miocárdio, as suprarrenais e o sistema nervoso central (SALYERS & WHITT, 1994; MAN *et al.*, 2010).

Nos casos de maior gravidade, designados como difteria maligna ou hipertóxica, o início é súbito. Ocorre um aumento importante no volume dos linfonodos da cadeia cervical e edema periganglionar, caracterizando o chamado pescoço taurino. Nesta forma, encontram-se também taquiesfigma, hipotensão arterial, miocardite e neurite. A presença do pescoço de touro associado com a membrana diftérica nas amígdalas é um sinal de alerta para complicações cardíacas como, por exemplo, a miocardite diftérica aguda. A morte ocorre devido ao bloqueio átrio-ventricular e arritmias complexas (HADFIELD *et al.*, 2000; DAMASCO, HIRATA E MATTOS-GUARALDI, 2011).

A difteria cutânea pode ocorrer a partir de uma lesão de pele, onde o bacilo se multiplica (CLARRIDGE & SPRIEGEL, 1995). Segundo MacGregor (1990), as infecções cutâneas são mais contagiosas que as do trato respiratório. Em regiões endêmicas, o patógeno pode ser encontrado em diversos tipos de lesões, incluindo picadas de insetos (FORMIGA & MATTOS-GUARALDI, 1993; GALAZKA, 2000).

Independente da capacidade de produção da toxina, o *C. diphtheriae* não se limita a colonizar as mucosas e a pele e, já foi encontrado em sítios pouco comuns, como conjuntiva, esperma, ouvido e vagina (MACHADO, 1989; FORMIGA & MATTOS-GUARALDI, 1993) sendo associado a infecções invasivas, como bacteremia, endocardite, infecções articulares, osteomielite e infecções relacionadas ao uso de cateteres, mesmo em pacientes imunizados. É preciso ressaltar que a maior parte destas infecções vem sendo associada a cepas não produtoras de TD (POILANE *et al.*, 1995; FARAJ, FRENCH E MCAUSLAN, 2003; GOMES *et al.*, 2009; HIRATA JR *et al.*, 2008; MATTOS-GUARALDI, FORMIGA, MARQUES, 2001; STAVRACAKIS-PEIXOTO *et al.*, 2011). Além disso, cepas de bacilo diftérico de diferentes biotipos vêm sendo isoladas de pacientes portadores de neoplasias,

representando uma ameaça em hospitais especializados no tratamento do câncer (PEREIRA, 2001; MATTOS-GUARALDI, FORMIGA, MARQUES, 2001; MARTINS *et al.*, 2009).

O gênero *Corynebacterium* compreende mais de 110 espécies descritas, sendo *Corynebacterium diphtheriae* a mais conhecida. É um bacilo Gram-positivo, aeróbico, imóvel, não formador de esporos e pleomórfico que, ao microscópio, tende a formar arranjos em padrões de paliçadas e/ou letras chinesas (CERDEÑO-TÁRRAGA *et al.*, 2003).

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

Devido a sua complexidade bioquímica, a espécie foi subdividida em quatro biotipos: *gravis*, *mitis*, *intermedius* e *belfanti*, de acordo com diferentes características fenotípicas, tais como: forma e tamanho das colônias formadas em ágar chocolate telurito, padrões bioquímicos e seu potencial de hemólise. A morfologia colonial permite apenas diferenciar o biotipo *intermedius*, cujas colônias são pequenas, cinzas ou translúcidas, dos demais biotipos, os quais apresentam colônias largas, opacas ou brancas. Além disso, o biotipo *intermedius* tem crescimento lipofílico em meio contendo sangue, soro ou tween 80. O biotipo *gravis* é o único capaz de fermentar glicogênio e amido. O *mitis* apresenta-se na forma de colônias grandes, largas e convexas em meio agar sangue e o *belfanti*, diferenciando-se deste pela incapacidade de reduzir o nitrato (MURRAY, 2007; SANGAL *et al.*, 2012a; SANGAL *et al.*, 2012b).

A fermentação da sacarose constitui prova diferencial na identificação de *C. diphtheriae* uma vez que manuais de diagnóstico descrevem a espécie como não fermentadora de sacarose (CLARRIDGE & SPRIEGEL, 1995). Embora a presença deste biotipo seja verificada em grande parte dos países do hemisfério norte (EFSTRATIOU *et al.*, 1998), no Brasil e em outros países da América do Sul, o biotipo fermentador de sacarose (sac+) pode ser encontrado e posteriormente relacionado com surtos epidêmicos (MATTOS-GUARALDI, FORMIGA e PEREIRA, 2000). As cepas fermentadoras foram predominantemente isoladas de trato respiratório, enquanto as isoladas de lesões cutâneas, em sua maioria, foram descritas como não fermentadoras de sacarose (MATTOS-GUARALDI & FORMIGA, 1991). Através do sequenciamento de cepas fermentadoras e não fermentadoras de sacarose e posterior análise de similaridade de regiões polimórficas do gene *rpoB*, foi possível confirmar que os isolados sacarose-positivos pertencem à espécie *C. diphtheriae*, e devem ser considerados

variantes do biotipo *mitis* (SANTOS, 2015). A técnica de sequenciamento *multilocus* (MLST) indicou não haver relação clonal entre os isolados de *C. diphtheriae* sacarose-positivos, uma vez que não fazem parte de um único complexo clonal, podendo ser encontrados em complexos clonais relacionados tanto com cepas produtoras quanto não produtoras de TD (VIGUETTI *et al.*, 2011).

Informações genéticas adicionais, a respeito das cepas de *C. diphtheriae* foram obtidas com o primeiro pangenoma desta espécie, realizado com o sequenciamento de 12 cepas isoladas de quadros de difteria clássica, pneumonia e endocardite, ocorridos em diferentes períodos e locais, e da reanotação da primeira cepa sequenciada, NCTC 13129, comparada com as demais. O pangenoma de *C. diphtheriae* compreende atualmente 4786 regiões codificadoras de proteínas e um genoma central com 1632 genes, altamente conservados nas diferentes cepas, notavelmente alto quando comparado ao de outras espécies de corinebactérias, dentre as quais *Corynebacterium jeikeium*, *Corynebacterium efficiens* e *Corynebacterium glutamicum*, que possuem somente cerca de 840 genes (YUKAWA *et al.*, 2007). Dentre os genes presentes no genoma central estão aqueles envolvidos com metabolismo energético e utilização de carbono; biossíntese de macromoléculas e formação da parede celular; replicação, reparo e transcrição do DNA; e, também, com os sistemas de regulação transcricional. Além disso, foram encontrados aproximadamente 493 genes codificadores de proteínas com função desconhecida. Adicionalmente, foram identificadas 57 ilhas genômicas sendo que algumas delas são cepa-específicas, enquanto outras estão completamente ou parcialmente conservadas em mais de uma cepa. As diferenças nos conteúdos gênicos das cepas de *C. diphtheriae* foram, majoritariamente, observadas nas ilhas genômicas localizadas ao redor da origem de replicação, onde foram percebidos diversos indícios de transferência gênica horizontal (SOARES *et al.*, 2012). São estas ilhas que contribuem significativamente para a diversidade genética de *C. diphtheriae*, compondo o percentual de 30 % referente ao genoma dispensável. Tal fato sugere que a variação no genoma distribuído é uma estratégia comum de *C. diphtheriae* para estabelecer diferenças nas interações hospedeiro-patógeno (TROST *et al.*, 2012).

## Diagnóstico laboratorial das infecções por *C. diphtheriae*

O prognóstico da difteria está intimamente relacionado ao tempo entre o início do quadro clínico e da terapêutica específica. Sendo assim, o diagnóstico, na maioria dos casos, baseia-se nos achados clínicos e na epidemiologia e, uma vez que os resultados dos exames microbiológicos podem ultrapassar o período crítico para o desenvolvimento do quadro toxêmico. Para obter o diagnóstico conclusivo da difteria é necessário isolar o bacilo diftérico, através da cultura bacteriana em meios diferenciais e demonstrar a sua capacidade de produzir a TD (FORMIGA & MATTOS-GUARALDI, 1993; MACAMBIRA, FORMIGA & FORMIGA, 1994; EFSTRATIOU *et al.*, 1998; BURKOVSKI, 2014; WHO, 2016).

As metodologias convencionais de identificação bacteriana baseiam-se nas características fenotípicas, tais como, reações metabólicas, características das colônias e morfologia celular em esfregaços corados pelo método de Gram (KONEMAN *et al.*, 2008). Os sistemas comerciais compactos de identificação foram desenvolvidos a partir da combinação de provas convencionais e enzimáticas com substratos cromogênicos, por exemplo, API<sup>®</sup>Coryne (APIbioMerieux, Inc., La Balme les Grottes, France), Enterotube<sup>™</sup>, MiniTek<sup>™</sup>, VITEK<sup>®</sup>, entre outros, proporcionando resultados rápidos, permitindo a identificação dos principais grupos bacterianos de importância clínica. Os perfis metabólicos obtidos são comparados com perfis estabelecidos em banco de dados (BIOMERIEUX, 2000, 2003; 2016a e 2016b).

Diversos estudos demonstraram que há uma correspondência de pelo menos 95% entre as identificações realizadas pelos sistemas compactos e os sistemas convencionais em vários grupos de microrganismos de origem clínica, encontrando ampla aceitação nos laboratórios de diagnóstico, por ser um método confiável e de identificação rápida (EIGNER *et al.*, 2005; STAVRACAKIS-PEIXOTO *et al.*, 2011; De ZOYSA *et al.*, 2016; SUWANTARAT *et al.*, 2016). No entanto, devido a limitações dos bancos de dados referenciais desses sistemas, a identificação equivocada de bactérias corineformes e nocardioformes ainda ocorre com frequência elevada, ou mesmo, de forma limitada ao gênero ou grupo de espécies, exigindo a realização de ensaios complementares (COYLE & LIPSKY, 1990; FUNKE *et al.*, 1997; CAMELLO *et al.*, 2003; MISTRY *et al.*, 2006). Diante da crescente importância desses grupos nas infecções humanas, o uso de metodologias moleculares para a conclusão da

identificação vem se tornando frequente (GROVE, DER-HAROUTIAN & RATCLIFF, 1999; TANG, 2000; LAU *et al.*, 2002; WOO *et al.*, 2003; GIL-SANDE *et al.*, 2006).

O estudo dos genes 16S rRNA e *rpoB* alcançou bons resultados na identificação das diferentes espécies do gênero *Corynebacterium*. Contudo, estas análises utilizam técnicas que requerem, além de uma etapa de amplificação de DNA, uma etapa de sequenciamento dos produtos de amplificação, limitando seu uso na rotina laboratorial justamente por demandarem infraestrutura e pessoal altamente treinado e qualificado, além de serem de alto custo (PASCUAL *et al.*, 1995; RUIJMY *et al.*, 1995; VANEECHOUTTE *et al.*, 1995; TANG, 2000; KHAMIS, RAOULT & SCOLA, 2004; HIRATA JR *et al.*, 2011).

Técnicas visando a identificação de componentes da parede celular (aminoácidos, açúcares, ácidos graxos e ácidos micólicos) têm sido particularmente úteis na taxonomia do gênero *Corynebacterium*, embora apresentem as mesmas limitações já destacadas (COYLE & LIPSKY, 1990; FUNKE *et al.*, 1997; VAN DEN VELDE *et al.*, 2006).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido empregada na detecção do gene da TD aliada a genes selecionados para a identificação de diferentes espécies de corinebactérias (PCR multiplex) e vêm oferecendo vantagens sobre as técnicas de fenotipagem, já que produz resultados rápidos, simples, altamente sensíveis e de fácil interpretação. Embora o resultado positivo seja indicativo de toxicidade, este não permite a exclusão do diagnóstico fenotípico. Portanto, o resultado negativo do teste de PCR pode ser muito útil para a rápida exclusão da toxicidade (PALLEN, 1991; HAUSER *et al.*, 1993; PALLEN *et al.*, 1994; MIKHAILOVICH *et al.*, 1995; NAKAO & POPOVIC, 1997; EFSTRATIOU *et al.*, 1998; PIMENTA *et al.*, 2008).

Outra técnica que, apesar do alto custo e da necessidade de pessoal altamente especializado, vem crescendo na rotina laboratorial é a técnica de MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption/ionization – Time Of Flight), que tem como princípio a espectrometria de massa. Baseia-se na análise e detecção de um grande espectro de peptídeos ionizados, detectados por um espectômetro de massas e então comparadas com uma base de dados, originando uma pontuação correspondente a um perfil específico, indicando a maior ou menor probabilidade de o microorganismo analisado pertencer a uma determinada espécie. Essa técnica consegue identificar até mesmo subespécies estreitamente relacionadas e, por isso, tem sido cada vez mais usada por laboratórios de rotina de microbiologia clínica. Existem estudos limitados que avaliam a utilização de MALDI-TOF na identificação de espécies do gênero *Corynebacterium*. (SANTOS *et al.*, 2013).



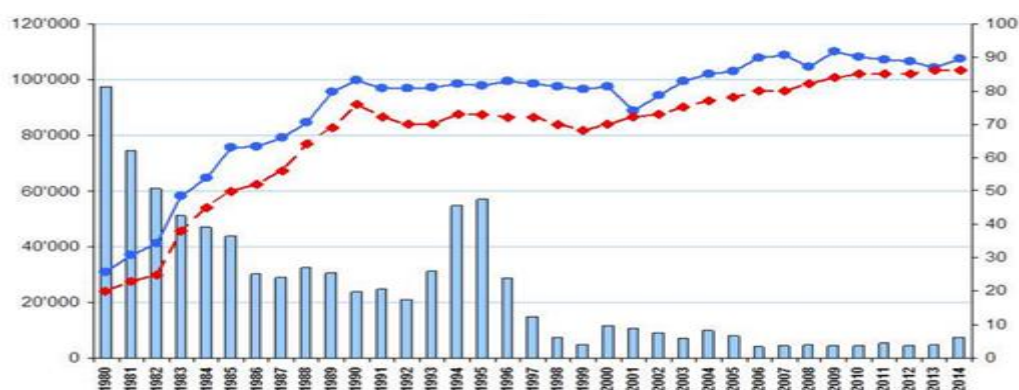
## Aspectos epidemiológicos das infecções por *C. diphtheriae*

*C. diphtheriae* apresenta grande relevância clínica em todo mundo. Há pelo menos 2500 anos, epidemias de difteria têm sido relatadas e, apesar de ser uma doença antiga e ter sido estudada desde o século XIX, ainda hoje são reportados casos em todo mundo. Nos Estados Unidos, a difteria chegou a ser considerada uma das principais causas de morbidade e mortalidade entre crianças e jovens menores de quinze anos no início do século XX. Na década de vinte, ocorriam neste país de 100.000 a 200.000 casos, dos quais os casos fatais compreendiam cerca de 13.000 a 15.000 (ESKOLA, LUMIO & VUOPIO-VARKILA, 1998; MATTOS-GUARALDI & FORMIGA, 1991; MATTOS-GUARALDI *et al.*, 2003; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC, 2014; OMS, 2014).

A prevenção da difteria só foi alcançada quando a imunidade pôde ser induzida pela aplicação de uma mistura da TD com sua antitoxina e, posteriormente, pela vacina contendo o toxóide diftérico (ESKOLA, LUMIO & VUOPIO-VARKILA, 1998).

A criação do programa mundial de imunização utilizando o toxóide diftérico, nos anos cinquenta, reduziu consideravelmente o número de casos de difteria, assim como, o número de mortes em muitos países industrializados (DITTMANN *et al.*, 2000; GALAZKA, 2000). No entanto, apenas com o Programa de Imunização Expandido da Organização Mundial de Saúde (OMS), na década de setenta, houve uma melhoria na imunização dos países em desenvolvimento (Figura 1) (MATTOS-GUARALDI *et al.*, 2003; WHO, 2016).

Figura 1 - Cobertura da vacina tríplice bacteriana e número de casos de difteria reportados no período de 1980-2014



Legenda: Número de casos reportado de difteria no respectivo ano (Colunas). Cobertura vacinal oficial (Tracejado azul). Estimativa da UNICEF (Fundo das Nações Unidas para a Infância) e OMS (WHO, 2016) (Tracejado vermelho).

Atualmente, o esquema de vacinação preconizado pelo Ministério da Saúde inclui cinco doses da vacina tríplice difteria-tétano-pertussis (DTP3), respectivamente aos 2, 4, 6, 15 e 48 meses de vida, com um reforço aos quatorze anos de vida com a vacina dupla difteria-tétano (DT) (BRASIL, 2016).

Segundo o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), mesmo durante a Era da Vacinação, casos de difteria continuaram a ocorrer em diversas regiões dos EUA, destacando-se o surto ocorrido no estado de Washington, na década de setenta, quando foram descritos 196 casos, incluindo casos cutâneos. Entre 1980 e 2004, mais 157 casos ocorreram, sendo a maioria destes em pessoas adultas, dentre as quais 38% tinham entre 20 e 40 anos e 44% apresentavam mais de 40 anos (CDC, 2014; OMS, 2014).

Após três décadas de controle da doença, uma grande epidemia ressurgiu no Leste Europeu, com cerca de 157.000 casos e 5.000 óbitos, relatados na década de noventa. Aproximadamente 70% dos casos ocorreram em indivíduos adultos e em adolescentes maiores de quinze anos de idade. Adultos entre 40 e 49 anos corresponderam a quase metade do número de casos fatais em alguns países. A epidemia mostrou a susceptibilidade dos adultos à difteria e um número elevado de casos graves ou fatais também foi observado em indivíduos vacinados, indicando a necessidade de reforço vacinal em adultos. A implantação do programa de imunização ocasionou uma redução significativa no número de casos nos anos seguintes (GALAZKA & ROBERTSON, 1995; REY *et al.*, 1996; DITTMAN *et al.*, 2000; GALAZKA, 2000).

A alta susceptibilidade dos adultos à difteria, o decréscimo da cobertura vacinal nos adolescentes, a desorganização dos serviços de saúde associada ao aumento de viagens internacionais e a grande migração de pessoas, assim como as condições higiênico-sanitárias precárias, podem ajudar a explicar o ressurgimento da difteria na antiga União Soviética (URSS). Além de, possivelmente, favorecerem a disseminação e provável seleção de cepas epidêmicas na comunidade (GALAZKA & ROBERTSON, 1995; DITTMAN *et al.*, 2000). Outros países também vivenciaram surtos epidêmicos nesta época, dentre os quais China, Tadjiquistão, Argélia, Índia e Equador (POPOVIC *et al.*, 1996; OMS, 2014).

Apesar do progresso na imunização e da diminuição considerável no número de casos, a difteria ainda representa um grave problema de Saúde Pública em todo o mundo. Além dos surtos epidêmicos, a difteria permanece endêmica em muitas regiões (WHO, 2016), particularmente em países em desenvolvimento e industrializados como a Índia, os países africanos, do Oriente Médio, da América Central e Latina, incluindo o Brasil (Figura 2) (CDC, 2010).

Figura 2 - Regiões endêmicas para difteria



Legenda: Em vermelho estão destacadas as regiões onde a difteria é endêmica. AMÉRICAS: Bolívia, Brasil, Colômbia, República Dominicana, Equador, Haiti e Paraguai. EUROPA: Albânia, Rússia e países que formavam a antiga URSS. ORIENTE MÉDIO: Iran, Iraque, Arábia Saudita, Síria, Turquia e Iêmen. ÁSIA/SUL DO PACÍFICO: Afeganistão, Bangladesh, Butão, Birmânia, Camboja, China, Índia, Indonésia, Laos, Malásia, Mongólia, Nepal, Paquistão, Papua, Nova Guiné, Filipinas, Tailândia e Vietnã. ÁFRICA: Argélia, Angola, Egito, Nigéria, Sudão e regiões subsaarianas. (CDC, 2010).

Recentemente, casos isolados de difteria estão sendo reportados em países desenvolvidos, e a resistência de um segmento da população a se submeter à vacinação pode representar um importante fator para a disseminação da doença. Em 2015, na Espanha, foram relatados dois casos, um envolvendo uma criança de oito anos de idade, não vacinada e, o segundo, envolvendo um adulto vacinado. Ambos foram submetidos a antibioticoterapia e soro antidiftérico (SAD) e responderam bem ao tratamento. Na Bélgica, também em 2015, uma criança de três anos, não vacinada, veio a óbito um dia após a administração do SAD, provavelmente devido a demora em sua obtenção, uma vez que não haviam reservas de soros disponíveis no país (Centro Europeu de Controle e Prevenção de Doenças - ECDC, 2016).

No último ano, a Europa vem sofrendo um grande fluxo migratório, com centenas de milhares de pessoas fugindo de seus países devido a guerras, fome, intolerância religiosa, violação dos direitos humanos, entre outras causas. Os refugiados são potenciais carreadores de doenças infecciosas contraídas em seus países de origem. Em 2015, nove casos de difteria cutânea foram relatados na Dinamarca, Suécia e Alemanha, entre os refugiados. Em todos os casos, tratava-se de infecção de pele causada por *C. diphtheriae* toxigênico. O Centro Europeu de Controle e Prevenção de Doenças (ECDC) anunciou que não há indicação de que estes casos representem um surto significativo de difteria entre os refugiados na Europa. A

difteria cutânea é endêmica em países tropicais, mas é rara na Europa. A vacinação é atualmente, a única proteção eficaz contra a difteria toxigênica, e indivíduos não vacinados apresentam risco potencial de desenvolver infecções fatais com *C. diphtheriae* toxigênico (ECDC, 2016).

No Brasil, a difteria incide de forma endêmica, com o aparecimento de surtos epidêmicos esporádicos, principalmente na região Nordeste, relacionadas com clones epidêmicos dos biotipos *gravis*, *mitis* e *intermedius* (HARDY, DITTIMAN E SUTTER, 1996; GALAZKA, 2000). Apenas no ano de 2010, vinte e sete casos foram confirmados no Estado do Maranhão. A maior parte ocorreu em crianças parcialmente (n=16) ou completamente imunizadas (n=10). Três pacientes evoluíram para óbito, dois deles com esquema completo de vacinação. Neste surto, os isolados de *C. diphtheriae* foram identificados como pertencentes ao biotipo *intermedius*, frequentemente encontrado no continente asiático, porém diferente do perfil de outras regiões do país, onde predomina o biotipo *mitis* (SANTOS *et al.*, 2014). É importante ressaltar que, em virtude do vasto território e das condições econômicas desfavoráveis apresentadas pela maioria das regiões brasileiras, existe uma flagrante subnotificação de casos de difteria, o mesmo ocorre para obtenção de dados confiáveis a respeito da cobertura vacinal (PIMENTA *et al.*, 2006).

Apesar de os motivos da reemergência de difteria ainda não serem completamente compreendidos, existem algumas hipóteses sendo consideradas. Dentre elas, a introdução de linhagens toxigênicas de um novo biotipo, baixos níveis de imunização em crianças, condições socioeconômicas precárias, aumento dos movimentos populacionais responsáveis pela importação de *C. diphtheriae* de locais endêmicos, promiscuidade e falta de higiene pessoal. Além disso, o conhecimento de que a imunidade contra a TD vai decaindo com o passar dos anos, tornando os indivíduos adultos vacinados susceptíveis ao contágio, levou a política de imunização contra difteria no Brasil a incluir, em seu esquema de vacinação, doses de reforço para adolescentes e adultos. Segundo Simonsen e colaboradores (1986), a concentração de anticorpos protetores em indivíduos adultos decresce 10% ao ano. Entretanto, estudos recentes mostram que apenas uma pequena porcentagem dos adultos na cidade do Rio de Janeiro possui títulos satisfatórios de anticorpos contra difteria (MATTOS-GUARALDI *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2014; DAMASCO *et al.*, 2005; PIMENTA *et al.*, 2006).

Apesar da imunização em massa prevenir a difteria clássica, causando uma menor circulação dos clones toxigênicos do *C. diphtheriae*, esta não parece afetar a colonização das superfícies cutâneo-mucosas pelo microrganismo. A proteção mediada pela vacinação é direcionada à forma toxigênica da doença, fazendo do portador cutâneo um reservatório

silencioso e, contribuindo, assim, para a perpetuação da difteria endêmica e epidêmica. Com a introdução de uma cepa produtora de TD na população susceptível, cepas não produtoras de TD, presentes na microbiota, podem sofrer conversão lisogênica e passar a produzir a toxina (FORMIGA & MATTOS-GUARALDI, 1993; GALASKA, 2000; MATTOS-GUARALDI *et al.*, 2003; BURKOVSKI, 2013b).

Cada vez mais casos de infecções sistêmicas causadas por *C. diphtheriae* não produtor de TD vêm sendo descritos na literatura, demonstrando que a imunização contra a toxina não impede a evolução do processo infeccioso (PULITI *et al.*, 2006; ROMNEY *et al.*, 2006; ZASADA, BACZEWSKA-REJ & WARDAK, 2010; BURKOVSKI, 2013b).

### **Infecções invasivas por *C. diphtheriae***

A capacidade de produzir doenças invasivas, independente da capacidade de produção de TD, indica que há novos mecanismos influenciando as infecções por *C. diphtheriae*, podendo este ser responsável tanto por lesões cutâneas e faringites quanto por doenças invasivas, como endocardite (BELKO *et al.*, 2000; HIRATA JR *et al.*, 2008; MENON, SENTHIKUMAR & PACHAIAPPAN, 2010; EDWARDS, HUNT & HOSKISSON, 2011), bacteremia (MATTOS-GUARALDI, FORMIGA, MARQUES, 2001), artrite séptica (FARAJ, FRENCH & MCAUSLAN, 2003; DIAS *et al.*, 2011; STAVRACAKIS-PEIXOTO *et al.*, 2014), osteomielite (POILANE *et al.*, 1995; STAVRACAKIS-PEIXOTO *et al.*, 2011) e abscessos esplênicos (ALEXANDER, 1984), despertando a atenção da comunidade científica e dos profissionais de saúde.

Em 2005, na Polônia, foi relatado o primeiro caso de bacteremia e endocardite causada por cepa de *C. diphtheriae* biotipo *gravis* não produtora de TD (ZASADA *et al.*, 2005). Ao contrário da difteria clássica, a endocardite infecciosa causada por *C. diphtheriae* afeta pessoas vacinadas e não vacinadas e é, principalmente, induzida por isolados não produtores de TD (BELKO *et al.*, 2000).

No Rio de Janeiro, cinco cepas pertencentes ao biotipo fermentador de sacarose, já foram isoladas de casos de endocardite (HC01 a HC05). Em 2010, também no Rio de Janeiro, foi isolada uma cepa de caso de endocardite em prótese aórtica (HC06) em um paciente de vinte e sete anos. Este isolado não produtor de TD, foi classificado como *C. diphtheriae*

biotipo *gravis* pelo sistema API<sup>®</sup>Coryne (HIRATA *et al.*, 2008; GOMES, 2012; STAVRACAKIS-PEIXOTO, 2016).

Diversos casos de artrite relacionados com o *C. diphtheriae* foram descritos (GURAN *et al.*, 1979; BARAKETT *et al.*, 1993; DAMADE *et al.*, 1993; FARAJ, FRENCH & MCAUSLAN, 2003; ORDÓÑEZ- PALAU *et al.*, 2007), porém apenas três casos de osteomielite foram encontrados na literatura disponível (POILANE *et al.*, 1995; MORREY *et al.*, 1997; STAVRACAKIS-PEIXOTO *et al.*, 2011). Poilane e colaboradores (1995) reportaram um caso de osteomielite provocado por uma cepa de *C. diphtheriae*, fracamente produtora de TD, que foi isolada de aspirado ósseo oriundo de artrite séptica no quadril de criança imunocompetente.

Em 2015, no Rio de Janeiro, foi reportado o primeiro caso de osteomielite relacionada ao *C. diphtheriae* em paciente com câncer. Ocorreu em uma mulher de quarenta e um anos de idade, admitida para o Instituto Nacional do Câncer (INCA) como portadora de tumor de narina direita e com história vacinal de difteria desconhecida (STAVRACAKIS-PEIXOTO *et al.*, 2011).

Quadros de infecção sistêmica com ausência de lesões mediadas pela TD já foram descritos tanto em pacientes imunizados quanto não imunizados, indicando que as propriedades invasivas e toxigênicas são independentes (MATTOS-GUARALDI, FORMIGA & PEREIRA, 2000).

Apesar da característica destrutiva das infecções invasivas, os mecanismos de patogenicidade que favorecem a capacidade invasiva de certas cepas de *C. diphtheriae* permanecem incompreendidos (BELKO *et al.*, 2000). A capacidade de sobreviver dentro de células epiteliais cultivadas foi observada para cepas de *C. diphtheriae* isoladas da faringe e sangue. O isolado do sangue mostrou maiores percentuais de associação e de viabilidade intracelular em comparação com aqueles referentes ao isolado de faringe (HIRATA JR *et al.*, 2002).

A ocorrência de clones bacterianos não produtores de TD, responsáveis por infecções invasivas, enfatiza o envolvimento de outros fatores de virulência além da TD na patogenicidade do *C. diphtheriae*. Contudo, apesar de a difteria ser uma doença bastante conhecida mundialmente, somente nas últimas duas décadas foram realizados estudos que investigam outros fatores de virulência em *C. diphtheriae*, independente de produção de TD (MATTOS-GUARALDI, FORMIGA & PEREIRA, 2000; DAMASCO, HIRATA & MATTOS-GUARALDI, 2011; BURKOVSKI, 2013b).

## Fatores de virulência de *C. diphtheriae*

### Toxina Diftérica

Em função dos novos aspectos do seu processo infeccioso, *C. diphtheriae* atualmente é considerado um patógeno reemergente trazendo a necessidade de pesquisas sobre os mecanismos de patogenicidade tanto de cepas toxigênicas quanto atoxigênicas (REACHER *et al.*, 2000).

O principal e mais conhecido fator de virulência de *C. diphtheriae*, independente do biotipo, é a TD. Outras espécies de corinebactérias, potencialmente patogênicas para humanos, *Corynebacterium ulcerans* e *Corynebacterium pseudotuberculosis*, também podem apresentar a capacidade de produção de TD, quando infectadas por um bacteriófago temperado específico (corinefago do tipo  $\beta$  portador do gene *tox*). O gene *tox* tem a sua transcrição regulada negativamente por íons ferro e por uma proteína repressora, conhecida como *Diphtheria Toxin Repressor* (DtxR) e seu produto consiste de uma potente exotoxina proteica denominada toxina diftérica (De ZOYSA, EFSTRATIOU E HAWKEY, 2005; WAGNER *et al.*, 2010).

Os principais sintomas da difteria clássica estão relacionados com a ação de TD e sua dose letal é de 50-100 ng/kg de peso corporal, sendo imunologicamente idêntica entre as diferentes cepas (MEKADA, OKADA & UCHIDA, 1988; PAPPENHEIMER, 1993; MAN *et al.*, 2010). Além disso, tem forte tropismo pelo miocárdio, sistema nervoso central, rins e glândulas supra-renais (MACAMBIRA, FORMIGA E FORMIGA, 1994).

A estrutura da TD baseia-se numa cadeia polipeptídica de 535 aminoácidos com massa molecular de 58.350 Da. A molécula contém quatro resíduos de cisteína e duas pontes dissulfídicas internas. A redução das pontes dissulfídicas gera o fragmento A (TD-A) livre, que corresponde ao domínio catalítico, e o fragmento B (TD-B), o qual corresponde aos domínios de translocação e ligação ao receptor da TD (PAPPENHEIMER, 1977; SMITH *et al.*, 1980; COLLIER, 2001). A interação da TD com o precursor do fator de crescimento epidérmico ligante de heparina (HB-EGF) favorece a endocitose com participação de clatrin. Posteriormente, complexos toxina-receptor sofrem degradação lisossomal e as moléculas que escapam da ação enzimática tornam-se as principais responsáveis pelo processo de intoxicação celular (MORRIS *et al.*, 1985; LEMICHEZ *et al.*, 1997). Condições

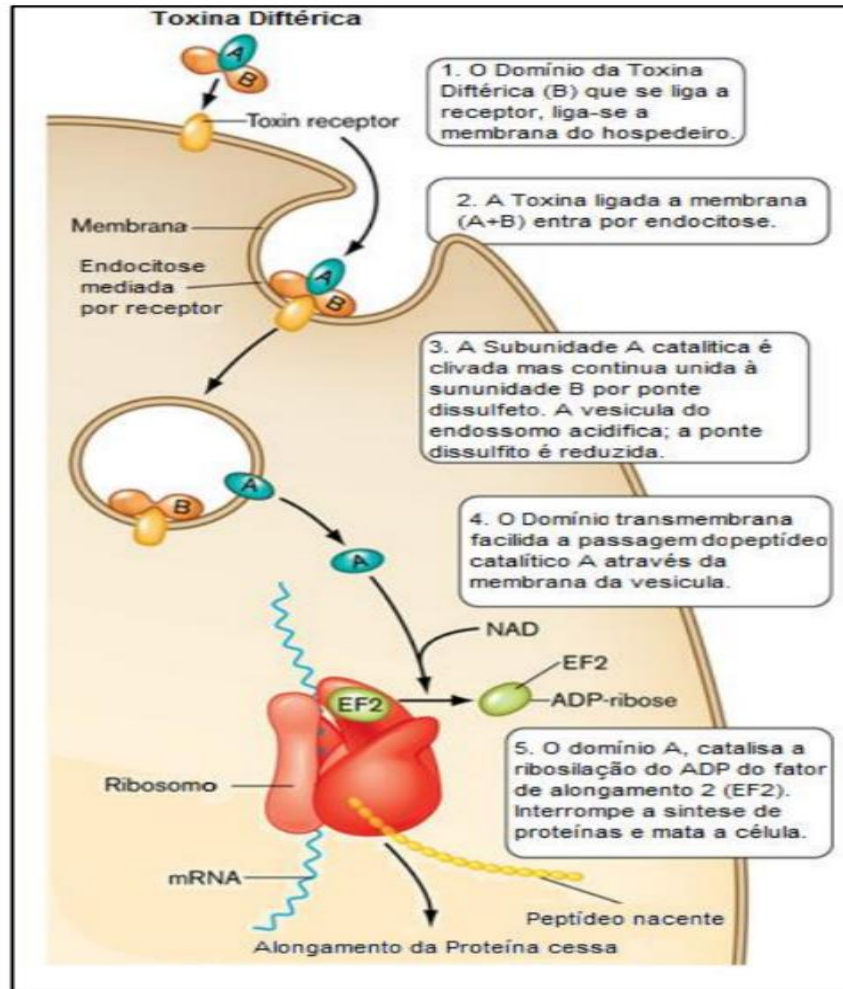
acídicas (DRAPER & SIMON, 1980), que induzem mudança conformacional da TD, permitem sua inserção na membrana e formação de canal, pelo qual ocorre a translocação do fragmento A (MOSKAUG, SANDVIG & OLSNES, 1988).

A TD é uma pró-enzima que deve ser processada para sua atividade latente de NAD:EF-2 ADPR transferase, que atua cataliticamente transferindo um monômero de ribose adenosina difosfatado (ADPR) da nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) para o fator de alongamento na transcrição de proteínas (EF-2), inibindo, assim, o alongamento de cadeias polipeptídicas durante a síntese proteica em células eucarióticas. Uma única molécula de TD-A, introduzida diretamente no citoplasma, é suficiente para matar a célula eucariótica (Figura 3) (YAMAIZUMI *et al.*, 1978; HOLMES, 2000; VAROL *et al.*, 2014).

A proteína DtxR atua sobre a região promotora do gene da TD como uma proteína ligante de DNA (*DNA-binding protein*) dependente de ferro. Está envolvida também na regulação da produção de sideróforos (corinebactina), heme-oxigenases e de outros cinco promotores dependentes de ferro (IRP1 ao IRP5), sendo assim, um regulador global do metabolismo do *C. diphtheriae* (SCHMITT, TALLEY & HOLMES, 1977; SCHMITT, 1997; SPATAFORA *et al.*, 2001; ANDO *et al.*, 2003; DeZOYSA, EFISTRATIOU & HAWKEY, 2005; ROLERSON *et al.*, 2006).



Figura 3 – Mecanismo de ação da toxina diftérica em célula hospedeira



Legenda: (A) subunidade A da TD, (B) subunidade B da TD, RNA mensageiro (mRNA), fator de alongamento na transcrição de proteínas (EF-2), nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD), adenosina difosfato ribose (ADP) (PEROTTONI, 2015).

## Outros Fatores de Virulência

Em 2003, o genoma de *C. diphtheriae* biotipo *gravis* foi sequenciado, evidenciando que a transferência lateral de fatores de patogenicidade vai além da toxina em si, e inclui sistemas de captação de ferro, adesinas, proteínas fimbriais, dentre outros fatores (CERDEÑO-TÁRRAGA *et al.*, 2003). Foram identificadas novas proteínas responsáveis pela

sintomatologia da doença, codificadas por genes localizados dentro das ilhas de patogenicidade (PAIs) - regiões cromossômicas adquiridas pelo organismo por transferência horizontal de genes que codificam fatores de virulência de bactérias patogênicas (D'AFONSECA *et al.*, 2011; TROST *et al.*, 2012, ANTUNES *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2015a).

A colonização e a patogenicidade de *C. diphtheriae* estão intimamente relacionadas com a capacidade de aderir às mucosas e à pele do hospedeiro, sendo estes os sítios de colonização preferenciais. A aderência de *C. diphtheriae* apresenta natureza multifatorial, podendo estar relacionada à prevalência de cepas epidêmicas, invasoras e/ou alguns biotipos sobre os demais. As propriedades adesivas auxiliam o microrganismo não apenas a aderir às células epiteliais da mucosa respiratória do hospedeiro, mas também a penetrar e ganhar acesso a tecidos mais profundos, tornando-se cepas invasoras, independente da produção de TD. Assim, a capacidade de sobrevivência do *C. diphtheriae*, no interior de células epiteliais, poderia ajudar a explicar a permanência da infecção no trato respiratório, apesar da terapia antimicrobiana e administração de anti - TD. Porém, a despeito do poder destrutivo das infecções invasivas, vários aspectos dos mecanismos de patogenicidade de cepas invasivas de *C. diphtheriae* permanecem desconhecidos (BELKO *et al.*, 2000; MATTOS-GUARALDI, FORMIGA e PEREIRA, 2000; HIRATA JR *et al.*, 2002).

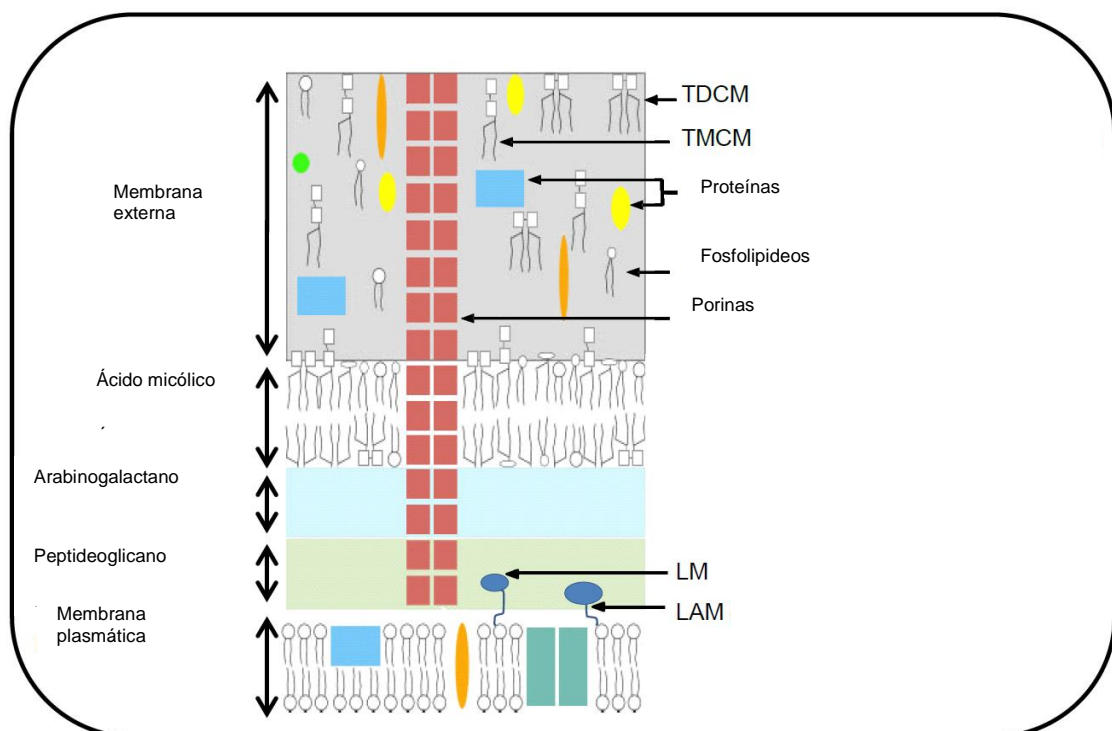
Hemaglutininas, propriedades hidrofóbicas de superfície, atividade de neuraminidases, exposição ao ácido siálico e a resíduos de açúcares foram descritos e caracterizados como fatores de patogenicidade relacionados à aderência de *C. diphtheriae* às células hospedeiras e às superfícies inertes sólidas (MATTOS-GUARALDI, FORMIGA e PEREIRA, 2000). A expressão de diferentes adesinas pelo bacilo diftérico é sugerida, devido à diversidade da atividade hemaglutinante e das variações nos percentuais de aderência e internalização celular entre as cepas. Essas diferenças parecem influenciar na patogenicidade e no sítio de infecção das cepas (HIRATA JR *et al.*, 2008).

Burkovski (2013a) revisou a estrutura da membrana celular de corinebactérias e o papel dos seus componentes na interação patógeno-hospedeiro. O teor de proteína da camada superior do envelope foi parcialmente caracterizado, revelando um importante papel na comunicação intercelular e na interação com o patógeno, podendo ser utilizado como alvo para a terapia ou para a indústria biotecnológica (BURKOVSKI, 2013a). A monocamada de resíduos micolil está covalentemente ligada ao arabinogalactano da parede celular e inclui diversos lipídios importantes, como, por exemplo, monocorinomicolato trealose (TMCM) e dicorinomicolato trealose (TDCM), que provavelmente estão dispostos de modo a formar uma

bicamada (Figura 4) (De SOUSA-D'AURIA *et al.*, 2003). Ambos, TMCM e TDCM, ativam o receptor de lectina do tipo C de macrófagos humanos e o receptor *Mincle* de camundongos atuando na formação de granulomas - pequenos nódulos formados para isolar microrganismos insolúveis que o organismo foi incapaz de expulsar -, de forma semelhante ao *Mycobacterium tuberculosis*, e é um importante fator de virulência desta espécie (LANG, 2013; van der PEET *et al.*, 2015).

Além de estruturas lipídicas com funções semelhantes ao do *M. tuberculosis*, também foi encontrada uma micoliltransferase em corinebactérias (*cmyt*) com a função de ligar fibronectina. Somente 11 anos depois, com o acesso ao banco de dados contendo o genoma dos microrganismos, de Sousa-D'auria e colaboradores (2003) identificaram quatro genes codificadores de *cmyt* em *C.diphtheriae* (JOLIFF *et al.*, 1992; De SOUSA-D'AURIA *et al.*, 2003; GAHOI *et al.*, 2013).

Figura 4 - Representação esquemática da estrutura do envelope celular de corinebactérias



Legenda: A arquitetura da parede celular contém a membrana plasmática (com componentes únicos como lipomanana (LM) e lipoarabinomanana (LAM), um complexo de polímero com peptidoglicano, arabinogalactano e ácidos micólicos. Na camada externa encontram-se: dicorinomicolato de trealose (TDCM) e monocorinomicolato de trealose (TMCM), e proteínas importantes para a virulência bacteriana também podem estar presentes (para detalhes, ver texto). Fonte: Modificado de Puech e colaboradores (2001).

Além disso, a superfície do *C. diphtheriae* apresenta glicolipídeos denominados CdiLAM, que atuam de forma semelhante à lipomanana (LM) e à lipoarabinomanana (LAM) encontrados em micobactérias. A LAM é a principal lipoglicana presente no envelope das micobactérias e suas atividades biológicas e características estruturais têm sido amplamente estudadas (GEIJTENBEEK *et al.*, 2003). São capazes de interagir com receptores específicos da superfície celular, induzindo a fagocitose e a sinalização celular (STROHMEIER & FENTON, 1999). Por isso, atuam como importantes fatores de virulência, favorecendo processos de aderência, internalização, sobrevivência e persistência do microrganismo no interior da célula hospedeira, principalmente em macrófagos e células dendríticas, principais células alvo do *M. tuberculosis* (TAILLEUX *et al.*, 2003). Em corinebactérias, a CdiLAM parece estar relacionada aos processos de adesão bacteriana às células epiteliais de carcinoma de laringe humana (HEp-2), uma vez que, quando purificados, CdiLAM e anticorpos IgG anti-CdiLAM foram capazes de inibir a adesão de *C. diphtheriae*. Portanto, o CdiLAM pode influenciar o curso de uma infecção, como uma adesina de células respiratórias humanas, tornando-se um potencial fator de virulência de *C. diphtheriae*. No entanto, mais estudos são necessários para apoiar a idéia de que CdiLAM também é capaz de modular a resposta imune (FUKUDA *et al.*, 2013; MOREIRA, 2005; MOREIRA, MATTOS-GUARALDI E ANDRADE, 2008).

Já foi demonstrado que *C. diphtheriae* expõe ácidos siálicos na sua superfície. O resíduo de açúcar pode ser metabolizado ou usado pela bactéria para revestir a sua superfície, decorando-a, e servindo para aderir a superfícies abióticas, atuando como fator de virulência (SCHAUER & KAMERLING, 1997). Estudos evidenciam que a expressão e produção de ácido siálico, no bacilo diftérico, são limitados pela quantidade de ferro no ambiente (MOREIRA *et al.*, 2003). Até o momento, não se identificou genes envolvidos na exposição do ácido siálico na superfície bacteriana (MATTOS-GUARALDI, FORMIGA E ANDRADE, 1999; MATTOS-GUARALDI, FORMIGA e PEREIRA, 2000; KIM *et al.*, 2010). A aquisição de ácido siálico, pelo bacilo diftérico, pode ocorrer através de uma reação de *trans*-sialidase, onde o ácido siálico é transferido de um doador (sialoconjugado), presente no meio de cultura, para o aceptor na superfície da bactéria. Recentemente, uma provável exosialidase hipotética, designada NanH (DIP0543), foi identificada em *C. diphtheriae* NCTC 13129 e revelou uma atividade *trans*-sialidase, mas sua função na exposição do ácido siálico não foi esclarecida. Mais estudos envolvendo a NanH e a relação com o ácido siálico precisam ser realizados (BURKOVSKI, 2014; KIM *et al.*, 2014).

Pili e fímbrias são estruturas proteicas que desempenham um importante papel na fixação das bactérias às superfícies abióticas e bióticas. Yanagawa e Honda, em 1976, relacionaram, pela primeira vez, essa estrutura bacteriana com a aderência a eritrócitos (hemaglutinação) em uma cepa de *Corynebacterium renale*. Desde então, tem sido a estrutura de superfície celular bacteriana mais bem estudada em *C. diphtheriae* (YANAGAWA & HONDA, 1976; REARDON-ROBINSON & TON-THAT, 2014). Para a sua formação, requer uma enzima com ação transpeptidase e sítio de reconhecimento para sortases, que conduz e fixa as pilinas na superfície dos microrganismos patogênicos (FISCHETTI *et al.*, 1990; SCHNEEWIND, MODEL E FISCHETTI 1992; SCHNEEWIND, FOWLER E FAULL, 1995). Análises moleculares mostraram que os genes codificadores das pilinas e das sortases estão localizados em ilhas de patogenicidade, estando parcial ou completamente ausentes em algumas cepas (WU & FIVES-TAYLOR, 2001; IWAKI *et al.*, 2010; TROST *et al.*, 2012). Notavelmente, a formação de pili e a taxa de adesão não são processos estritamente acoplados, pois cepas que não expressam pili na sua superfície também foram capazes de se ligar às células do hospedeiro (OTT *et al.*, 2010b), indicando, assim, que, além do pili, há influência de outros fatores de virulência na adesão às células do hospedeiro.

A cepa *C. diphtheriae* NCTC 13129, produtora de TD, é capaz de produzir três pilinas *Spa* distintas (*Sortase-mediated pilus assembly*). Cada pilina é constituída de três subunidades menores: SpaA (SpaABC), SpaD (SpaDEF) e SpaH (SpaGHI). A sortase classe C é responsável pela montagem do eixo da estrutura da pilina (TON-THAT & SCHNEEWIND, 2004) enquanto, a sortase de classe F é responsável por ligar a pilina já montada de forma covalente à superfície da célula (DRAMSI, TRIEU-CUOT E BIERNE, 2005). Mandlik e colaboradores (2007) mostraram que apenas a SpaA contribui efetivamente no processo de adesão às células da faringe humana (Detroit 562), enquanto SpaD e SpaH são pilinas importantes no processo de adesão às células epiteliais HEp-2 e às células pulmonares humanas (A549).

Além de fímbrias e pili, cepas de *C. diphtheriae* expressam proteínas de superfície celular, de natureza não-fimbrial, capazes de reconhecer e se ligar a receptores específicos de células eucarióticas. A proteína 67-72p (DIP0733), codificada pelo gene *DIP0733*, está envolvida na aderência a eritrócitos, assim como na invasão e indução de apoptose em células HEp-2, independente do gene *tox*, uma vez que cepas não produtoras de TD foram capazes de sobreviver durante um tempo considerável no interior desta células (COLOMBO *et al.*, 2001; HIRATA JR *et al.*, 2004; SABBADINI *et al.*, 2012; ANTUNES *et al.*, 2015).

As culturas de células de mamíferos representam um modelo controlado e simples para a investigação das interações entre parasitas e hospedeiros (FALKOW, 1994). Nos últimos anos, diversas células eucarióticas primárias ou de linhagem contínua têm sido utilizadas como modelos de estudo de mecanismos de interação com bactérias e/ou seus produtos (CHAMBERS *et al.*, 1997; BROWN *et al.*, 2010; STAVRAKAKIS-PEIXOTO *et al.*, 2014; ANTUNES *et al.*, 2015; HACKER *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2015a; HACKER *et al.*, 2016).

Particularmente para *C. diphtheriae*, pesquisadores investigaram propriedades adesivas frente a células de mucosa bucal de seres humanos (DEACOCK, STEWARD E CARNE, 1983), hemácias de origens diversas (KOSTYUKOVA E PEREVERZEV, 1985; MATTOS-GUARALDI E FORMIGA, 1986; MATTOS-GUARALDI E FORMIGA, 1991; MATTOS-GUARALDI, FORMIGA E ANDRADE, 1999), células epiteliais respiratórias diversas como HEp-2 e HeLa (HIRATA JR *et al.*, 2002; HIRATA JR *et al.*, 2004; SABBADINI *et al.*, 2012; ANTUNES *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2015a), células endoteliais (STAVRAKAKIS-PEIXOTO *et al.*, 2014); células da faringe humana Detroit 562 (BERTUCCINI, BALDASSARRI & von HUNOLSTEIN, 2004; OTT *et al.*, 2010b), macrófagos humanos THP-1 e U937, como também, macrófagos de origem murina RAW 264.7 (SANTOS *et al.*, 2010; ANTUNES *et al.*, 2015; HACKER *et al.*, 2016), além de características hidrofóbicas (MATTOS-GUARALDI E FORMIGA, 1991; SANTOS, 2009). Ensaio de aderência a monocamadas de células epiteliais, derivadas de carcinoma de laringe (HEp-2) e de carcinoma cervical (HeLa), são considerados um dos mais úteis modelos para o estudo de interações bacterianas com a superfície dos hospedeiros (JOUVE *et al.*, 1997; HIRATA JR *et al.*, 2002; HIRATA JR *et al.*, 2004; ANTUNES *et al.*, 2015; HACKER *et al.*, 2015).

Hirata e colaboradores (2008) demonstraram que não apenas a adesão mas também a invasão de células HEp-2, por diversas cepas de *C. diphtheriae*, ocorrem em diferentes níveis e que rearranjos do citoesqueleto são necessários para a entrada de bactérias. Além disso, a polimerização da actina, juntamente com um evento de sinalização fosfotirosina, parece ser um mecanismo relevante, durante o processo de invasão de *C. diphtheriae*, ao interagir com células HEp-2 (HIRATA JR *et al.*, 2008), células fagocíticas (SANTOS *et al.*, 2010) e células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) (STAVRAKAKIS-PEIXOTO *et al.*, 2014). Adicionalmente, Bertuccini, Baldassarri e von Hunolstein (2004), descrevem a dinâmica de internalização e relatam a permanência de cepas não produtoras de TD, oriundas de pacientes com faringite, após 48 horas de incubação em cultivos de células de laringe e faringe (HEp-2

e Detroit D562). A invasão de células epiteliais representa um passo importante no processo infeccioso, sendo vantajoso para *C. diphtheriae* manter-se no ambiente intracelular. Os mecanismos para invadir as células epiteliais, para sobrevivência intracelular e para a subsequente indução de apoptose dessas células, podem explicar a persistência e disseminação de *C. diphtheriae* (SANTOS *et al.*, 2010; SABBADINI *et al.*, 2012; ANTUNES *et al.*, 2015).

Muitos patógenos colonizam tecidos humanos ou contornam mecanismos imunológicos explorando proteínas da matriz e/ou plasma (SIMPSON- LOUREDO *et al.*, 2013). A natureza multifatorial da adesividade do *C. diphtheriae* deve ser considerada, uma vez que as cepas, independente da expressão do gene *tox*, podem aderir em intensidades variadas a diferentes substratos (MATTOS-GUARALDI, FORMIGA & PEREIRA, 2000; ANTUNES *et al.*, 2015; HACKER *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2015a).

Diversos estudos já comprovaram a utilização de modelos experimentais *in vitro* para a avaliação da citotoxicidade. A utilização de culturas celulares contínuas de fibroblastos de rins do macaco verde da África (*Cercopithecus aethiops*), comumente conhecidas como células Vero, já foram padronizadas para diversos microrganismos, inclusive para cepas de *C. diphtheriae* e *C. ulcerans*, e tem sido uma alternativa, cada vez mais empregada, aos testes de virulência *in vivo*. As alterações produzidas no tapete celular, decorrentes da produção de toxina, podem ser observadas a fresco, em microscópio invertido, e através de ensaios de viabilidade celular, sendo a formação de cristais de formazana, a partir da redução do brometo de dimetil-tiazol-difenil tetrazólio (MTT), o ensaio mais utilizado. Em função da atividade da enzima mitocondrial desidrogenase, a formazana precipitada nas células metabolicamente ativas adquire coloração azulada e pode se medida, por absorbância, em comprimento de onda correspondente a 570 nm (MACHADO, 1989; EFSTRATIOU *et al.*, 1998; PIMENTA *et al.*, 2008).

Além da proteína DIP0733, a proteína DIP1281, anotada como invasina, tem sido estudada no processo de interação com células de linhagem epitelial de faringe. Entretanto, os resultados obtidos até o momento sugerem que ela esteja envolvida com a organização geral da superfície do bacilo diftérico. Através de análise proteômica e por microscopia de fluorescência e força atômica, pode-se observar que o gene codificador da proteína DIP1281 possui características pleiotrópicas, em vez de apenas apresentar um fator de virulência específico (OTT *et al.*, 2010a).

Além da DIP1281, outros membros da família NlpC/P60 foram descritos em *C. diphtheriae* (DIP0640, DIP1621 e DIP1622) com funções similares (AMON *et al.*, 2008). A

partir de uma biblioteca de inserção do transposon Tn5, contendo 2800 mutantes de *C. diphtheriae*, foi feito um rastreamento a fim de procurar cepas que apresentassem redução significativa na taxa de aderência a células HEP-2. Esse estudo levou à identificação da proteína DIP1621, caracterizada como uma hidrolase associada ao processo de invasão celular. No entanto, os autores concluíram que a função exata de DIP1621 ainda precisa ser estabelecida (KOLODKINA *et al.*, 2011). No geral, as proteínas NlpC/P60 parecem desempenhar um papel importante na organização da superfície celular e replicação de corinebactérias, além de serem determinantes na interação parasita-hospedeiro (BURKOVSKI, 2013b).

Algumas bactérias Gram-positivas são naturalmente resistentes ao telurito, proporcionando vantagens seletivas no ambiente natural. Devido a essa propriedade, desde início do século XX, o telurito de potássio ( $K_2TeO_3$ ) é utilizado em meios seletivos para isolar patógenos, tais como *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Shigella* sp. e *Corynebacterium diphtheriae*, e distinguir seus subtipos (TAYLOR, 1999; SANTOS *et al.*, 2015a). Além da resistência, os genes  $Te^R$  também têm sido relacionados com a adesão em células epiteliais (PEI *et al.*, 2013; YIN *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2015a) e com a susceptibilidade às espécies reativas de oxigênio (ROS) (FRANKS *et al.*, 2014). Isto indica um novo papel dos genes  $Te^R$  na patogênese de uma variedade de bactérias.



## 1 JUSTIFICATIVA

Infecções causadas pelo *C. diphtheriae* continuam sendo observadas em diferentes países, inclusive naqueles que apresentaram melhoria das condições socioeconômicas, e que a vacinação tem sido realizada de maneira satisfatória. Os fatores relativos à origem e virulência das cepas epidêmicas, que contribuíram para a perpetuação da endemicidade de *C. diphtheriae*, e que ocasionaram as principais epidemias de difteria nestas últimas décadas, são pontos que não foram completamente esclarecidos (De ZOYSA *et al.*, 1995; GALASKA, 2000).

Cepas de *C. diphtheriae* não produtoras de TD podem produzir manifestações atípicas da doença complicando o curso clínico e terapêutico. Doenças invasivas causadas por estas cepas em indivíduos imunocompetentes vêm sendo descritas em frequência crescente (POILANE *et al.*, 1995; MATTOS-GUARALDI *et al.*, 2001; HIRATA *et al.*, 2008; DIAS *et al.*, 2011) e adicionam novos aspectos aos processos infecciosos causados pelo bacilo diftérico, caracterizando-o como um patógeno emergente. Tais aspectos alertam para outros fatores de virulência, passíveis de serem expressos por cepas de *C. diphtheriae*, além da TD (MATTOS-GUARALDI, FORMIGA & PEREIRA, 2000). Deste modo, estudos que justifiquem a patogenicidade de cepas de *C. diphtheriae*, não produtoras de TD, e potencialmente invasoras, permanecem necessários.

Trabalhos, cada vez mais recentes, vêm ressaltando que a expressão de fatores de virulência, nas mais variadas espécies bacterianas, está relacionada com a aquisição de genes por transferência horizontal, geralmente localizados nas ilhas de patogenicidade (HACKER *et al.*, 1990; BAASKE, *et al.*, 2016; AHN *et al.*, 2016; ALI *et al.*, 2016; LECLERCQ *et al.*, 2016). No entanto, estudos de sequenciamento genômico indicaram que *C. diphtheriae* difere de outras espécies, filogeneticamente semelhantes, por apresentar maior percentual de genoma dispensável, relacionado aos mecanismos de virulência, sendo uma estratégia comum para estabelecer diferenças nas interações hospedeiro-patógeno (CERDEÑO-TARRAGA *et al.*, 2003; SOARES *et al.*, 2012; TROST *et al.*, 2012).

A importância das hemolisinas na virulência de diferentes espécies bacterianas, incluindo *Escherichia coli*, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus mutans* e *Streptococcus pyogenes*, tem sido cada vez mais enfatizada na literatura. Os genes que codificam as hemolisinas são passíveis de transferência, conforme já apontado por trabalhos envolvendo, principalmente, espécies dos gêneros *Escherichia*, *Staphylococcus*,

*Pseudomonas*, *Vibrio*, *Streptococcus*, entre outros (SMITH & HALLS, 1967; HACKER *et al.*, 1990; BAASKE, *et al.*, 2016; AHN *et al.*, 2016; ALI *et al.*, 2016; LECLERCQ *et al.*, 2016).

Em *C. diphtheriae* tem sido descrito que algumas cepas podem ser produtoras de hemolisinas, uma vez que são classificadas quanto à atividade hemolítica (TRABULSI & ALTERTHUM, 2015). Contudo, pouco se sabe a respeito da influência da produção desta citotoxina na virulência desta espécie. Diante do exposto, justifica-se investigar este fator de virulência e seus efeitos na patogenicidade de cepas de *C. diphtheriae*.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo geral investigar a presença do gene codificador de hemolisina em *C. diphtheriae* e sua influência sobre a atividade hemolítica, e sobre outros atributos de virulência bem como propriedades adesivas e produção de biofilme.

### 2.2 Objetivos específicos

- Investigar a presença de sequências gênicas, similares àquela codificante da hemolisina de *C. diphtheriae* biotipo *gravis* cepa NCTC 13129 (DIP1180), em cepas de *C. diphtheriae*, produtoras e não produtoras de TD, pela análise *in silico* do genoma bacteriano;
- Prever a estrutura tridimensional da proteína DIP1180 de *C. diphtheriae*;
- Confirmar a presença do gene que codifica a hemolisina DIP1180 em cepas de *C. diphtheriae*, de origens diversas, utilizando PCR convencional;
- Construir cepas mutantes, por recombinação homóloga, utilizando a cepa selvagem *C. diphtheriae* NCTC 13129, com a finalidade de avaliar a influência do gene codificador da hemolisina DIP1180 sobre outros atributos de virulência;
- Avaliar quantitativamente a aderência e a viabilidade intracelular das cepas selecionadas em células de epitélio respiratório humano, através de ensaios de interação bacteriana;
- Testar a atividade lítica das cepas selecionadas sobre hemácias de carneiro por métodos qualitativos e quantitativos, e as alterações induzidas por condições de aerobiose e anaerobiose sobre esta atividade;
- Avaliar qualitativa e quantitativamente a formação de biofilme em superfícies abióticas (vidro e poliestireno), e as alterações induzidas pela limitação de ferro sobre esta propriedade;

- Verificar a influência do gene *dip1180*, sobre atributos de virulência comparando cepas selvagens e mutantes em condições ambientais diversas;
- Avaliar a influência da hemolisina DIP1180 sobre a capacidade de *C. diphtheriae* causar infecção hematogênica e óssea *in vivo*, utilizando camundongos.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Origem das cepas bacterianas e condições de cultivo

Os microrganismos utilizados neste trabalho fazem parte da Bacterioteca do Laboratório de Difteria e Corinebactérias de Importância Clínica (LDCIC) da Faculdade de Ciências Médicas (FCM), Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) e foram mantidos em meio líquido, *Trypticase Soy Broth* (TSB, *Difco Laboratories*, Detroit, MI – USA) ou sólido *Trypticase Soy Agar* (TSA, *Difco*), incubados a 37 °C por até 48 h para a realização dos experimentos.

*Escherichia coli One Shot*<sup>®</sup> TOP10 *Electrocomp*<sup>™</sup> (Life Technologies, Reino Unido) foi cultivada em meio Luria Bertani (LB, *Difco Laboratories*) a 37°C. Quando apropriado, adicionou-se canamicina (Sigma-Aldrich Co., EUA), na concentração final de 50 µg/mL, ao meio de cultivo bacteriano para seleção de cepas *E. coli* transformadas. Para a cepa mutante *C. diphtheriae* LDCIC-A1 adicionou-se o antimicrobiano na concentração final de 25 µg /mL.

O armazenamento das cepas selvagens foi realizado em meio TSB acrescido de 20% de glicerol à temperatura de -20 °C, e para o armazenamento de cepas mutantes, foi acrescentado ao meio canamicina na concentração final de 25 µg/mL (FORMIGA, 1985).

As cepas utilizadas neste trabalho foram, periodicamente, investigadas quanto à pureza e às características fenotípicas pelo sistema miniaturizado API<sup>®</sup>Coryne (MATTOS-GUARALDI & FORMIGA *et al.*, 1998a).

O potencial de produção da TD foi confirmado por reações de PCR multiplex, utilizando pares de iniciadores para o gene espécie-específico *dtxR* (iniciadores DtxR 1F e DtxR 1R, amplicom de 258 pb) e para os fragmentos A (iniciadores Dipht 2F e Dipht 4R, amplicom 719pb) e B (iniciadores Dipht 6F e Dipht 7R, amplicom 534 pb) do gene *tox* relativas aos domínios A e B da TD (NAKAO *et al.*, 1996; PIMENTA *et al.*, 2008).

Foram analisadas cepas de *C. diphtheriae*, produtoras e não produtoras de TD, pertencentes a diversos biotipos e origens, relacionados a casos de difteria clássica e infecções invasivas (Tabela 1).

Tabela 01: Origem e características biológicas das cepas de *C. diphtheriae*

Cepa /País	Biotipo	Sítio de Isolamento	Quadro Clínico	Presença do gene <i>tox</i>
ATCC 27010/EUA	<i>mitis</i>	TRS	assintomático	-
ATCC27012/EUA	<i>mitis</i>	TRS	assintomático	+
NCTC 13129/UK	<i>gravis</i>	TRS	Difteria	+
LDCIC-A1*	<i>gravis</i>	TRS	Difteria	+
PW8/EUA	<i>mitis</i>	TRS	Cepa vacinal	+
VA01/BR	<i>gravis</i>	TRS	Difteria	+
TR241/BR	<i>mitis</i>	TRS	Difteria	+
CDC E-8392/EUA	<i>mitis</i>	TRS	Difteria	+
402/BR	<i>belfante</i>	Pulmão	Pneumonia/Neoplasia	-
INCA 814/BR	<i>mitis</i>	Pulmão	Pneumonia/Neoplasia	-
HC01/BR	<i>mitis</i>	Sangue	Endocardite	-
HC02/BR	<i>mitis</i>	Sangue	Endocardite	-
HC03/BR	<i>mitis</i>	Sangue	Endocardite	-
HC04/BR	<i>gravis</i>	Sangue	Endocardite	-
HC06//BR	<i>gravis</i>	Sangue	Endocardite	-
MA 136/Brasil	<i>intermedius</i>	TRS	Difteria	-

Legenda: \*LDCIC-A1 – cepa mutante contendo o inserto para o plasmídeo truncado para o gene *dip1180* construída neste trabalho. TRS, Trato Respiratório Superior - Detecção utilizando os iniciadores Dipht 2F e Dipht 4R para o fragmento A e Dipht 6F e Dipht 7R para o fragmento B da TD conforme descrito por NAKAO *et al.*, 1996 e modificado por PIMENTA *et al.*, 2008.

### 3.2 Análise da estrutura e domínios conservados de DIP1180 através de ferramentas de bioinformática

A sequência de aminoácidos da proteína DIP1180, primeiramente descrita em *C. diphtheriae* biotipo *gravis* cepa NCTC 13129, foi usada como base para a pesquisa, por alinhamento de sequências no banco de dados não-redundantes, disponibilizado gratuitamente no portal do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (ALTSCHUL *et al.*, 1997; CERDEÑO-TARRAGA *et al.*, 2003; D'AFONSECA *et al.*, 2011).

Na busca por sequências consensuais para o desenvolvimento de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) para a detecção de genes codificadores de hemolisina, foram utilizados os aplicativos *online* de bioinformática *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) e *Constraint-Based Multiple Alignment Tool* (COBALT), que realizam análises de similaridade e alinhamento de sequências de DNA ou aminoácidos, disponibilizados gratuitamente no portal do NCBI. Os iniciadores foram desenhados através do aplicativo *online* Primer-Blast e as reações de amplificação *in silico* realizadas no site <http://insilico.ehu.es/PCR/>.

A busca por domínios conservados foi realizada utilizando os bancos de dados Pfam (FINN *et al.*, 2016) e NCBI (MARCHLER-BAUER *et al.*, 2015). Os domínios transmembrana foram previstos através do programa TMHMM versão 2.0 (KROGH *et al.*, 2001). O servidor *Phyre<sup>2</sup>* foi usado para prever a estrutura tridimensional dos domínios conservados da proteína DIP1180 e da proteína homóloga encontrada nas demais cepas de *C. diphtheriae* utilizadas neste estudo (KELLEY e STEMBERG, 2009). Dois parâmetros foram considerados para selecionar o melhor modelo: confiança e cobertura. Em casos de confiança > 90 %, considerou-se que a proteína foi modelada com alta precisão.

A estrutura 3D da proteína DIP1180 foi modelada usando o servidor *online* I-TASSER. As sequências de aminoácidos da DIP1180 foram submetidas em formato FASTA. Os resultados geraram cinco principais modelos, em que, o modelo com a maior pontuação de confiança (*c-score*) foi selecionado como melhor representante para este estudo (KELLEY *et al.*, 2015).

### 3.3 Caracterização molecular pela reação em cadeia da polimerase (PCR)

#### 3.3.1 Extração do DNA genômico

Para obtenção das suspensões de DNA foram selecionadas 3 a 5 colônias isoladas, obtidas a partir do crescimento dos cultivos bacterianos de 24h conforme descrito no item 3.1. Em seguida, as colônias foram transferidas para microtubos, previamente identificados, contendo 500  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q estéril. As suspensões bacterianas resultantes foram submetidas à fervura por 10 minutos, em banho-maria, imediatamente transferidas para banho de gelo, onde foram resfriadas por 15 min e, posteriormente centrifugadas a 14.000 rpm por 20 segundos. Alíquotas de 2  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foram utilizadas nas reações de amplificação. O restante do sobrenadante foi aliquotado para um novo microtubo e estocado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (PIMENTA *et al.*, 2008).

#### 3.3.2 PCR para detecção do gene *dip1180*

A mistura reacional para os ensaios de PCR foi elaborada em cabine asséptica (DNA Workstation Modelo LWS-01 - Loccus, São Paulo, Brasil) em microtubos estéreis, livres de ácidos nucleicos, sendo composta de água Milli-Q estéril, tampão PCR 10X,  $\text{MgCl}_2$  [50 mM], *primer* iniciador [100 mM], dNTP [10 mM] e enzima Taq DNA polimerase [12,5 U/ $\mu\text{L}$ ] (Invitrogen, Life Technologies, Brasil) para um volume de 23 $\mu\text{L}$ . Em seguida foram adicionados 2  $\mu\text{L}$  do DNA molde extraído de cada cepa bacteriana (item 3.3.1). O controle da reação de PCR foi obtido substituindo-se a quantidade de DNA molde por água Milli-Q estéril (NAKAO *et al.*, 1996; adaptado de PIMENTA *et al.*, 2008).

A amplificação genômica foi realizada em termociclador Applied Biosystems<sup>TM</sup> Proflex PCR System<sup>TM</sup> (Life Technologies, EUA) com etapa inicial de desnaturação a  $94^{\circ}\text{C}$  por 2 min, seguida de 35 ciclos compostos pelas etapas de: desnaturação a  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 60 segundos, anelamento a  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 1 min e extensão a  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 1 minuto e 30 segundos. A etapa final de extensão foi realizada a  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos (NAKAO *et al.*, 1996; adaptado de PIMENTA *et al.*, 2008).



### 3.3.3 Análise dos produtos de amplificação por eletroforese em gel de agarose

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

## 3.4 **Clonagem da sequência codificadora do gene alvo *dip1180* no sistema TOPO®**

### 3.4.1 Preparo de cepas de *C. diphtheriae* eletrocompetentes

Para a obtenção de cepas de *C. diphtheriae* eletrocompetentes, 10 mL de uma cultura de *C. diphtheriae* crescida *overnight* até DO600 de 0,4 a 0,6, foram inoculadas em 200 mL de meio BHI contendo 2% de glicina (p/v) e 15% de sacarose (p/v). Após a incubação em gelo durante 15 minutos, as cepas foram centrifugadas (4.500xg, 15 min, 4°C). As bactérias foram lavadas duas vezes com 200 mL de glicerol a frio a 15% (v/v) (5.000 x g; 5 min; 4°C) e uma lavagem posterior com 100 mL de glicerol a frio a 15% (v/v) nas mesmas condições. O sedimento celular foi ressuspensão em 1 mL de glicerol frio a 15% (v/v). Alíquotas de 100 µl das cepas competentes foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e depois armazenadas a -80°C (DORELLA *et al.*, 2006; ANTUNES *et al.*, 2015).

### 3.4.2 Transformação de cepa de *Escherichia coli*

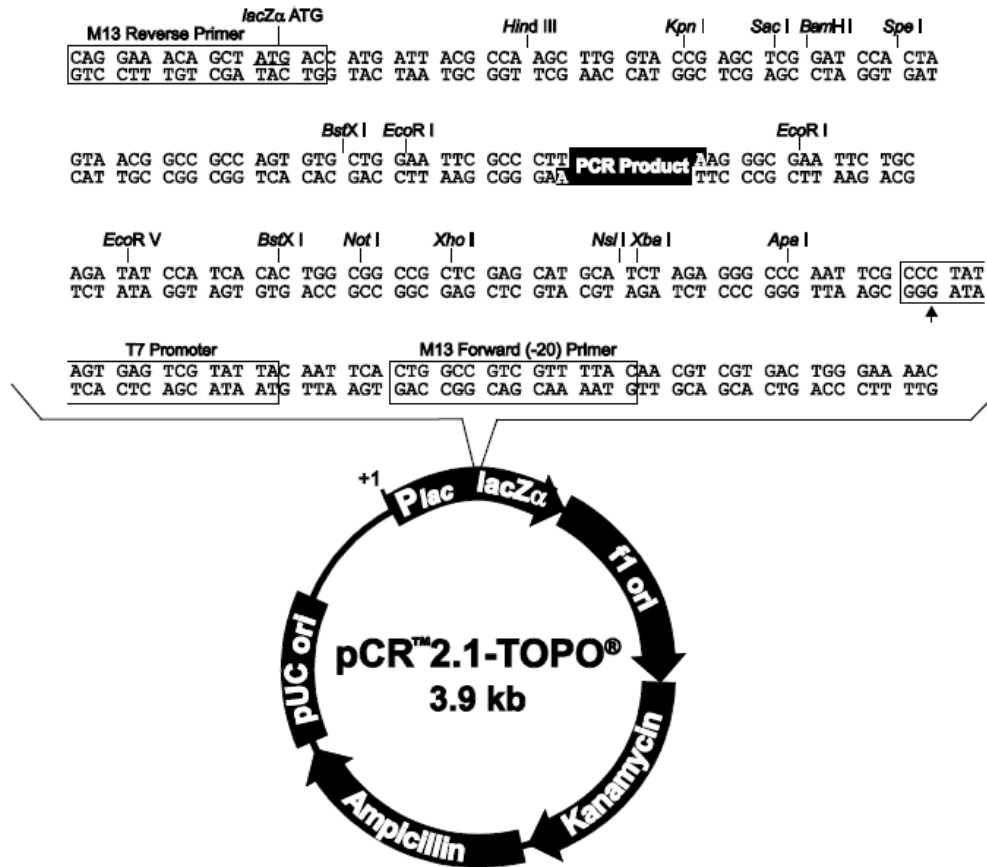
A transformação consiste em inserir o vetor pCR™ 2.1 TOPO®, contendo o inserto *dip1180*, vetor TOPO::*DIP1180*, em cepas de *E. coli One Shot® TOP10* (Invitrogen), através de estímulo elétrico. Para transformar *E. coli* com DNA plasmídico, 100 µl de cepas quimicamente competentes foram descongeladas em gelo e misturadas a 1 µl de DNA plasmídico. A mistura foi incubada em gelo durante pelo menos 30 minutos, depois submetida a um choque térmico durante 60 segundos a 42°C e, novamente, incubada em gelo durante 5 minutos. Para a regeneração das cepas e a expressão dos genes de resistência codificados no plasmídeo, foram adicionados 400 µl de meio LB seguida de 1 hora de incubação, sob agitação vigorosa, a 37°C. As cepas foram centrifugadas, o sobrenadante descartado e as bactérias ressuspensas no líquido restante (DORELLA *et al.*, 2006; ANTUNES *et al.*, 2015).

Para selecionar os transformantes, alíquotas de 10 µL, 50 µL, 100 µL e 200 µL foram semeadas em meio sólido LB suplementado com 50 ng/mL do antibiótico canamicina (Sigma), e incubado por 18 h a 37 °C, sob agitação. Após esse período, as placas semeadas foram avaliadas quanto à presença de colônias de *E. coli* resistentes ao antimicrobiano. Para o controle negativo, 100 µL de células eletrocompetentes foram transformadas sem adição de DNA (DORELLA *et al.*, 2006; ANTUNES *et al.*, 2015).

### 3.4.3 Eletroporação de *C. diphtheriae*

Após a transformação, foi realizada a ligação do vetor pCR™ 2.1 TOPO (*TOPO® TA Cloning® Kit* - Invitrogen) em *C. diphtherie* (Figura 5). As alíquotas eletrocompetentes foram descongeladas em gelo e cuidadosamente misturadas com 0,5 µg a 2 µg de DNA plasmidial. Após 20 minutos de incubação em gelo, a suspensão foi transferida para uma cubeta de eletroporação pré-resfriada. A eletroporação foi realizada utilizando um *Gene Pulse II* (Bio-Rad, Munique) sob as seguintes condições: 2500 volts, capacitância de 25 µF e resistência de 200 Ω. As bactérias eletroporadas foram transferidas para 1 mL de caldo HI e incubadas durante 2 h a 37°C e 125 rpm. Posteriormente, as cepas foram centrifugadas e plaqueadas em meio seletivo. As placas foram incubadas até três dias a 37°C (DORELLA *et al.*, 2006; ANTUNES *et al.*, 2015).

Figura 5 - Representação esquemática do vetor pCR 2.1 TOPO®



Legenda: Representação esquemática do vetor pCR 2.1 TOPO®, destacando-se o sítio de clonagem múltipla. Os sítios das respectivas enzimas de restrição estão indicados no local da clivagem. Fonte: Manual do TOPO® TA PCR Cloning Kit – Invitrogen, 2014.

#### 3.4.4 Extração do DNA plasmidial da linhagem de *E. coli* recombinante

Cada colônia selecionada foi inoculada em tubo contendo 5 mL de caldo LB suplementado com 100 µg/mL de canamicina. Após incubação, *overnight* a 37°C, com agitação, uma alíquota de 1 mL de cada cultura foi acrescida de glicerol 80% e estocada em freezer -80 °C. O restante do inóculo foi centrifugado para posterior extração plasmidial com o kit de extração comercial *PureLink® Quick Plasmid Miniprep Kit* (Invitrogen). A qualidade do DNA obtido foi estimada por eletroforese em gel de agarose 1% e por *Nanovue* (GE Helthcare, Reino Unido) (DORELLA *et al.*, 2006; ANTUNES *et al.*, 2015).

#### 3.4.5 Extração do DNA genômico de *C. diphtheriae*

Para obtenção das suspensões de DNA, uma colônia isolada, obtida a partir do crescimento dos cultivos bacterianos, conforme descrito no item 3.1, foi transferida para microtubo contendo 180µL de tampão ALT, fornecido pelo kit de extração de DNA (*QIAamp DNA Mini Kit* – Qiagen), e homogeneizado vigorosamente. A suspensão resultante foi centrifugada a 7500 rpm por 5 min, e o precipitado foi ressuspendido em 180 µL de solução enzimática (10mM Tris HCl pH 8 + 1Mm EDTA) e 5 µL de lisozima (100 mg/mL) e incubado a 37 °C por 30 min. Após a incubação, 20 µL de proteinase K (600 mAU/mL) e 200 µL de tampão ATL foram adicionados, e a reação foi homogenizada e incubada, primeiramente a 56 °C por 30 min e, em seguida, por 15 min a 95 °C. Imediatamente após a incubação, a mistura foi centrifugada e acrescida de 200 µL de etanol absoluto (ProQuimios) seguida de homogeneização por 15 segundos e centrifugada para remoção de material aderido a tampa do microtubo. A mistura formada foi cuidadosamente transferida para a coluna de extração (*QIamp Mini Spin Columns* - Qiagen). O conjunto foi centrifugado a 8000 rpm durante 1 min e a coluna transferida para outro tubo coletor. O tubo inicial, contendo o filtrado, foi descartado. Este procedimento foi repetido por duas vezes. Ao novo tubo coletor foram acrescidos 200 µL de água destilada estéril e o material foi incubado a temperatura ambiente por 1 min e, posteriormente, centrifugado a 8000 rpm durante 1 min. Este procedimento foi repetido duas vezes. Nova centrifugação foi realizada a 8000 rpm durante 1 min. A coluna foi desprezada e o microtubo, utilizado para recolher o filtrado, foi armazenado a -20 °C (DORELLA *et al.*, 2006; ANTUNES *et al.*, 2015).

#### 3.4.6 PCR e extração do DNA amplificado

Após a extração do DNA genômico, conforme descrito no item 3.4.5, foi realizada a reação em cadeia da polimerase e amplificação genômica conforme descrito no item 3.3.2. Os produtos amplificados foram submetidos à separação eletroforética, conforme descrito no item 3.3.3, porém utilizando gel de agarose a 1,2% contendo corante *Syber Safe*, obtido comercialmente, que permite a recuperação da banda desejada (E-Gel®CloneWell Agarose Gels with SYBR Safe™ - Invitrogen, Reino Unido), no equipamento E-Gel® iBase™ Power System (Invitrogen, Reino Unido). Quando os produtos amplificados chegaram aos poços inferiores, a corrida foi parada, o material coletado e transferido para um microtubo estéril. A qualidade do DNA obtido foi estimada durante a eletroforese em gel de agarose e em

equipamento *Nanovue* (GE Healthcare, Reino Unido), e as cepas foram armazenadas em freezer a -20°C até a sua utilização.

#### 3.4.7 Confirmação da presença do inserto *dip1180* no vetor TOPO® em *C. diphtheriae*

Com o intuito de confirmar o evento de clonagem do fragmento interno do gene *dip1180* ao vetor TOPO® foram realizadas reações de PCR e digestão enzimática do DNA plasmidial com a endonuclease de restrição EcoRI (Invitrogen™). Esta última consistiu em submeter a mistura reacional, - composta por 10 µL do DNA purificado pelo *kit Miniprep* (Invitrogen), 2 µL de tampão *Fast Digest 10X* (Invitrogen), 2 µL da enzima EcoRI (Invitrogen), 6 µL de água Milli-Q -, após incubação a 37 °C por 1 h, à técnica de PCR e eletroforese em gel de agarose a 1,2% para visualização da amplificação, conforme descrito no item 3.4.2 (DORELLA *et al.*, 2006; ANTUNES *et al.*, 2015).

### 3.5 **Ensaio de interação celular**

Em todos os experimentos de interação bactéria-célula foi utilizada a linhagem celular HEP-2 (ATCC CCL23), originada de carcinoma de laringe.

#### 3.5.1 Manutenção e preparo de células HEP-2

As células HEP-2 foram cultivadas em garrafas plásticas contendo meio de cultivo Mínimo Essencial MEM (*Eagle's Minimal Essential Medium* - Invitrogen, Brasil) suplementado com gentamicina (50 µg/mL), anfotericina B (2,5 µg/mL), L-glutamina (0,5% p/v) e 5 % de soro fetal bovino (SFB) (Invitrogen, Brasil). As mesmas foram mantidas a 37 °C em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>. As expansões foram feitas a cada 2-3 dias com a dissolução das monocamadas com solução de tripsina-EDTA (0,1 % e 0,01 %) em Salina Tampão Dulbecco com 1 % de vermelho de fenol. Para confecção das placas, os tapetes celulares foram submetidos a tripsinização conforme descrito anteriormente. Nova suspensão celular (2,5 x 10<sup>6</sup> células/mL) foi preparada em meio MEM e 100 µL desta solução foram dispensados em

cada poço da placa de cultura de tecidos, com 96 poços e, após 48 h, as mesmas foram utilizadas nos ensaios (adaptado de HIRATA JR *et al.*, 2002).

### 3.5.2 Ensaio quantitativo de interação bacteriana

As bactérias foram cultivadas em TSB, por um período de 48 h, e então lavadas duas vezes com tampão fosfato-salino (PBS - 0,01 M; pH 7,4), ressuspensas em MEM a uma concentração de  $10^6$  unidades formadoras de colônia (UFC/mL) e utilizadas para infectar as monocamadas celulares contendo  $2,5 \times 10^5$  células HEp-2 por poço (MOI de 100). O tempo de incubação eleito para este ensaio foi de 3 h, momento em que parte das monocamadas de células HEp-2 infectadas foram lavadas duas vezes e lisadas com 0,1% de Triton X-100 em PBS, diluídas e plaqueadas em TSA. Para a determinação de bactérias viáveis no meio intracelular, outra parte das monocamadas foi lavada seis vezes com PBS e tratadas com 150 µg/mL de gentamicina por 1 h. Findo este tempo, as monocamadas foram lisadas com 0,5 mL de 0,1% de Triton X-100 em PBS, diluídas e plaqueadas em TSA (adaptado de HIRATA JR *et al.*, 2002).

### 3.6 **Avaliação da atividade hemolítica em cepas de *C. diphtheriae***

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

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

ou beta-hemólise, respectivamente. As que não apresentaram formação de halo foram consideradas negativas para atividade hemolítica (MATTOS-GUARALDI & FORMIGA, 1992).

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

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

### 3.7 Avaliação da formação de biofilme em superfície de poliestireno

A capacidade das cepas de *C. diphtheriae* aderir ao substrato de poliestireno, formando biofilme, foi avaliada pelo método semiquantitativo, modificado, como descrito por Gomes e colaboradores (2009), utilizando como controle negativo um tubo contendo meio TSB estéril.

Suspensões bacterianas em meio TSB foram incubadas por 48 h a 37 °C sem agitação e em condições de aerobiose. A partir dessas, foram elaboradas novas suspensões com densidade óptica  $DO_{570nm}$  de 0.2 e alíquotas de 200 µl foram transferidas para microplaca de poliestireno (Kasvi, Brasil), com 96 poços de fundo reto, e incubadas por 24 h a 37 °C. Em seguida, os poços foram lavados, três vezes, com tampão fosfato salino (PBS; 0,01M; pH 7,2) estéril e acrescidos de 200 µL de metanol PA (ProQuimios, Brasil) por 15 min, para fixação das bactérias aderidas aos poços. Após esse período, o metanol foi retirado e a placa deixada em temperatura ambiente (TA) para secagem.

Para revelação do biofilme formado, alíquotas de 200 µL de corante cristal violeta a 2% foram adicionadas a cada poço e, após 5 min, a placa foi lavada exaustivamente com água destilada estéril. Para eluição do corante, 160 µL de ácido acético a 33% foram adicionados aos poços.

A absorbância (DO) de cada poço foi aferida, em comprimento de onda de 570 nm, em leitor de placas (BioRad, modelo 550). O cut-off foi determinado pela densidade óptica do

controle negativo ( $DO_c$ ). Quanto aos valores de absorvância obtidos, as cepas foram classificadas como: (i) não-aderentes quando  $0 < DO \leq DO_c$ , (ii) fracamente aderentes quando  $DO_c < DO \leq 2xDO_c$ , (iii) moderadamente aderentes quando  $2xDO_c < DO \leq 4xDO_c$  e (iv) fortemente aderentes quando  $DO > 4xDO_c$  (STEPANOVIC, 2000; GOMES *et al.*, 2009; GOMES *et al.*, 2013).

### 3.8 Avaliação da formação de biofilme em superfície de vidro

A capacidade das cepas de *C. diphtheriae* aderir ao vidro foi avaliada através da deposição de uma camada bacteriana na face interna e/ou na interface meio-ar de um tubo de ensaio estéril, novo e com dimensões aproximadas de 13 x 100 mm (MATTOS-GUARALDI & FORMIGA, 1991). Para essa finalidade, suspensões bacterianas foram inoculadas em 4 mL de caldo TSB até a  $DO_{570nm}$  de 0.2, e incubadas por 48 h a 37 °C, sem agitação e em condições de aerobiose. Após este período, o meio de cultura foi removido e, cuidadosamente, foram adicionados mais 4 mL de TSB aos tubos, voltando a incubá-los por 48 h à 37 °C. A troca do meio de cultivo foi realizada três vezes. O biofilme formado foi corado com cristal violeta a 2% por 5 min e os tubos foram lavados, sucessivamente, com água destilada. As cepas de *C. diphtheriae* 241 e CDC E-8392 foram utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente, conforme descrito por Gomes e colaboradores (2009). Após secagem, foram avaliados quanto a formação do biofilme seguindo os padrões de aderência bacteriana em vidro definidos por Mattos-Guaraldi e Formiga (1991): I – presença de microrganismos aderidos nas laterais dos tubos de vidro, incluindo a formação de anel na interface entre o meio de cultura e o ar; II – presença de microrganismos aderidos somente nas laterais dos tubos de vidro; III – presença de microrganismos formando anel na interface do meio de cultura com o ar; IV – ausência de microrganismos aderidos (MATTOS-GUARALDI e FORMIGA, 1991; GOMES *et al.*; 2009).

### 3.9 Avaliação da formação de biofilme em vidro sob condições limitantes de ferro

Este ensaio foi realizado com o objetivo de avaliar a influência da limitação de ferro na suscetibilidade das cepas de *C. diphtheriae* formar biofilme em vidro. O procedimento foi realizado como descrito no item 3.7, porém cada cepa foi cultivada em tubos contendo TSB e



tubos contendo TSB acrescido do quelante de ferro, 2,2'-dipiridil (Sigma, Alemanha) na concentração de 0,5mM. O meio de cultivo para a cepa mutante LDCIC-A1 foi também acrescido de canamicina, na concentração de 25 µg/mL, em ambas condições (MOREIRA *et al.*, 2003). Ao final do experimento, os tubos foram avaliados quanto a intensidade da formação do biofilme através da medição da absorbância em comprimento de onda de 570 nm, em leitor de placas (BioRad, modelo 550) (MATTOS-GUARALDI e FORMIGA, 1991; MOREIRA *et al.*, 2003; GOMES *et al.*; 2009).

### 3.10 Experimentação em animais utilizando camundongos

Foram utilizados neste ensaio camundongos convencionais da espécie Swiss Webster (SW), fêmeas, com 18 a 22 g, cedidos pela CECAL-FIOCRUZ (Rio de Janeiro, Brasil). O estudo foi realizado em conformidade com as normas descritas nos Princípios Internacionais de Orientação para Pesquisa Biomédica Envolvendo Animais, conforme certificado pelo Conselho de Organizações Internacionais de Ciências Médicas e com as Diretrizes éticas do governo brasileiro para pesquisas envolvendo animais (Comite de ética para experimentação animal IBRAG de projeto inscrito sob PROTOCOLO n° CEUA/029/2015).

A possibilidade de desenvolver osteomielite foi analisada por métodos descritos anteriormente por Dias e colaboradores (2011) e adaptado por Stavracakis-Peixoto e colaboradores (2014). Camundongos foram infectados pela cepa NCTC 13129 e pela cepa mutante LDCIC-A1 por via intravenosa através de uma veia caudal com 0,2 ml de suspensão bacteriana preparada em solução salina a uma  $DO_{570}$  0.2 . Os camundongos controle receberam somente 0,2 ml de solução salina fisiológica estéril. Os experimentos foram realizados em triplicata e os camundongos foram examinados diariamente por 30 dias por observadores independentes para avaliar, macroscopicamente, a presença de inflamação das articulações e ulcerações. O número de articulações envolvidas, incidência e duração da artrite, ocorrência de anquiloses e destruição óssea foram observadas. A artrite foi definida como um eritema visível e/ou inchaço, de pelo menos uma articulação. A gravidade clínica da artrite foi classificada em uma escala de 0-3 para cada pata, de acordo com os aspectos do eritema e edema (0, nenhuma mudança; 1, leve inchaço e/ou eritema; 2, inchaço moderado e eritema; 3 inchaços intenso, eritema e/ou anquiloses). Assim, cada camundongo poderia ter uma pontuação máxima de 12. O índice de artrite foi construído dividindo a pontuação geral

(valor cumulativo de todas as patas) pelo número de animais em cada grupo experimental (DIAS *et al.*, 2011; STAVRACAKIS-PEIXOTO *et al.*, 2014).

### 3.11 Estudos histopatológicos

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

### 3.12 Análise estatística

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

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Análise de bioinformática para a proteína DIP1180

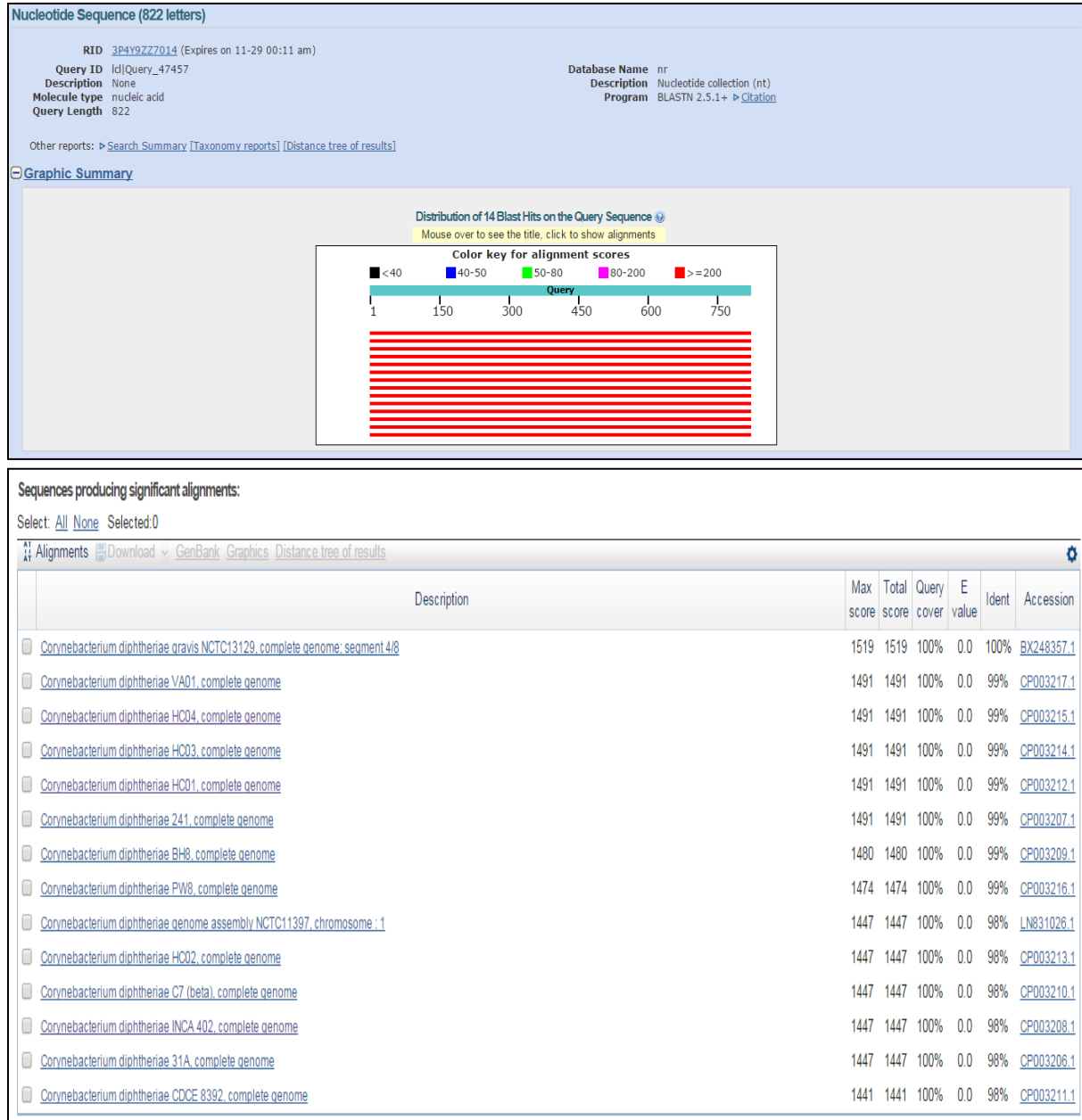
O sequenciamento da cepa de *C. diphtheriae* biótipo *gravis* NCTC 13129, por Cerdeño e colaboradores (2003), alertou a comunidade científica sobre a possibilidade de haver, em outras cepas de *C. diphtheriae*, a presença de gene (s) codificante (s) para hemolisina (s) com potencial para atuar como fator (es) de virulência.

Comparando, *in silico*, a sequência oligonucleotídica do gene *dip1180* com os genomas disponíveis no banco de dados do NCBI *Chromosome Sequences*, através do aplicativo *online* BLAST, foi possível identificar 14 alinhamentos significativos, todos correspondentes às cepas de *C. diphtheriae*, com alto grau de conservação, homologia superior a 98% e com *e-value* de 0.0 (Figura 6). O programa identificou estes genes como codificadores de uma proteína hipotética com atividade hemolisina e citotoxina. Algumas dessas cepas foram analisadas, mais profundamente, neste trabalho (Tabela 2).

A análise *in silico* permitiu verificar que a presença do gene codificador da hemolisina DIP1180, também presente nas demais cepas de *C. diphtheriae* com sequenciamento no banco de dados do NCBI, independe da presença do gene *tox*, uma vez que tanto cepas produtoras quanto cepas não produtoras de TD, apresentaram homologia para o gene (Tabela 2).

A análise da sequência proteica da DIP1180 e das hemolisinas hipotéticas encontradas nas demais cepas de *C. diphtheriae*, através do banco de dados de proteínas (Pfam), destacou dois domínios conservados, um pertencente à família das metiltransferases dependentes de S-adenosilmetionina (SAM ou AdoMet-MTase) de classe I e outro pertencente ao domínio S4, além de indicar alta similaridade com hemolisinas de diversos organismos, inclusive algumas espécies do gênero *Streptococcus* (Figura 7).

Figura 6 - Comparação entre as sequências oligonucleotídicas das cepas de *C. diphtheriae* com a sequência da hemolisina DIP1180



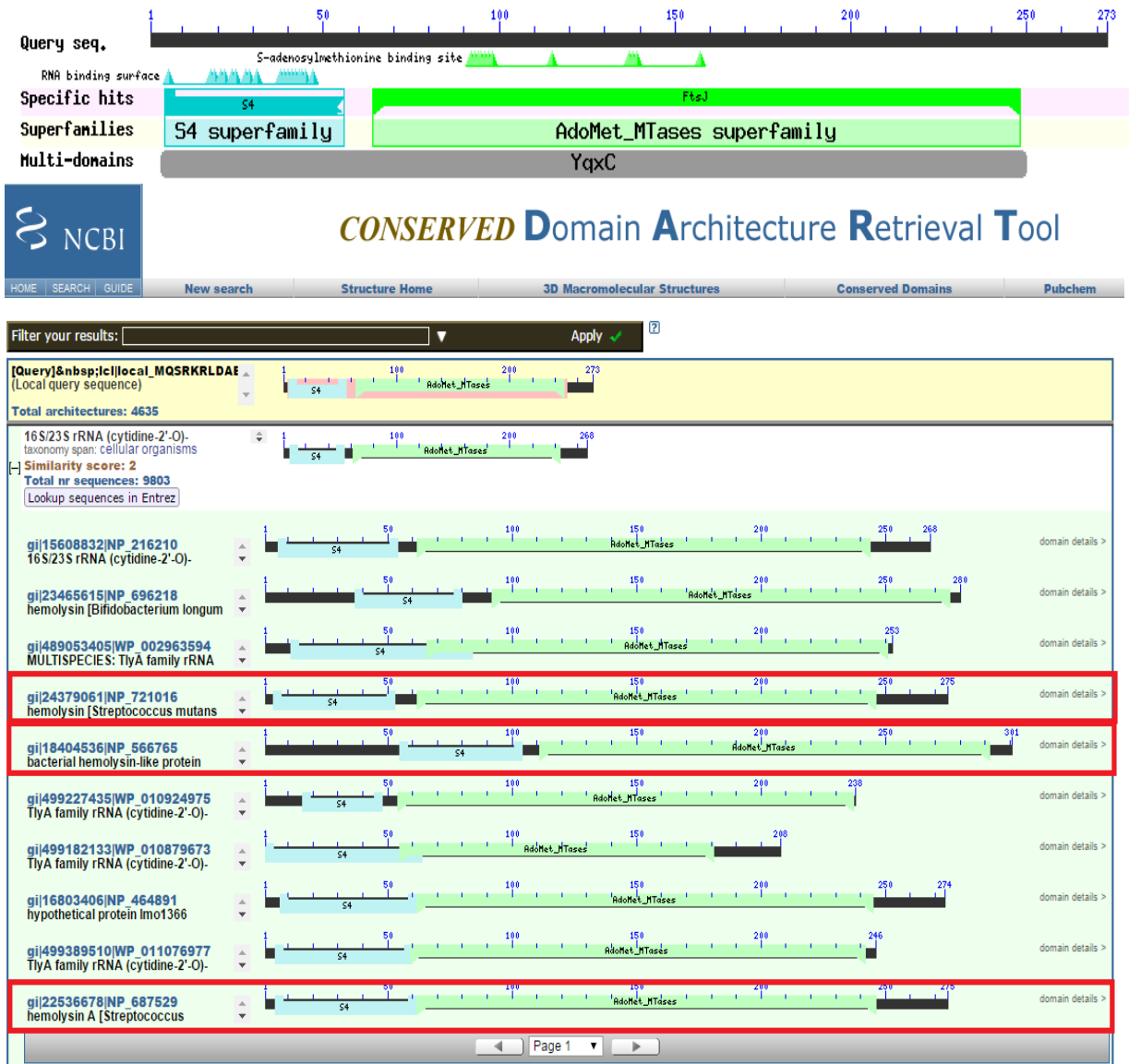
Nota: Foram comparadas as sequências de todas as cepas que possuem sequenciamento disponível no *gen bank*. Fonte: Dados extraídos do aplicativo online Blast-n. Disponível no site: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, acesso em 01 de dezembro de 2016.

Tabela 2: Caracterização de cepas de *C. diphtheriae* quanto a presença dos genes *tox* e *dip1180*

Cepa /País	Biotipo	Quadro Clínico	Presença do gene <i>tox</i>	Similaridade com o gene <i>dip1180</i>
NCTC 13129/UK	<i>gravis</i>	Difteria	+	<b>100%</b>
TR241/BR	<i>mitis</i>	Difteria	+	<b>99%</b>
HC01/BR	<i>mitis</i>	Endocardite	-	<b>99%</b>
HC03/BR	<i>mitis</i>	Endocardite	-	<b>99%</b>
HC04/BR	<i>gravis</i>	Endocardite	-	<b>99%</b>
INCA 814/BR	<i>mitis</i>	Pneumonia/Neoplasia	-	<b>99%</b>
VA01	<i>gravis</i>	Difteria	+	<b>99%</b>
PW8	<i>mitis</i>	Cepa vacinal	+	<b>99%</b>
402/BR	<i>belfante</i>	Pneumonia/Neoplasia	-	<b>98%</b>
CDC E-8392/EUA	<i>mitis</i>	Difteria	+	<b>98%</b>
ATCC27012/EUA	<i>mitis</i>	Assintomático	+	<b>98%</b>
ATCC 27010/EUA	<i>mitis</i>	Assintomático	-	<b>98%</b>
HC02/BR	<i>mitis</i>	Endocardite	-	<b>98%</b>

Fonte: Dados extraídos do aplicativo online Blast-n. Disponível no site: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, acesso em 01 de dezembro de 2016.

Figura 7 - Apresentação dos domínios conservados referente à proteína DIP1180



Fonte: Dados extraídos do aplicativo online Blast. Disponível no site: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, acesso em 01 de dezembro de 2016.

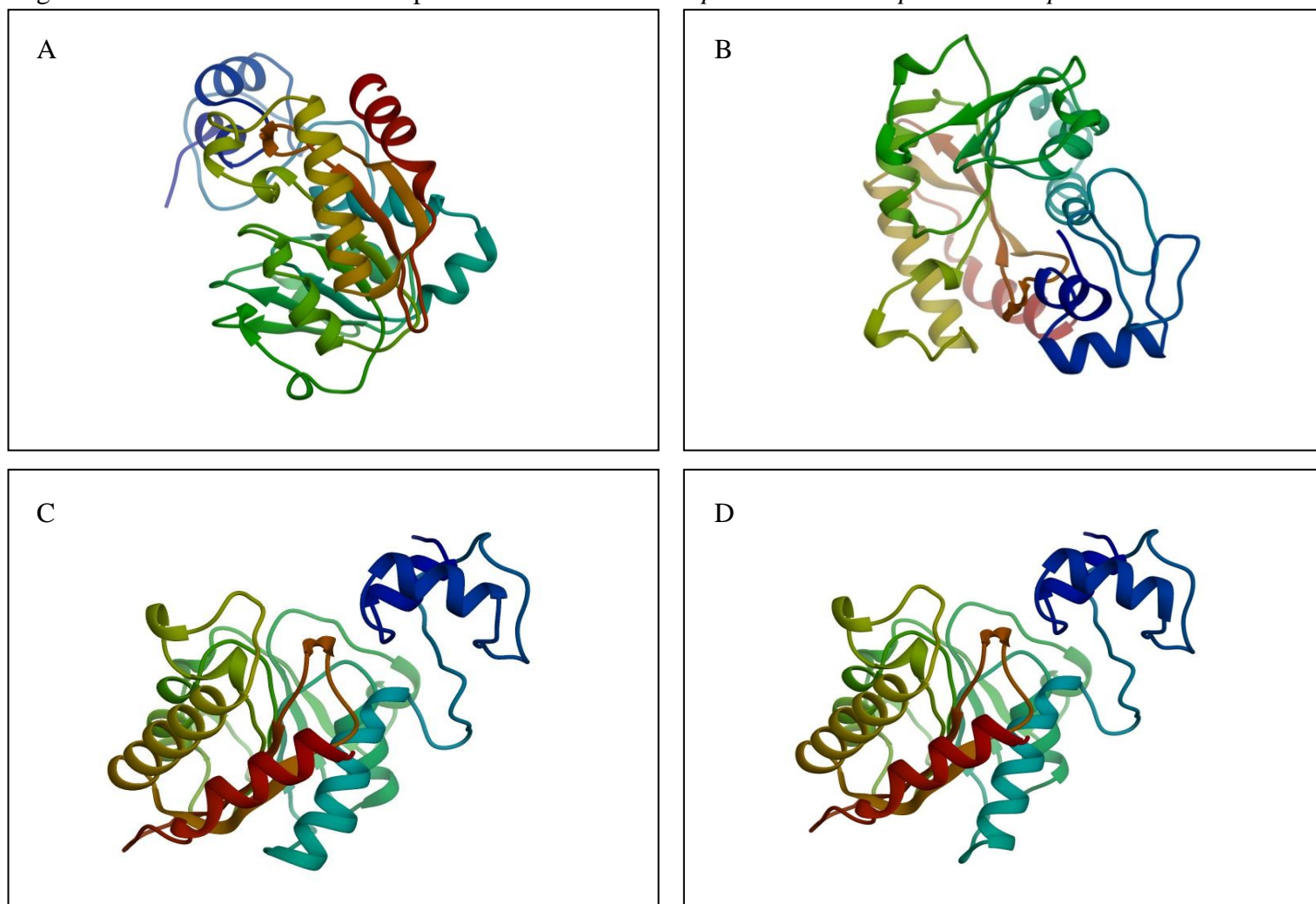
## 4.2 Análise do modelo tridimensional e predição da porção transmembrana da DIP1180

A análise do modelo tridimensional da proteína DIP1180 foi realizada pelo servidor *online* I-TASSER, que gerou cinco melhores modelos estruturais com valor de *c-scores* que variam de -5 a 2, sendo a estrutura selecionada aquela com maior valor (*c-score*=1,62).

Através de mecanismos de reconhecimento de proteína, homologia e analogia, foi realizada a predição da função da proteína DIP1180 utilizando o servidor *Phyre*<sup>2</sup>. O domínio conservado com melhor alinhamento está apresentado na Figura 8A. Primeiramente, foram alinhados 273 resíduos da sequência com 100% de confiança e 97% de cobertura com uma hemolisina presente em *Streptococcus thermophilus* (Figura 8B). Análise similar foi realizada com as sequências das proteínas homólogas encontradas em *C. diphtheriae* INCA 814 e *C. diphtheriae* HC01 e o melhor domínio conservado selecionado pelo servidor *Phyre*<sup>2</sup> foi apresentado na Figura 8 (C e D, respectivamente).

A localização celular de determinada proteína facilita na compreensão sobre a sua função (KLEE & ELLIS, 2005). A predição da localização e a quantidade de hélices transmembranares da DIP1180 foi realizada pelo software TMHMM versão 2.0, segundo o qual ocorre ausência de regiões transmembrana, sugerindo tratar-se de uma proteína secretada (Figura 9).

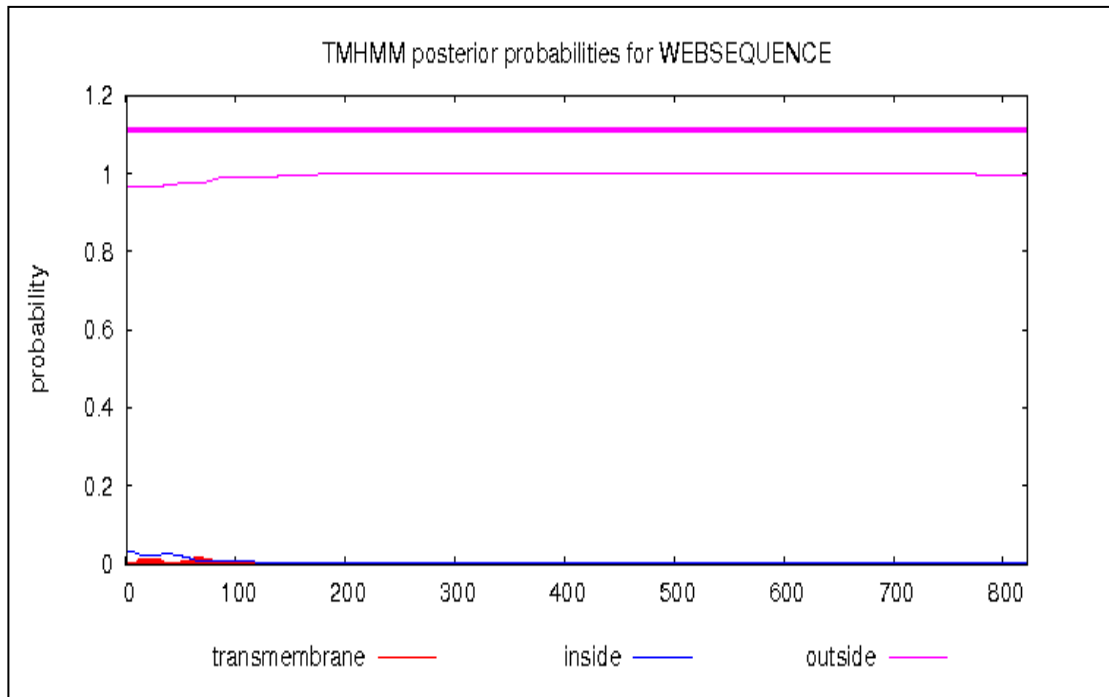
Figura 8 - Modelos tridimensionais para a hemolisina em *Streptococcus thermophilus* e *C. diphtheriae*



Legenda: Modelos tridimensionais: A) Estrutura 3D para a proteína DIP1180 de *C. diphtheriae* biotipo *gravis* cepa NCTC 13129; B) Estrutura 3D para a hemolisina de *Streptococcus thermophilus*; C) e D) Estruturas 3D para a hemolisina/citotoxina hipotética encontrada das cepas de *C. diphtheriae* INCA 814 e HC01, respectivamente. Dados fornecidos pelo servidor *Phyre*<sup>2</sup>.



Figura 9 - Ausência de hélices transmembranares para a DIP1180



Fonte: Aplicativo *online* TMHMM versão 2.0. Disponível no site: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>

### 4.3 Detecção do gene *dip1180* por PCR convencional

#### 4.3.1 Oligonucleotídios iniciadores

O desenho de oligonucleotídeos iniciadores, apresentado na tabela 3, foi baseado na sequência de DNA para o gene *dip1180* de *C. diphtheriae* biotipo *gravis* cepa NCTC 13129, considerando a que apresentava maior similaridade com os homólogos do gene encontrados nas cepas de *C. diphtheriae* utilizadas nesse estudo, após a realização de triagem *in silico* utilizando as cepas sequenciadas no banco de dados da NCBI. Foram consideradas satisfatórias temperaturas de anelamento dos pares de base em torno de 60 °C, tamanho variável entre 500 e 800 pb, conteúdo GC maior que 50%, bem como baixas probabilidades de formação de grampos, homodímeros e heterodímeros, estruturas que podem prejudicar a eficiência de amplificação durante as reações de PCR.

Tabela 3: Sequências oligonucleotídicas iniciadoras para o gene *DIP 1180* para cepas de *C. diphtheriae*.

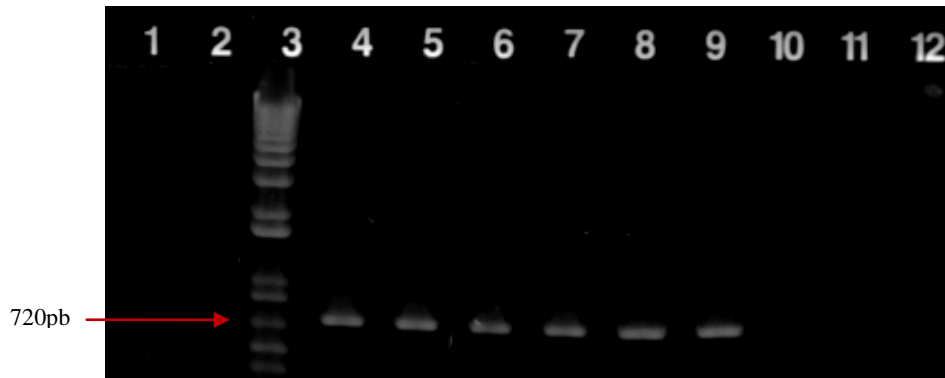
	Sequência (5' ->3')	Tm	GC%
Hemolisina F	GTCCACGTACAGGGTTTCGT	59,97	55,00
Hemolina R	ACCTTTCTGGACTGCTTCCG	59,96	55,00
Produto	720 pb		

Fonte: Aplicativo *online* Primer-BLAST. Disponível em: [HTTP://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)

#### 4.3.2 Produtos amplificados por PCR

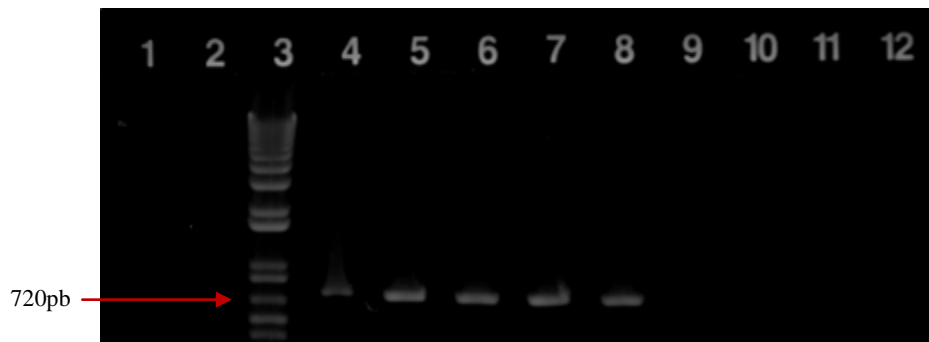
As reações de amplificação da PCR indicaram que todas as cepas de *C.diphtheriae*, com sequenciamento no NCBI utilizadas nesse estudo, independente da presença ou ausência da TD, representada pelo gene *tox*, apresentaram bandas na região entre 700 pb a 800 pb. Entre as cepas que ainda não tiveram seus genomas sequenciados, foi observada amplificação para o gene na cepa *C.diphtheriae* HC06, enquanto que para a cepa MA 136 não ocorreu amplificação. Os produtos amplificados por PCR podem ser visualizados nas Figuras 10 e 11.

Figura 10 - Eletroforese em gel de agarose 1,2% com o produto da amplificação do gene *dip1180* de cepas de *C. diphtheriae* não produtoras de toxina diftérica



Legenda: Gel de agarose 1,2%: 1) Vazio; 2) vazio; 3) Peso molecular; 4) HC01 (+); 5) HC04 (+); 6) HC06 (+); 7) INCA 814 (+); 8) 402 (+); 9) 27010 (+); 10) MA 136 (-); 11) Controle (-); 12) vazio.

Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose 1,2% com o produto da amplificação do gene *dip1180* de cepas de *C. diphtheriae* produtoras de toxina diftérica



Legenda: Gel de agarose 1,2 %: 1)Vazio; 2) vazio; 3) Peso molecular; 4) 27012 (+); 5) NCTC (+); 6) CDC (+); 7) 241 (+); 8) VA01 (+); 9) *C. ulcerans* 809 (-); 10) *C. ulcerans* FRC11 (-); 11) Controle (-); 12) vazio.

#### 4.4 Transformação de *E. coli* eletrocompetente *One Shot*<sup>®</sup> *TOP10* com o vetor TOPO::*DIP1180* e confirmação da presença do inserto *dip1180*

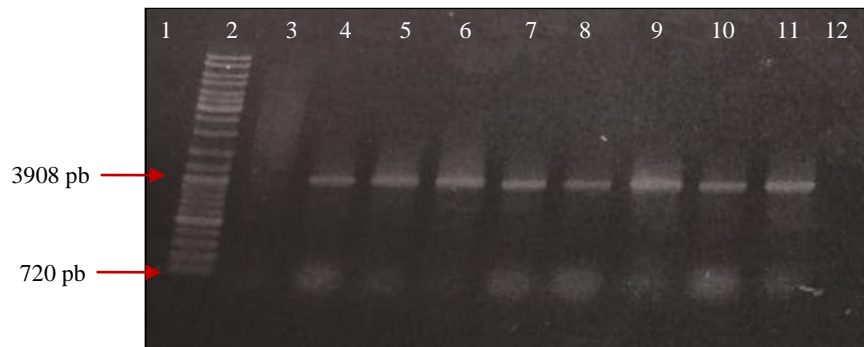
A obtenção da cepa mutante para o gene *dip1180* foi realizada através da ligação da sequência codificadora desta proteína ao vetor pCR<sup>™</sup> 2.1 TOPO originando uma recombinação gênica, quando inserido na cepa de *C. diphtheriae*.

Aproximadamente 24h após a eletroporação, onde o produto da ligação entre o vetor TOPO e o inserto *dip1180* foi transformado em células de *E. coli One Shot*<sup>®</sup> *TOP10* (Invitrogen) foi possível visualizar colônias recombinantes. Oito colônias transformadas foram escolhidas de forma aleatória, inoculadas em caldo seletivo e incubadas a 37°C por 24h. Para visualização do inserto foi realizada digestão enzimática, a partir do DNA plasmidial extraído com o kit *Miniprep* (Invitrogen) e, subsequentemente, realizada reação de PCR para identificação dos fragmentos. A eletroforese em gel de agarose para visualização da amplificação está demonstrada na figura 12. Esta cepa contendo o inserto com o plasmídeo truncado para o gene *dip1180* é a cepa mutante NCTC13129 DIP1180 :: pCR2.1 – TOPO ‘DIP1180’, denominada LDCIC-A1.

As cepas recombinantes foram submetidas a técnica de PCR multiplex, para a confirmação da espécie e presença do gene *tox* (Figura 13), uma vez que a cepa selvagem é carreadora do gene.

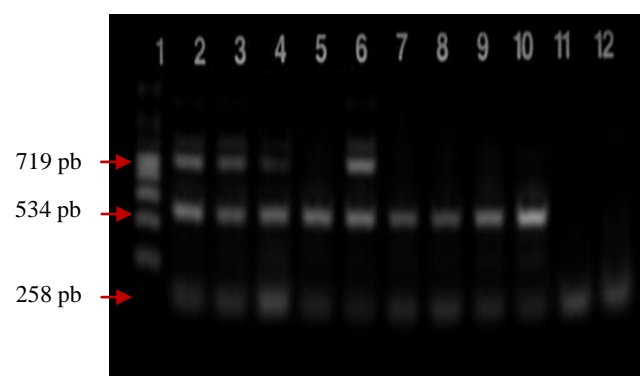
A cepa mutante LDCIC-A1 também teve suas características fenotípicas confirmadas através da utilização da coloração de Gram e do sistema semi-automático miniaturizado *API*<sup>®</sup> *Coryne*, apresentando as mesmas características observadas para a cepa selvagem NCTC 13129, conforme visualizado nas figuras 14 e 15, respectivamente.

Figura 12 - Confirmação da presença do inserto *dip1180* no vetor TOPO®



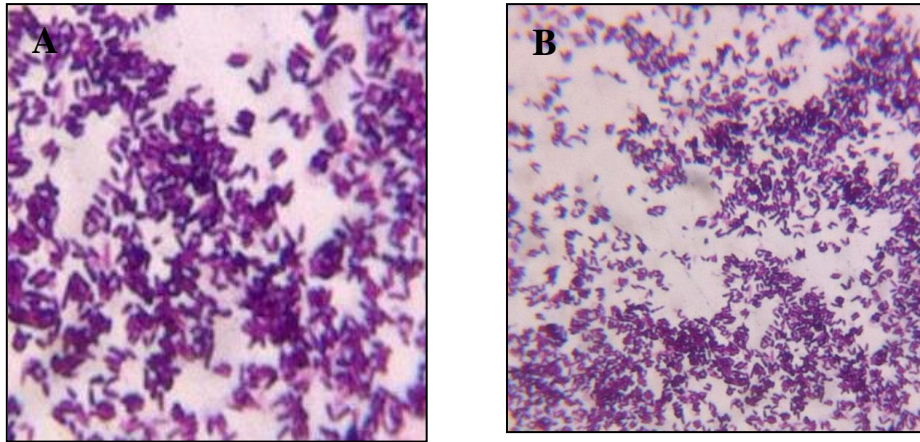
Legenda: Coluna 2 - PM (peso molecular); Coluna 3 – Controle negativo; Colunas 4 a 11 – amplificação das colônias LDCIC-A1. Fragmento de 720pb referentes a DIP1180 e fragmento de 3908 pb referentes ao plasmídeo inserido.

Figura 13 - Avaliação da expressão dos genes *tox* e *dTXR* na cepa mutante LDCIC-A1



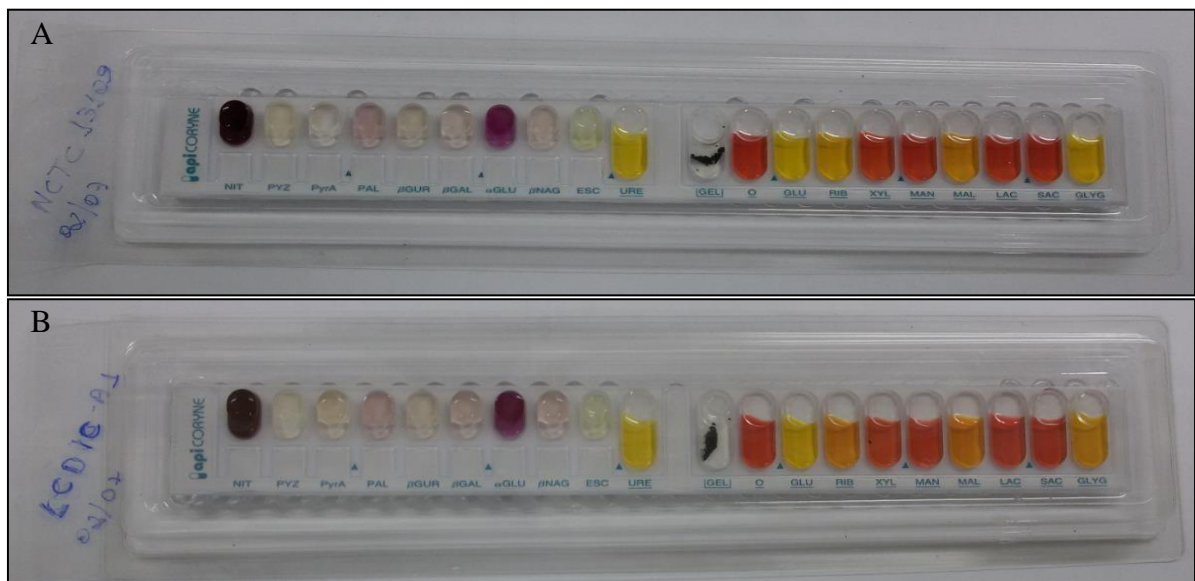
Legenda: A) PCR *multiplex* para confirmação dos fragmentos de TD (fração A - 719pb e fração B - 534pb) e fragmento dTXR (258pb). Cepas: 1)PM; 2) LDCIC-A1; 3) LDCIC-A1; 4) LDCIC-A1; 5) HC01; 6) NCTC; 7) HC02; 8) HC03; 9) HC04; 10) HC06; 11) Controle; 12)Controle. Conforme descrito por Pimenta e colaboradores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

Figura 14 - Análise morfo-tintorial de cepas de *C. diphtheriae*



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

Figura 15 – Caracterização fenotípica pelo sistema API®Coryne das cepas de *C. diphtheriae* NCTC 13129 e LDCIC-A1



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

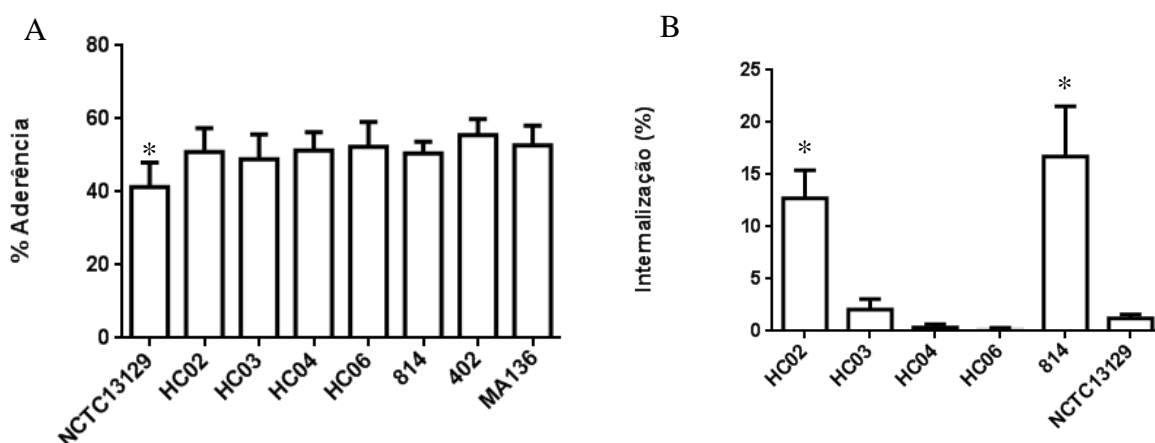
#### 4.5 Ensaios de interação bacteriana com células HEp-2

Ensaios de aderência a monocamadas de células epiteliais derivadas de carcinoma de laringe (HEp-2) são considerados modelos úteis para o estudo de interações bacterianas de cepas de *C. diphtheriae* com a superfície do hospedeiro.

Todas as cepas analisadas foram capazes de aderir às células HEp-2 após 3 h de incubação a 37 °C com percentuais de associação elevados. Os percentuais de associação às células HEp-2 das cepas de *C. diphtheriae* não produtoras de TD mostraram-se, significativamente, mais elevados (Figura 16A) em relação à cepa produtora, sugerindo assim a existência de outros mecanismos relacionados a adesividade nestes bacilos independentes da produção de TD.

As cepas HC02 e INCA 814, não produtoras de TD, apresentaram os percentuais de viabilidade intracelular mais elevados (Figura 16B) quando comparados às cepas produtoras de TD. Embora as cepas HC03, HC04 e HC06 tenham sido isoladas a partir de infecções invasivas, estas apresentaram baixos percentuais de viabilidade intracelular.

Figura 16 - Percentuais de aderência e internalização a células HEp-2 de *C. diphtheriae*



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

#### 4.6 Avaliação da atividade hemolítica em cepas de *C. diphtheriae*

Diferentes espécies bacterianas apresentam hemolisinas como sendo um dos seus principais fatores de virulência. Ampla variedade de hemolisinas já foram identificadas em diferentes espécies. No entanto, pouco se sabe a respeito deste fator em cepas de *C. diphtheriae*, justificando-se, assim, a importância de estudar a atividade hemolíticas destas cepas.

Inicialmente as cepas foram cultivadas em placas de meio ágar sangue de carneiro a 5%, onde foram realizados pequenos cortes para facilitar a visualização da hemólise. Após incubação, durante 24h a 37°C, foi possível verificar que todas as cepas clínicas e padrão de *C. diphtheriae* avaliadas foram capazes de produzir hemólise, exceto a cepa MA 136 (Tabela 4).

Tabela 4: Origem e caracterização de cepas de *C. diphtheriae* quanto ao potencial de produção de TD e atividade hemolítica (AH).

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

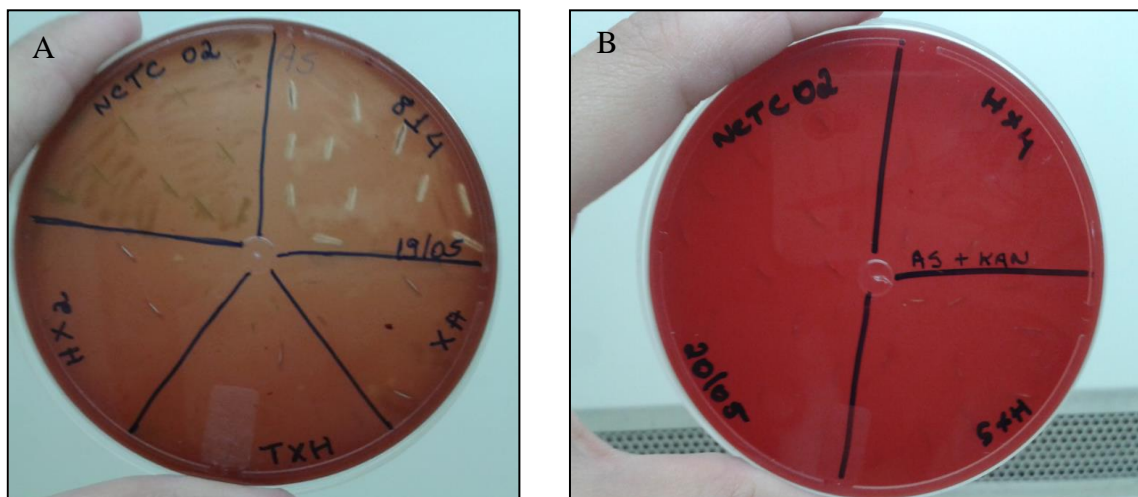
Atividade hemolítica (AH). Dados extraídos do aplicativo online Blast-n. Disponível no site: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Acesso em 01 de dezembro de 2016.



Não foi possível estabelecer uma correlação entre a indução de hemólise e a presença do gene *tox*, nas cepas estudadas, uma vez que tanto cepas produtoras de TD, quanto não produtoras foram capazes de promover hemólise.

A recombinação homóloga do gene *dip1180* a partir da cepa selvagem (NCTC 13129) produziu uma cepa mutante, designada LDCIC-A1 que não foi capaz de produzir hemólise (Figura 17) sugerindo que esta atividade seja dependente da expressão deste gene.

Figura 17 - Comparação da capacidade hemolítica entre as cepas *C. diphtheriae* NCTC 13129 e a cepa mutante LDCIC-A1



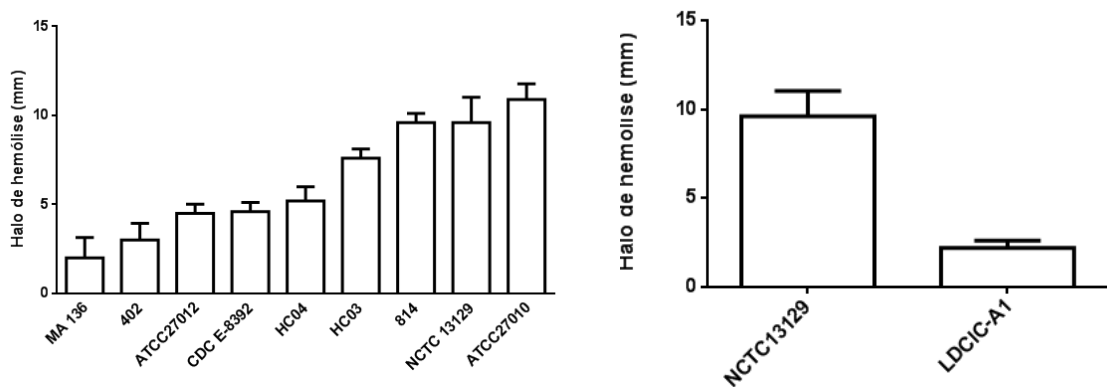
Legenda: As cepas foram semeadas em ágar sangue contendo 5% de sangue de carneiro. A) a cepa selvagem NCTC 13129/UK apresentou hemólise do tipo alfa, enquanto que três cultivos da cepa mutante LDCIC-A1 (HX, HX1 e HX2) não apresentaram atividade hemolítica e a cepa INCA 814, não produtora de TD, apresentou hemólise do tipo beta. B) Quando semeadas em placa com canamicina (25 µg/mL) apenas a cepa mutante cresceu e não foi capaz de hemolisar o meio.

A avaliação quantitativa da atividade hemolítica considerou o tamanho dos halos gerados pelas cepas de *C. diphtheriae* após incubação por 24h a 37°C, de acordo com o protocolo de Murase e colaboradores adaptado (2012). Os halos foram medidos com o auxílio de paquímetro.

Conforme apresentado na Figura 18A, pode-se observar que cepas de *C. diphtheriae* não produtoras de TD (ATCC 27010, INCA 814, HC03, HC04, 402) apresentaram atividade hemolítica intensa, superior à hemólise observada em algumas cepas produtoras de TD

(ATCC 27012, CDC E-8392, NCTC 13129). A cepa mutante LDCIC-A1 não apresentou atividade hemolítica (Figura 18B).

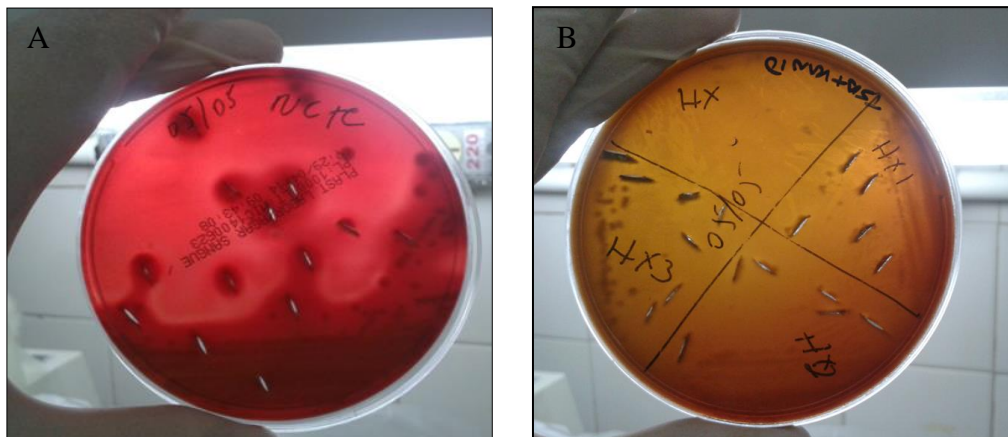
Figura 18 - Quantificação da atividade hemolítica por *C. diphtheriae*



Legenda: Comparação entre os tamanhos dos halos de hemólise gerados pelos *spots* das cepas de *C. diphtheriae* em ágar acrescido de 5% de sangue de carneiro. A) Comparação entre as zonas de hemólise de cepas produtoras e não produtoras de TD. Cepas não produtoras de TD foram capazes de produzir hemólise. B) Comparação das zonas de lise entre cepas mutante LDCIC-A1 e selvagem. A cepa selvagem apresentou atividade hemolítica muito superior quando comparada a cepa mutante. As diferenças estatísticas foram determinadas pelo teste ANOVA, seguido do teste de comparação múltipla de *Tukey* onde consideramos  $p \leq 0,05$  em relação ao controle negativo. # Essas médias não diferiram entre si, mas diferiram das demais.

Para avaliar a influência do ambiente sobre atividade hemolítica das cepas estudadas, os mesmos ensaios foram realizados em microaerofilia. Essa condição favoreceu a expressão da atividade hemolítica em todas as cepas capazes de produzir hemólise em hemácias de carneiro, conforme apresentado na Figura 19, representada pela cepa padrão NCTC 13129. Contudo, a microaerofilia não propiciou a atividade hemolítica nas cepas MA 136 e LDCIC-A1.

Figura 19 - Avaliação da capacidade hemolítica da cepa *C. diphtheriae* NCTC 13129 em microaerofilia

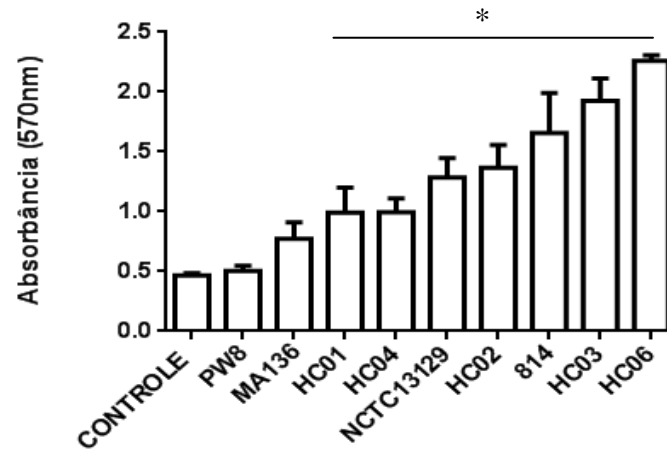


Legenda: A) cepa selvagem NCTC 13129/UK apresentou hemólise mais expressiva quando submetida a crescimento em microaerofilia. B) A cepa mutante não apresentou hemólise quando submetida a condição de microaerofilia.

#### 4.7 Análise quantitativa da aderência ao poliestireno de cepas de *C. diphtheriae*

Uma outra característica importante no processo de infecção é a capacidade de aderência da bactéria ao substrato (ou superfície) e formação de biofilme. Deste forma, cepas de *C. diphtheriae*, produtoras e não produtoras de TD, foram avaliadas quantitativamente quanto à capacidade de formar biofilme em poliestireno, conforme demonstrado no Figura 20. A maioria das cepas foi capaz de aderir ao substrato em diferentes intensidades, sendo classificadas como: (i) não-aderentes as cepas PW8 e MA 136; (ii) fracamente aderentes as cepas HC01 e HC04, (iii) moderadamente aderentes as cepas NCTC 13129, HC02, HC03 e INCA 814 e (iv) fortemente aderente a cepa HC06. Interessantemente, as cepas não carreadoras do gene *tox* apresentaram valores maiores de absorbância, indicando maior formação de biofilme, com exceção apenas da cepa MA 136.

Figura 20 - Formação de biofilme em poliestireno por cepas de *C. diphtheriae*, produtoras e não produtoras toxina diftérica



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

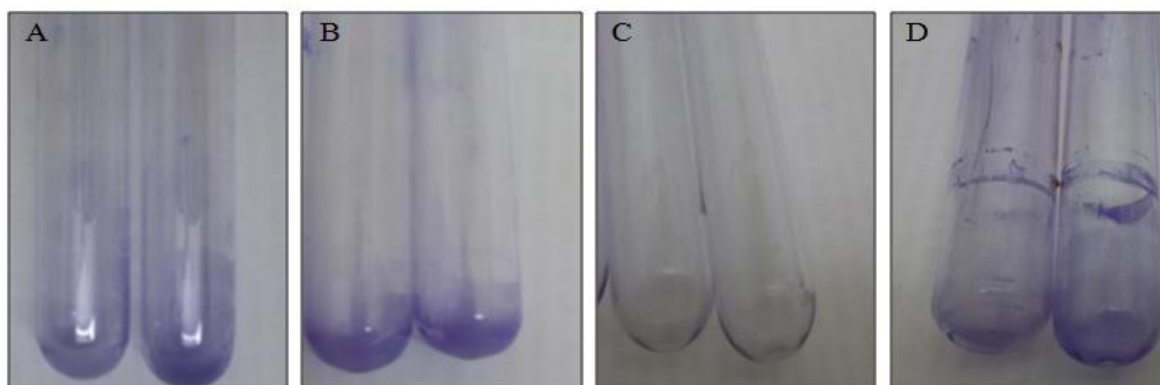
#### 4.8 Avaliação da influência do gene *dip1180* na formação de biofilme em diferentes superfícies abióticas

Com o propósito de avaliar a influência do *gene dip1180* na formação de biofilme, foram realizados ensaios em superfícies abióticas distintas (hidrofílica - vidro e hidrofóbica – poliestireno).

O ensaio qualitativo para formação de biofilme em vidro demonstrou que a cepa NCTC 13129, produtora de hemolisina, possui padrão de aderência do tipo II (Figura 21).

O truncamento do *gene dip1180* promoveu a redução no potencial de produção do padrão de aderência tipo II na cepa mutante (LDCIC-A1), corroborando com a hipótese de que a hemolisina influencia nos mecanismos de formação de biofilme em cepas de *C. diphtheriae* (Tabela 5 e Figura 21). Esse achado vem ao encontro daqueles obtidos na análise quantitativa, conforme relatado a seguir.

Figura 21 - Padrão de aderência e formação de biofilme em vidro por cepas de *C. diphtheriae*



Legenda: Formação de biofilme em vidro. A) cepa NCTC 13129 - padrão de aderência II; B) cepa mutante LDCIC-A1 – padrão de aderência II; C) cepa CDC E-8392 – padrão de aderência IV (controle negativo); D) cepa 241 – padrão de aderência I (controle positivo). Observa-se diminuição no potencial de formação de biofilme na cepa mutante LDCIC-A1 quando comparada a cepa selvagem NCTC 13129.

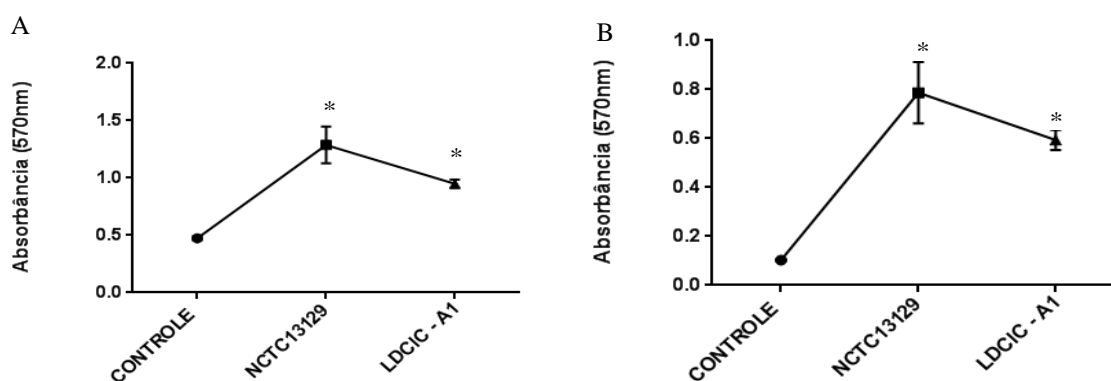
Tabela 5: Análise da influência do gene *dip1180* sobre a formação de biofilme em vidro por *C. diphtheriae*

Cepa	Biofilme em vidro
CDC E-8392	IV
LDCIC-A1	II
NCTC 13129	II
241	I

Legenda: As cepas de *C. diphtheriae* 241 e CDC E-8392 foram utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente. Padrão de aderência em vidro, quando cultivadas em TSB: I – bactérias aderidas nas laterais do tubo de vidro e na interface entre o meio de cultura e o ar; II – bactérias aderidas somente 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, de acordo com MATTOS-GUARALDI e FORMIGA, (1991) e GOMES e colaboradores (2009).

Na avaliação quantitativa de biofilme, em poliestireno e em vidro, tanto a cepa selvagem NCTC 13129, quanto a cepa mutante LDCIC-A1, foram capazes de aderir ao substrato com intensidades diferentes. O truncamento do gene *dip1180* promoveu redução significativa da aderência tanto ao poliestireno quanto ao vidro em relação à cepa selvagem (NCTC 13129), corroborando com a hipótese de que a expressão desse gene favoreça a formação de biofilme em cepas de *C. diphtheriae* (Figura 22).

Figura 22 – Análise quantitativa da formação de biofilme por *C. diphtheriae* em poliestireno e vidro



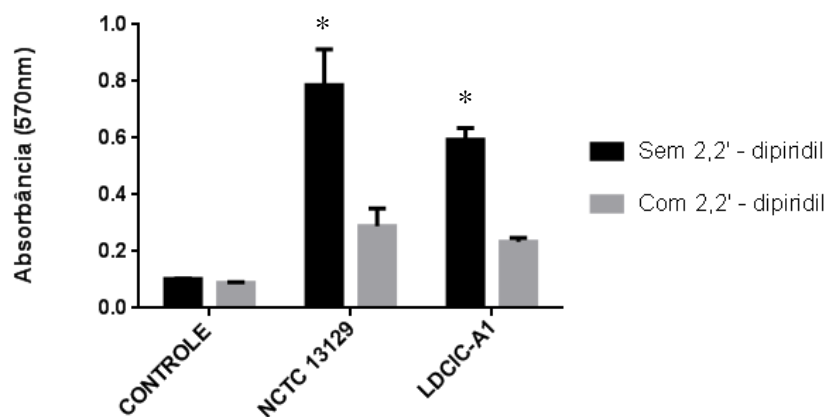
Legenda: A) Formação de biofilme em poliestireno. B) Formação de biofilme em vidro. \* As diferenças estatísticas foram determinadas pelo teste ANOVA, seguido do teste de comparação múltipla de Tukey considerando significativos valores de  $p \leq 0,05$ .

#### 4.9 Avaliação da influência do ferro na formação de biofilme em vidro por *C. diphtheriae*

A virulência de cepas de *C. diphtheriae* é influenciada por condições limitantes de ferro. Para avaliar a influência do ferro na capacidade de formação de biofilme em *C. diphtheriae*, as cepas, selvagem e mutante, foram cultivadas na presença e ausência de quelante deste íon.

Ocorreu uma expressiva redução na capacidade de aderência ao vidro, observada para ambas as cepas, quando cultivadas na presença do quelante de ferro, sugerindo que este íon exerça papel relevante na expressão de adesinas em *C. diphtheriae* (Figura 23).

Figura 23 - Influência do ferro na formação de biofilme em vidro em *C. diphtheriae*



Legenda: 2,2'-dipiridil (quelante de ferro); NCTC 13129 (cepa selvagem); LDCIC-A1 (cepa mutante). \*As diferenças estatísticas foram determinadas pelo teste ANOVA, com  $p \leq 0,05$ .

#### 4.10 Papel da DIP1180 no potencial artrítico de *C. diphtheriae*

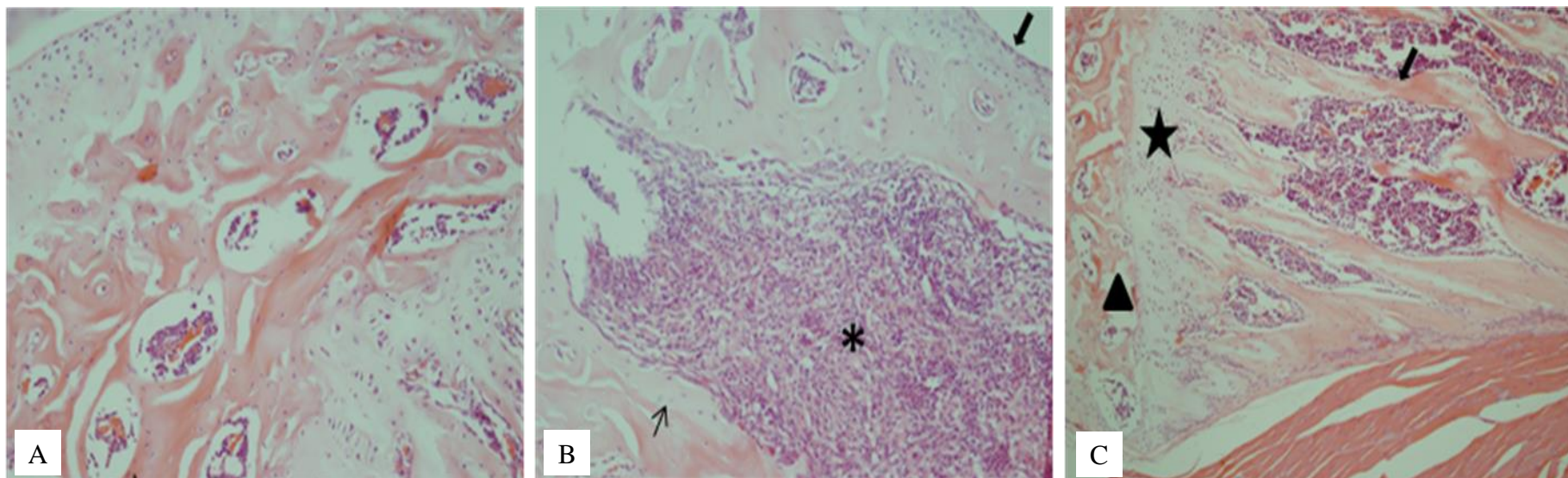
Uma vez que os resultados *in vitro* apresentaram expressivas alterações na expressão do gene investigado, tornou-se relevante avaliar a influência da proteína DIP1180 em causar infecção hematogênica e no osso, utilizando modelo experimental *in vivo*. Os camundongos foram inoculados com as cepas NCTC 13129 e LDCIC-A1.

A disseminação hematogênica e sinais clínicos de artrite foram percebidos a partir do sexto dia nos camundongos infectados com a cepa NCTC 13129. As articulações mais frequentemente afetadas foram joelho e calcânhar. Os dados apresentados na Figura 24 mostram um potencial artrítico maior para a cepa selvagem quando em comparação com o respectivo mutante LDCIC-A1.

Micrografias das características histopatológicas das articulações de camundongos infectados durante 30 dias, confirmaram os sinais clínicos de artrite e osteomielite por *C. diphtheriae*. O joelho do grupo controle, permaneceu livre de sintomas e pode ser observado na Figura 24A. Na Figura 24B, observa-se características histopatológicas do joelho de camundongos infectados pela cepa selvagem NCTC 13129. Alterações como cartilagem reduzida, extenso infiltrado difuso no osso subcondral, área de remodelação do tecido (Figura 24B) foram observadas, além de extenso infiltrado inflamatório difuso que envolve e penetra no tecido ósseo. Os sinais histopatológicos observados em tecidos do joelho de camundongos infectados com o mutante LDCIC-A1 apresentaram hiperplasia da membrana e redução da cartilagem articular com destruição do osso subcondral (Figura 24C). Estas lesões causadas pelo mutante LDCIC-A1 foram menos agressivas do que os causados pela cepa selvagem.



Figura 24 - Micrografias histopatológicas de articulações de membros posteriores de camundongos infectados experimentalmente pela veia caudal com cepas de *C. diphtheriae* NCTC 13129 e LDCIC-A1



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

## 5 DISCUSSÃO

Infecções causadas por *C. diphtheriae* continuam ocorrendo em diferentes países. Os principais sintomas da difteria clássica são consequências da ação da TD, fator de virulência mais conhecido desta espécie (De ZOYSA, EFSTRATIOU E HAWKEY, 2005; WAGNER *et al.*, 2010). No entanto, clones bacterianos não produtores da toxina têm sido associados a manifestações atípicas, sugerindo o possível envolvimento de outros fatores de virulência na patogenicidade do *C. diphtheriae*, podendo este ser responsável tanto por lesões cutâneas e faringites quanto por doenças invasivas, como endocardite, bacteremia, artrite séptica, osteomielite e abscessos esplênicos (ALEXANDER, 1984; POILANE *et al.*, 1995; MATTOS-GUARALDI, FORMIGA, MARQUES, 2001; HIRATA JR *et al.*, 2008; MENON, SENTHIKUMAR & PACHAIAPPAN, 2010; STAVRACAKIS-PEIXOTO *et al.*, 2011; DIAS *et al.*, 2011; BURKOVSKI, 2013a; STAVRACAKIS-PEIXOTO *et al.*, 2014; SANTOS *et al.*, 2015a).

O sequenciamento da cepa de *C. diphtheriae* NCTC 13129, revelou algumas características marcantes, como a presença de até 13 ilhas de patogenicidade (CERDEÑO-TÁRRAGA *et al.*, 2003; D'AFONSECA *et al.*, 2011), incomum entre as cepas desta espécie (IWAKI *et al.*, 2010). A análise *in silico* forneceu evidências de aquisição recente de fatores de patogenicidade, além da própria toxina, que incluíam sistemas de captação de ferro, metaloproteases, adesinas, sialidases, proteínas fimbriais entre outros (CERDEÑO-TÁRRAGA *et al.*, 2003). Esse achado contrasta claramente com o agente patogênico filogeneticamente mais próximo, *M. tuberculosis*, onde a transferência lateral de genes é extremamente rara nas cepas atualmente circulantes (MATTOS-GUARALDI *et al.*, 2001; MOKROUSOV, 2009; D'AFONSECA *et al.*, 2011).

Diversos trabalhos vêm ressaltando que a expressão de fatores de virulência, nas mais variadas espécies bacterianas, está relacionada com a aquisição de genes por transferência horizontal, geralmente localizados nas ilhas de patogenicidade. Os genes que codificam as hemolisinas são passíveis de transferência, conforme já apontado por trabalhos envolvendo, principalmente, espécies dos gêneros *Escherichia*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Streptococcus*, entre outros (SMITH & HALLS, 1967; HACKER *et al.*, 1990; BAASKE, *et al.*, 2016; AHN *et al.*, 2016; ALI *et al.*, 2016; LECLERCQ *et al.*, 2016).

Smith e Halls (1967) foram os pioneiros na identificação da natureza transmissível de genes entre enterobactérias, dentre eles o de  $\alpha$ -hemolisina (*HlyA*). Posteriormente, a

transferência foi descrita também para *Proteus morganii* (EMODY & TOTH, 2000). Hacker e colaboradores (1990) observaram que havia relação entre os genes que codificam fatores de colonização, permitindo às *E. coli* uropatogênicas (UPECs) aderirem às células das vias urinárias, e o gene responsável pela hemolisina (HACKER *et al.*, 1990).

Poucos trabalhos relacionam cepas de *C. diphtheriae* e sua atividade hemolítica quando inoculadas em meios de cultivo contendo sangue de carneiro em sua composição. De acordo com estes estudos, o biotipo *gravis* e *mitis* são considerados hemolíticos, embora algumas cepas apresentem uma hemólise discreta. Por outro lado, o biotipo *intermedius* é considerado não hemolítico. As propriedades hemolíticas do biotipo *belfanti* não estão bem estabelecidas (SANGAL *et al.*, 2014; TRABULSI & ALTERTHUM, 2015). No entanto, a literatura relacionando a influência da produção desta citotoxina na virulência de *C. diphtheriae*, é escassa.

Diante da possibilidade da transferência horizontal de genes e da evidência de atividade hemolítica em cepas de *C. diphtheriae*, associado ao relevante papel da hemolisina na virulência de diversas espécies bacterianas, o presente trabalho se propôs a investigar a presença de genes que codificam este fator de virulência e seus efeitos na patogenicidade do bacilo diftérico. Partindo-se deste propósito, foi realizada, primeiramente *in silico*, a busca por possíveis sequências gênicas codificadoras de hemolisinas hipotéticas, presentes no genoma de cepas de *C. diphtheriae* já sequenciadas e anotadas no banco de dados do NCBI. Na oportunidade foi identificada a sequência de uma metiltransferase com atividade de citotoxina/hemolisina, designada DIP1180, na cepa de *C. diphtheriae* NCTC 13129. Enquanto que para as demais cepas a anotação referente ao gene investigado tratava-se de uma proteína hipotética.

Através do aplicativo *online* BLAST, foi possível comparar, *in silico*, a sequência oligonucleotídica da DIP1180 com os genomas das demais cepas de *C. diphtheriae* sequenciadas. Desta forma, 14 alinhamentos significativos foram identificados, todos correspondentes às cepas de *C. diphtheriae*, com alto grau de conservação e homologia superior a 98%. O programa identificou estes genes como codificadores de uma citotoxina hipotética com atividade de hemolisina, sugerindo que sejam conservados nesta espécie.

Após esta constatação, realizou-se a predição do modelo tridimensional da proteína DIP1180, utilizando o servidor *online* I-TASSER. A comparação da sequência proteica investigada identificou domínios conservados, que garantem a funcionalidade da proteína analisada quando comparada com as sequências de outras espécies depositadas em seu banco de dados. Esse levantamento gerou cinco modelos, onde a proteína com melhor valor de *c-*

*score* (1,62) foi a selecionada. Em seguida, utilizando o servidor *Phyre*<sup>2</sup>, comparou-se a estrutura tridimensional determinada para a DIP1180 com as estruturas de outras espécies bacterianas, no intuito de encontrar a mais semelhante e entender melhor sobre os mecanismos de ação que poderiam estar relacionados com esta citotoxina. Com 100% de confiança e 97% de cobertura, a toxina DIP1180 apresentou similaridades com uma proteína hipotética encontrada em *Streptococcus thermophilus*. De forma semelhante, comparou-se as sequências proteicas das cepas INCA 814 e HC01, obtendo a mesma espécie bacteriana, com a mesma cobertura de confiança, como resultado. Além de, também, apresentar similaridades, com confiança superior a 90%, com hemolisinas hipotéticas encontradas em outras espécies do gênero *Streptococcus* spp. O banco de dados de proteínas Pfam destacou dois principais domínios conservados na citotoxina analisada: o domínio das metiltransferases dependentes de SAM de classe I - onde as enzimas podem ser classificadas por diferentes especificidades de substrato e/ou átomos-alvo para a metilação -, e o domínio S4 - relacionado a proteína de ligação ao ribossomo, que tem como função auxiliar na montagem do 16s rRNA, organizando e estabilizando a estrutura terciária do rRNA, além de reprimir a tradução -, ambos também encontrados nas proteínas com alta similaridade estrutural.

Após a verificação *in silico*, a investigação da presença do gene *dip1180* nas cepas de *C. diphtheriae*, foi realizada, *in vitro*, pela PCR convencional, utilizando oligonucleotídeos iniciadores, baseados na sequência de DNA para o gene alvo. Independente da presença do gene *tox*, todas as cepas estudadas apresentaram produtos de amplificação com 720 pb, correspondentes ao gene investigado. Entre as cepas, cujos genomas não foram sequenciados, foi observada a presença do gene em questão na cepa HC06, biotipo *gravis*. No entanto, não ocorreu a amplificação para a cepa MA 136, biotipo *intermedius*, corroborando com a literatura existente que afirma que cepas deste biotipo não são hemolíticas (SANGAL *et al.*, 2014).

Pouco se sabe sobre a ação das hemolisinas em *C. diphtheriae* e em *Streptococcus thermophilus*, no entanto, muitos estudos já foram realizados em outros microrganismos, sendo o mais estudado em *Escherichia coli*. Smith (1963) foi o primeiro a diferenciar as hemolisinas de *E. coli*, classificando-as como  $\alpha$  ou  $\beta$ -hemolisinas. Um terceiro tipo,  $\gamma$ -hemolisina, foi descrito por Walton e Smith, em 1969. A  $\alpha$ -hemolisina é a mais estudada e tem sido caracterizada bioquímica e geneticamente (CATANI, 1999).

As *E. coli* uropatogênicas produzem e secretam a hemolisina HlyA, pertencente a família RTX, como principal fator de virulência. Esta compreende um conjunto de genes (*HlyCABD*) que são expressos em unidade (operon), onde os genes *hlyC* e *hlyA* direcionam a

síntese de uma proteína ativa, enquanto *hlyB* e *hlyD* determinam a sua secreção (WAGNER, VOGEL & GOEBEL, 1983). Assim, a hemolisina é sintetizada como uma pré-hemolisina (proHlyA), não tóxica, que é ativada pela acetiltransferase HlyC de ácidos graxos co-sintetizada com a pré-hemolisina (GENTSCHEV, DIETRICH & GOEBEL, 2002). A HlyA utiliza, principalmente, o sistema de secreção de tipo I, composto por HlyB, HlyD e TolC, sendo os dois primeiros componentes específicos do sistema de transporte de HlyA, enquanto o terceiro trata-se de uma proteína multifuncional localizada na membrana externa da bactéria (WAGNER, VOGEL & GOEBEL, 1983; WANDERSMAN & DELEPELAIRE, 1990; KORONAKIS & HUGHES, 1993). A porção C-terminal carrega uma proteína de secreção sinal (HlyAs) que é reconhecida pelo translocador HlyB/HlyD/TolC promovendo a secreção direta no meio extracelular sem a formação de intermediários (KORONAKIS, KORONAKIS & HUGHES, 1989; GENTSCHEV, 1996). Corroborando com esses dados, a análise *in silico* da predição das porções transmembrana, através do programa TMHMM, indicou que a hemolisina presente na cepa de *C. diphtheriae* NCTC 13129 não apresenta regiões transmembranares, sugerindo que a proteína seja secretada pelas células bacterianas.

A HlyA tem como alvo células endoteliais e células do sistema imunológico, particularmente granulócitos e monócitos (BENZ *et al.*, 1989). As  $\alpha$ -hemolisinas não são internalizadas pelas células alvo, mas em concentrações elevadas atuam como citolisinas formadoras de pequenos poros, cátion-seletivos e heterogêneos, na membrana promovendo a lise celular (MOAYERI *et al.*, 1994; SCHMIDT, BEUTIN & KARCH, 1995). Ostalaza e colaboradores (1993) relatam que a  $\alpha$ -hemolisina também induz o vazamento de grandes vesículas unilamelares, resultando em um efeito parecido com a ação de detergentes, que rompem a bicamada lipídica celular. Além disso, sabe-se que é capaz de alterar a sinalização de cálcio e promover a liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e IL-8) em células tubulares renais (UHLEN, 2000).

A atividade da  $\alpha$ -hemolisina de *E. coli* não está restrita a lisar células-alvo. Concentrações não-líticas modulam a função normal de vários tipos de células do hospedeiro, aumentando a probabilidade da bactéria de se estabelecer e causar infecções (CATANI, 1999). O sistema de secreção da HlyA pode ser utilizado para secretar proteínas heterólogas, de vários tamanhos e origens, covalentemente ligadas ao seu C-terminal (HlyAs), que tem sido alvo de diversos estudos imunológicos, incluindo confecção de vacinas, já que é fracamente imunogênico (KORONAKIS, KORONAKIS & HUGHES, 1989; DIETRICH, VIRET & GENTSCHEV, 2003).

A relação entre produção de  $\alpha$ -hemolisinas e infecções diversas incluindo as do trato urinário (ITU), peritonites, apendicites, septicemia e meningite neonatal (HUGHES *et al.*, 1983) foi demonstrada para diversos patógenos, além das *E. coli* aonde foi observada atividade leucotóxica - lisando fagócitos e leucócitos -, citotóxica e citolítica em células endoteliais (GRIMMINGER *et al.*, 1990), e em células tubulares do epitélio renal (MOBLEY, 1990).

A aquisição de cepas mutantes através de técnicas, como deleção ou truncamento de genes alvo, tem sido amplamente utilizada na análise e caracterização funcional de diferentes proteínas (De LIMA *et al.*, 2012; ANTUNES *et al.*, 2015; SANTOS, 2015a). Com o intuito de avaliar funcionalmente a presença da hemolisina foi confeccionada uma cepa mutante, pelo truncamento do gene *dip1180*, a partir da cepa de *C. diphtheriae* NCTC 13129. Os resultados dos testes de caracterização fenotípica e genotípica confirmaram tratar-se da mesma espécie e biotipo que a cepa selvagem.

Estudos de interação celular demonstraram que cepas de *C. diphtheriae*, produtoras e não produtoras de TD, são capazes de interagir com células epiteliais respiratórias de linhagem diversas (HIRATA JR *et al.*, 2002; BERTUCCINI, BALDASSARRI & von HUNOLSTEIN, 2004; HIRATA JR *et al.*, 2004; SANTOS, 2015; STAVRACAKIS-PEIXOTO *et al.*, 2016). No presente trabalho, foi observado que todas as cepas analisadas foram capazes de aderir às células HEp-2 após três horas de interação, com percentuais de associação elevados.

Em contraste com os resultados encontrados por Harcker e colaboradores (1990), que correlacionaram genes que codificam para expressão de hemolisina e genes que codificam para fatores de colonização, não foi possível, nesse trabalho, estabelecer uma relação entre a presença do gene para hemolisina e padrões de aderência e viabilidade intracelular, uma vez que tanto cepas hemolíticas quanto não hemolíticas foram capazes de aderir e permanecer viáveis no interior de células HEP-2.

Em cepas de *C. diphtheriae* não produtoras de TD, os percentuais de associação mostraram-se significativamente mais elevados em relação às cepas produtoras, indicando que a expressão do gene *tox* não é relevante no processo de aderência de *C. diphtheriae* a este tipo celular. Esses resultados corroboram com a literatura existente (HIRATA JR *et al.*, 2002; BERTUCCINI, BALDASSARRI & von HUNOLSTEIN, 2004; HIRATA JR *et al.*, 2004).

Dentre as cepas não produtoras da TD, as cepas HC02 e INCA 814 apresentaram percentuais de viabilidade intracelular mais elevados do que as demais, incluindo aquelas isoladas de infecções invasivas. Considerando o sítio original de isolamento das cepas

(sangue de paciente com endocardite), esse fato parece estar associado à interação do microrganismo com receptores celulares, expressos no endotélio vascular e válvula cardíaca, que não são encontrados em células HEp-2. Foi possível observar que as cepas de *C. diphtheriae*, que apresentaram alto percentual de associação, mostraram-se menos invasivas.

Com o intuito de compreender melhor a atividade hemolítica, examinou-se o comportamento das cepas de *C. diphtheriae* quando submetidas a crescimento em ágar acrescido de 5% sangue de carneiro, em condições de aerofilia e microaerofilia. Foi possível verificar que todas as cepas, clínicas e padrão, de *C. diphtheriae* avaliadas foram capazes de produzir hemólise, exceto a cepa MA 136. Esses dados estão de acordo com a literatura, tendo em vista que, cepas pertencentes aos biotipos *mitis* e *gravis* são consideradas hemolíticas ou fracamente hemolíticas quando crescidas em ágar sangue padrão em condições de aerofilia (TRABULSI & ALTERTHUM, 2015).

A recombinação homóloga do gene *dip1180*, a partir da cepa selvagem NCTC 13129, gerou a cepa LDCIC-A1, que não foi capaz de produzir hemólise em hemácias de carneiro quando cultivada em condições de aerobiose ou em microaerofilia, sugerindo que esta atividade é dependente da expressão do gene analisado.

De acordo com dados da literatura, cepas de *E. coli*, quando submetidas a crescimento em ágar sangue sob microaerofilia, tendem a expressar um padrão hemolítico mais intenso, ou até mesmo aquelas que não apresentavam atividade hemolítica, passam a apresentar algum padrão de hemólise em microaerofilia. Segundo Murase e colaboradores (2012) algumas estirpes de *E. coli* apresentam a hemolisina do tipo HlyE, que em condições aeróbias não promovem hemólise, no entanto, em condições limitantes de oxigênio expressam o gene *hlye*. Os resultados obtidos indicam que as cepas de *C. diphtheriae*, apesar de serem hemolíticas em condições de aerobiose, tem essa expressão estimulada em condições de microaerofilia, sugerindo que trata-se de um gene com propriedades semelhantes ao da hemolisina tipo HlyE, encontrada em *E. coli*.

A cepa MA 136, por ser do biotipo *intermedius*, apresentou comportamento não hemolítico nas condições estudadas, de acordo com a literatura existente (SANGAL *et al.*, 2014; TRABULSI & ALTERTHUM, 2015), além de não ter sido observada a amplificação do gene *dip1180* na reação de PCR, sugerindo tratar-se de uma cepa desprovida de hemolisina (MURASE *et al.*, 2012).

Cepas de *C. diphtheriae* não produtoras de TD (ATCC 27010, INCA 814, HC03, HC04, 402) apresentaram atividade hemolítica intensa, superior a hemólise observada em algumas cepas produtoras de TD (ATCC 27012, CDC E-8392, NCTC 13129). Contudo, não

foi possível estabelecer uma correlação entre a produção de hemólise e a presença do gene *tox*, nas cepas estudadas.

Cepas de *C. diphtheriae* são capazes de aderir com intensidades variadas às superfícies abióticas do vidro e do poliestireno. Participam destes processos, interações físico-químicas, como carga e hidrofobicidade, e interações moleculares específicas, por meio de adesinas fimbriais e não-fimbriais, (MATTOS-GUARALDI e FORMIGA 1991; MATTOS-GUARALDI *et al.*, 2001; COLOMBO *et al.*, 2001; MOREIRA *et al.*, 2003; GOMES *et al.*, 2009). Os biofilmes afetam profundamente a saúde por causarem infecções persistentes e serem altamente resistentes aos antimicrobianos e às defesas do hospedeiro (KIEVIT, 2009). A formação destas estruturas é influenciada por fatores genéticos e ambientais, constituindo uma eficiente estratégia de sobrevivência bacteriana frente às mudanças do ambiente (ELKINS *et al.*, 1999). Nestas condições, há a expressão diferenciada de muitos genes, particularmente aqueles envolvidos na resistência ao estresse oxidativo, na produção do exopolissacarídeo e no metabolismo bacteriano (KIM *et al.*, 2006).

Cepas de *C. diphtheriae*, produtoras e não produtoras de TD, foram avaliadas, quantitativamente, quanto a capacidade de formar biofilme em poliestireno. Estudos anteriores demonstraram que independente da produção de toxina, da capacidade de fermentação de sacarose e da habilidade de aderir ao vidro, todas as cepas de *C. diphtheriae* são capazes de aderirem ao poliestireno (MATTOS-GUARALDI *et al.*, 2001). A maioria das cepas foi capaz de aderir ao substrato em diferentes intensidades. Interessantemente, as cepas não carreadoras do gene *tox* apresentaram valores maiores de absorvância, indicando maior formação de biofilme, com exceção da cepa MA 136. Esses dados corroboram com os da literatura que, avaliando a formação de biofilme em poliestireno em diferentes microrganismos, indicaram cepas oriundas de infecções invasivas tendem a formar biofilme em maior intensidade nesta superfície abiótica (SANDOE *et al.*, 2003; JAIN & AGARWAL, 2009; REITER *et al.*, 2011; GOMES, 2012).

A fim de melhor descrever o papel do gene de hemolisina na virulência de *C. diphtheriae*, a mutante foi testada quanto às habilidades de aderência e formação de biofilme em diferentes superfícies abióticas. Em vidro, o truncamento do gene *dip1180* promoveu a redução do potencial de produção do padrão de aderência tipo II na cepa mutante (LDCIC-A1), corroborando com a hipótese de que a hemolisina influencia nos mecanismos de formação de biofilme em cepas de *C. diphtheriae*. Esse achado vem ao encontro daqueles obtidos na análise quantitativa de biofilme, em poliestireno e em vidro, onde tanto a cepa selvagem NCTC 13129, quanto a cepa mutante LDCIC-A1, foram capazes de aderir ao



substrato com intensidades diferentes. O truncamento do gene *dip1180* promoveu redução significativa da aderência, em ambas superfícies investigadas, em relação à cepa selvagem, corroborando com a hipótese de que este gene favorece a formação de biofilme em cepas de *C. diphtheriae*.

Condições de limitação de ferro também influenciam a virulência de *C. diphtheriae*, incluindo a produção de citotoxina e a expressão de adesinas (MEKALANOS, 1992; MOREIRA *et al.*, 2003). O estudo realizado por Moreira e colaboradores (2003) avaliou a influência do quelante de ferro 2,2-dipiridil sobre as propriedades adesivas do *C. diphtheriae*, através do qual verificaram que a cepa 241, perde a capacidade de aderir ao vidro e torna-se capaz de aglutinar hemácias humanas, além de interagir com maior intensidade às células HEp-2.

No presente trabalho, foi avaliada a influência do ferro na capacidade das cepas, selvagem e mutante, de *C. diphtheriae* formarem biofilme, através do cultivo em presença e ausência de quelante de ferro. A observação da expressiva redução de aderência ao vidro por ambas as cepas, sugere que a presença deste íon exerça papel relevante na expressão de adesinas em *C. diphtheriae*, uma vez que foram observadas modificações de propriedades adesivas pelas cepas, produtora e não produtora da proteína DIP1180.

Na tentativa de investigar mais profundamente a possível influência da proteína DIP1180 na infecção e disseminação hematogênica, um modelo experimental *in vivo*, utilizando camundongos da espécie SW, foi desenvolvido com base em métodos descritos anteriormente para *S. aureus* (BREMELL *et al.*, 1991), *S. agalactiae* (TISSI *et al.*, 1990; PULITI *et al.*, 2000) e *C. diphtheriae* (PULITI *et al.*, 2006; DIAS *et al.*, 2011). Camundongos injetados, por via intravenosa, com as cepas *C. diphtheriae* NCTC 13129 e a respectiva cepa mutante LDCIC-A1 foram acompanhados por 30 dias. Os resultados obtidos demonstraram maior potencial artritogênico para a cepa selvagem. Dias e colaboradores (2011) mostraram que a capacidade de causar artrite em camundongos foi específica de cada cepa e que a TD não interferiu no processo. Quando duas cepas homólogas de *C. diphtheriae*, ATCC 27010 (atoxigênica) e ATCC 27012 (toxigênica), foram testadas, 10% dos animais desenvolveram lesões articulares para a cepa atoxigênica ATCC 27010 entretanto, sinais de artrite não foram observados na cepa toxigênica ATCC 27012.

Infecções causadas pelo *C. diphtheriae* ainda apresentam uma grande relevância em diversas regiões, principalmente devido ao aumento significativo de indivíduos parcialmente imunes à TD, levando a existência de infecções invasivas que vêm complicando o curso

clínico-terapêutico (MATTOS-GUARALDI *et al.*, 2001; DAMASCO *et al.*, 2005; PIMENTA *et al.*, 2006).

Por fim, as questões abordadas nesta dissertação, ressaltam que os mecanismos de patogenicidade do *C. diphtheriae*, independentes da capacidade de produção de toxina, não devem ser subestimados, especialmente quando este microrganismo estiver envolvido em quadros infecciosos atípicos e/ou invasivos. Neste sentido, estudos adicionais buscando o melhor entendimento da atuação desta hemolisina e seu papel na aderência e formação de biofilme configuram-se relevantes para a compreensão do processo infeccioso desencadeado pelo *C. diphtheriae*. Além disso, o crescente número de indivíduos suscetíveis à difteria, a emergência de cepas não-toxigênicas como agentes causadores de infecções invasivas e a recente documentação de infecção relacionada a cateter desencadeada por esta espécie (GOMES *et al.*, 2009), enfatizam a necessidade de mais estudos relacionados aos fatores de virulência, além da TD, apresentados por este patógeno. Esforços vêm sendo direcionados à pesquisa de novos possíveis candidatos a fatores de virulência, tais aspectos constituem estratégias em andamento, em projetos conjuntos com pesquisadores de diferentes Instituições de Pesquisa no Brasil e no exterior.

## CONCLUSÕES

O estudo realizado, embora faça parte de um esforço pioneiro na investigação da correlação entre sequências gênicas codificantes de fatores de virulência, que não a TD, e outros aspectos da patogenicidade, bem como as alterações das propriedades adesivas de *C. diphtheriae* induzidas por condições ambientais, permitiu o registro da seguinte coorte de constatações:

- A investigação dos mecanismos relacionados à adesividade e invasividade de corinebactérias permanece uma grande necessidade, à medida que cresce o número de relatos de cepas capazes de aderir a substratos abióticos diversos e invadir células de mamíferos, especialmente quando tratamos de cepas não produtoras de TD, conforme tivemos a oportunidade de observar neste trabalho;

- A sequência codificante da hemolisina (gene *dip1180*) de *C. diphtheriae*, inicialmente descrita para a cepa padrão NCTC 13129, pode ser encontrada com elevada similaridade em outras cepas desta espécie, independentemente de biotipo, sítio de isolamento, evolução clínica do hospedeiro e presença do gene *tox*;

- A estrutura tridimensional da proteína DIP1180 mostrou-se altamente similar a de hemolisinas de espécies do gênero *Streptococcus* reiterando sua possível atividade de hemolítica, havendo dois domínios conservados, domínio metiltransferase e domínio ligante de ribossomo;

- A construção de cepas mutantes por recombinação homóloga, promovendo a inativação do gene *dip1180*, mostrou-se uma ferramenta eficaz e de ampla aplicação para a investigação da influência desta sequência sobre atributos de virulência de *C. diphtheriae*;

- Através do truncamento do gene *dip1180* foi possível demonstrar a dependência da atividade hemolítica em relação à expressão deste gene em *C. diphtheriae*;

- Embora não haja dependência entre a expressão do gene *dip1180* e a do gene *tox*, neste trabalho constatamos que as cepas não produtoras de TD apresentaram atividade hemolítica mais intensa quando comparadas com as cepas produtoras;

- A condição de microaerofilia pareceu favorecer a hemólise para as cepas produtoras de hemolisina, entretanto não foi capaz de influenciar as cepas não hemolíticas, incluindo a cepa mutante LDCIC-A1;

- À exceção das cepas padrão PW8 e MA 136, as cepas testadas foram capazes de aderir e formar biofilme, com diferentes intensidades ao poliestireno, podendo persistir na forma de contaminante em utensílios e materiais cirúrgicos favorecendo sua disseminação;

- A redução na capacidade de aderir ao poliestireno e ao vidro, observada após o truncamento do gene *dip1180* demonstrou a influência deste gene sobre tal atributo corroborando com a hipótese deste pertencer à mesma ilha de patogenicidade que aqueles que codificam para a produção de biofilme;

- A privação de ferro no meio de cultivo foi capaz de promover uma expressiva redução na produção de biofilme sugerindo que este íon exerce papel relevante para a aderência de *C. diphtheriae* ;

- Os dados obtidos na caracterização funcional da seqüência *dip1180* indicam sua contribuição para a virulência de cepas de *C. diphtheriae*, sobretudo aquelas não portadoras do gene *tox* que, por muito tempo, foram negligenciadas e vem sendo relacionadas com frequência crescente a infecções invasivas, especialmente nos ambientes hospitalares;

- A análise *in vivo* da influência do gene *dip1180* sobre a atividade artrítogênica de *C. diphtheriae*, demonstrou uma redução perceptível da gravidade das lesões apresentadas pelos camundongos infectados com a cepa mutante;

## REFERÊNCIAS

AHN, S., CHUNG, H.Y., LIM, S., KIM, K., KIM, S., NA, E.J., CAETANO-ANOLLES, K., LEE, J.H., RYU, S., CHOI, S.H. e KIM, H. *Complete genome of Vibrio paraheamolyticus FORC014 isolated from the toothfish. Gut Pathogens*, v.17, n. 8, p. 59-64. 2016.

ALEXANDER, D. *Splenic abscess caused by Corynebacterium diphtheriae. Clinical Pediatrics*, v. 23, n. 10, p. 591-592. 1984.

ALI, S.G., ANSARI, M.A., KHAN, H.M., JALAL, M., MAHDI, A.A. e CAMEOTRA, S.S. *Crataeva nurvala nanoparticles inhibit virulence factors and biofilm formation in clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa. Journal Basic Microbiology*, v. 57, n. 3, p. 193-203. 2016.

ALTSCHUL S.F., MADDEN T.L., SCHÄFFER A.A., ZHANG J., ZHANG Z., MILLER W. e LIPMAN D.J. *Gapped BLAST and PSI-BLAST: new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Research*, v. 25, n. 17, p. 3389-3402. 1997.

AMON, J., LÜDKE, A., TITGEMEYER, F. e BURKOVSKI, A. *General and regulatory proteolysis in corynebacteria. In Corynebacteria: genomics and molecular biology*, pp. 295-311. Edited by A. Burkovski. Norfolk, UK: Caister Academic Press. 2008.

ANDO, M., MANABE, Y.C., CONVERSE, P.J., MIYAZAKI, E., HARRISON, R., MURPHY, J.R. e BISHAI, W.R. *Characterization of the role of the divalent metal ion-dependent transcriptional repressor MntR in the virulence of Staphylococcus aureus. Infection and Immunity*, v. 71, n. 5, p. 2584-2590. 2003.

ANTUNES, C.A., SANTOS, L.S., HACKER, E., KÖHLER, S., BÖSL, K., OTT, L., DE LUNA, MD., HIRATA, R.JR., AZEVEDO, V.A., MATTOS-GUARALDI, A.L. e BURKOVSKI, A. *Characterization of DIP0733, a multi-functional virulence factor of Corynebacterium diphtheriae. Microbiology*, v. 161, p. 639-647. 2015.

BAASKE, R., RICHTER, M., MÖLLER, N., ZIESEMER, S., EIFFLER, I., MÜLLER, C. e HILDEBRANDT, J.P. *ATP Release from Human Airway Epithelial Cells Exposed to Staphylococcus aureus Alpha-Toxin. Toxins*, v. 8, n. 12, p. 365 -377. 2016.

BARAKETT, V., MOREL, G., LESAGE, D. e PETIT, J.C. *Septic arthritis due to a nontoxigenic strain of Corynebacterium diphtheriae subspecies mitis. Clinical Infectious Diseases*, v. 17, n. 3, p. 520-521.1993.

BASEMAN, J.B., PAPPENHEIMER, A. M., GILL, JR., D. M. e HARPER A.A. *Action of diphtheria toxin in the guinea pig. Journal of Experimental Medicine*, v. 132, n. 6, p. 1138-1152. 1970.

BELKO, J., WESSEL, D.L. e MALLEY, R. *Endocarditis caused by Corynebacterium diphtheriae: case report and review of the literature. Pediatric Infectious Disease Journal*, v.19, n. 2, p. 159-163. 2000.

BENZ, R., SCHMID, A., WAGNER, W. e GOEBEL, W. *Pore formation by the Escherichia coli hemolysin: evidence for an association-dissociation equilibrium of the pore-forming aggregates.* **Infection and Immunity**, v. 57, n. 3, p. 887-895. 1989.

BERTUCCINI, L., BALDASSARRI, L. e VON HUNOLSTEIN, C. *Internalization of non-toxicogenic Corynebacterium diphtheriae by cultured human respiratory epithelial cells.* **Microbial Pathogenesis**, v. 37, n. 3, p. 111-118. 2004.

BIOMERIEUX. APIWEB - Disponível em:  
<https://apiweb.biomerieux.com/servlet/authenticate?action=prepareLogin>. Acesso em: 09/06/2016. 2016b.

BIOMERIEUX. *Biochemical information for identification software*. Ref. 41207. Version B. Rev. 10/2000. **BioMerieux**. 2000.

BIOMERIEUX. Technical Bulletin Manual Industrial 510722-4. Rev.1002. BioMerieux. Disponível em: <http://www.biomerieux.com>>. Acesso em: 09/06/2016. 2016a.

BIOMERIEUX. Vitek. Manual de referencia de microbiologia. 510759-1PT-A Ver.8. **BioMerieux**. 2003.

BLAST-N. Disponível em < <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> >. Acesso em: 17 de abril de 2013.

BRASIL, Ministério da Saúde. Disponível em  
<http://www.brasil.gov.br/saude/2016/01/calendario-de-vacinacao-atualizado-ja-esta-em-vigor>. Acesso em: 8 de novembro de 2016.

BREMELL, T., LANGE, S., YACCOUB, A., RYDÉN, C. e TARKOWSKI, A. *Experimental Staphylococcus aureus arthritis in mice.* **Infect Immun**, v. 59, n. 8, p. 2615–2623. 1991.

BROWN, E.L., XUE, Q., JIANG, Z., XU, Y. e DUPONT. H.L. *Pretreatment of epithelial cells with rifaximin alters bacterial attachment and internalization profiles.* **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 1, p. 388-396. 2010.

BURKOVSKI, A. *Diphtheria and its etiological agents.* In *Corynebacterium diphtheriae and Related Toxigenic Species* 1-14. Edited by A. Burkovski. Dordrecht: Springer Netherlands. 2014.

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

BURKOVSKI, A. *Diphtheria.* In *The Prokaryotes*, 4th ed., vol. 5, pp. 237–246. Edited by Rosenberg, E., DeLong, E.F., Thompson, F., Lory, S., e Stackebrandt, E. New York: Springer. 2013a.

CAMELLO, T.C.F., MATTOS-GUARALDI, A.L., FORMIGA, L.C.D. e MARQUES, E.A. *Nondiphtherial Corynebacterium species isolated from clinical specimens of patients in a university hospital, Rio de Janeiro, Brazil. Brazilian Journal of Microbiology*, v. 34, n. 1, p. 39-44. 2003.

CATANI, F.C. Purificação e caracterização de enterohemolisina produzida por *Escherichia coli* enteropatogênica. 1999. 118f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Estadual de Campinas, SP, 30/07/1999.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Health Information for International Travel. Atlanta: U.S. 2010.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *Travelers' Health - Yellow Book - Prevention of Specific Infectious Diseases – Diphtheria*. Disponível no site: <<http://wwwn.cdc.gov/travel/yellowBookCh4-Diphtheria.aspx>>. Acessado em 29 de dezembro de 2014.

CERDEÑO-TARRAGA, A.M., EFSTRATIOU, A., DOVER, L.G., HOLDEN, M.T., PALLEN, M., BENTLEY, S.D., BESRA, G.S., CHURCHER, C., JAMES, K.D., De ZOYSA, A., CHILLINGWORTH, T., CRONIN, A., DOWD, L., FELTWELL, T., HAMLIN, N., HOLROYD, S., JAGELS, K., MOULE, S., QUAIL, M.A., RABBINOWITSCH, E., RUTHERFORD, K.M., THOMSON, N.R., UNWIN, L., WHITEHEAD, S., BARRELL, B.G. e PARHILL, J. *The complete genome sequence and analysis of Corynebacterium diphtheria NCTC13129. Nucleic Acids Research*, v. 31, n. 22, p. 6516– 6523. 2003.

CHAMBERS, F.G., KOSHY, S.S., SAIDI, R.F., CLARK, D.P., MOORE, R.D. e SEARS, C.L. *Bacteroides fragilis* toxin exhibits polar activity on monolayers of human intestinal epithelial cells (T84 cells) in vitro. *Infection and Immunity*, v. 65, n. 9, p. 3561-3570. 1997.

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

COLLIER, R.J. *Understanding the mode of action of diphtheria toxin: a perspective on progress during the 20th century. Toxicon*, v. 39, n. 11, p. 1793-1803. 2001.

COLOMBO, A.V., HIRATA, JR.R., ROCHA-DE-SOUZA, C.M., MONTEIRO-LEAL, L.H., PREVIATO, J.O., FORMIGA, L.C.D., ANDRADE, A.F.B. e MATTOS-GUARALDI, A.L. *Corynebacterium diphtheriae* surface protein as adhesion to human erythrocytes. *FEMS Microbiology Letters*, v. 197, n. 2, p. 235-239. 2001.

COYLE, B. e LIPSKY, B.A. *Coryneform bacteria in infectious diseases: clinical and laboratory aspects. Journal of Clinical Microbiology*, v. 3, n.3, p. 227-246. 1990.

D'AFONSECA, V., SOARES, SC., ALI, A., SANTOS, A.R., PINTO, A.C., MAGALHÃES, A.A.C., FARIA, C.J., BARBOSA, E., GUIMARÃES, L.C., ESLABÃO, M., ALMEIDA, S.S., ABREU, V.A.C., ZERLOTINI, A., CARNEIRO, A.R., CERDEIRA, L.T., RAMOS, R.T.J., HIRATA, JR. R., MATTOS-GUARALDI, A.L., TROST, E., TAUCH, A., SILVA, A., SCHNEIDER, M.P., MIYOSHI, A. e AZEVEDO, V. *Reannotation of the Corynebacterium*

*diphtheriae* NCTC13129 genome as a new approach to studying gene targets connected to virulence and pathogenicity in diphtheria. **Bioinformatics**, v. 4, p. 1-13. 2011.

DAMADE, R., POUCHOT, J., DELACROIX, I., BOUSSOUGANT, Y. e VINCENEUX, P. *Septic arthritis due to Corynebacterium diphtheriae*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 16, n. 3, p. 446- 447. 1993.

DAMASCO, P.V., HIRATA, R. e MATTOS-GUARALDI, A.L. Difteria no Brasil e no mundo: Aspectos sobre o cenário atual. **Revista Imunizações**, v. 45, n. 6, p. 1-19. 2011.

DAMASCO, P.V., PIMENTA, F.P., FILARDY, A.A., BRITO, S.M., ANDRADE, A.F., LOPES, G.S., HIRATA, R. JR. e MATTOS-GUARALDI, A.L. *Prevalence of IgG diphtheria antitoxin in blood donors in Rio de Janeiro*. **Epidemiology & infection**, v. 133, n. 5, p. 911-914. 2005.

De LIMA, C.D., CALEGARI-SILVA, T.C., PEREIRA, R.M., SANTOS, A.S., LOPES, U.G., PLOTKOWSKI, M.C e SALIBA, A.M. *ExoU activates NK-kB and increases IL-8/KC secretion during Pseudomonas aeruginosa infection*. **PLoS One**, v. 7, n. 7, p. 21- 30. 2012.

De SOUSA-D'AURIA, C., KACEM, R., PUECH, V., TROPIS, M., LEBLON, G., HOUSSIN, C. e DAFFE, M. *New insights into the biogenesis of the cell envelope of corynebacteria: identification and functional characterization of five new mycoloyltransferase genes in Corynebacterium glutamicum*. **FEMS microbiology letters**, v. 224, n. 1, p. 35-44. 2003.

De ZOYSA, A., EFSTRATIOU, A., GEORGE, R.C., JAHKOLA, M., VUOPIO-VARKILA, J., DESHEVOI, S., TSENEVA, G. e RIKUSHIN, Y. *Molecular epidemiology of Corynebacterium diphtheriae from northwestern Russia and surrounding countries studied by using ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis*. **Journal Clinical Microbiology**, v. 33, n. 5, p. 1080-1083. 1995.

De ZOYSA, A., EFSTRATIOU, A. e HAWKEY, P.M. *Molecular Characterization of Diphtheria Toxin Repressor (dtxR) Genes Present in Nontoxicogenic Corynebacterium diphtheriae Strains Isolated in the United Kingdom*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 223-228. 2005.

De ZOYSA, A., EFSTRATIOU, A., MANN, G., HARRISON, TG. e NORMAN, K. *Development, Validation and Implementation of a Quadruplex Real-Time PCR Assay for Identification of Potentially Toxicogenic Corynebacteria*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 65, n. 1, p. 1521-1527. 2016.

DEACOCK, S.J., STEWARD, K.A. e CARNE, H.R. *The role of adherence in determining the site of infection by Corynebacterium diphtheriae*. **Journal of Higiene**, v. 90, n. 3, p. 415-424. 1983.

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



DIETRICH, G., VIRET, J.F. e GENTSCHIEV, I. *Haemolysin A and listeriolysin--two vaccine delivery tools for the induction of cell-mediated immunity. **International Journal for Parasitology***, v. 33, n. 5-6, p. 495-505. 2003.

DITTMANN, S., WHARTON, M., VITEK, C., CIOTTI, M., GALAZKA, A., GUICHARD, S., HARDY, I., KARTOGLU, U., KOYAMA, S., KREYSLER, J., MARTIN, B., MERCER, D., RØNNE, T., ROURE, C., STEINGLASS, R., STREBEL, P., SUTTER, R. e TROSTLE, M. *Successful control of epidemic diphtheria in the State of the former Union of Soviet Socialist Republics: lessons learned. **Journal of Infectious Diseases***, v. 181, n. 1, p. 10-22. 2000.

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

DRAMSI, S., TRIEU-CUOT, P. e BIERNE, H. *Sorting sortases: a nomenclature proposal for the various sortases of Gram-positive bacteria. **Research in microbiology***, v. 156, n. 3, p. 289-297. 2005.

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

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

EDWARDS, B., HUNT, A.C. e HOSKISSON, P.A. *Recent cases of non toxigenic Corynebacterium diphtheriae in Scotland: Justification for continued surveillance. **Journal of Medical Microbiology***, v. 60, n. 4, p. 561-562. 2011.

EFSTRATIOU, A., ENGLER, K., DAWES, C. e SESARDIC, D. *Comparison of phenotypic and genotypic methods for detection of diphtheriae toxin among isolates of pathogenic corynebacteria. **Journal of Clinical Microbiology***, v. 36, n. 11, p. 3173-3177. 1998.

EIGNER, U., SCHMID, A., WILD, U., BERTSCH, D. e FAHR, A.M. *Analysis of the comparative workflow and performance characteristics of the VITEK 2 and Phoenix systems. **Journal of Clinical Microbiology***, v. 43, n. 8, p. 3829-3834. 2005.

ELKINS, J.G., HASSET, D.J., STEWART, P.S., SCHWEIZER, H.P. e MCDERMOTT, T.R. *Protective role of catalase in Pseudomonas aeruginosa biofilm resistance to hydrogen peroxide. **Applied and Environmental Microbiology***, v. 65, n. 10, p. 4594-4600. 1999.

EMODY, L. e TOTH, V. *Proteus virulence: involvement of the pore forming alpha-hemolysin (a short review). **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica***, v. 47, n. 4, p. 457-470. 2000.

ESKOLA, J., LUMIO, J. e VUOPIO-VARKILA, J. *Resurgent diphtheria – are we safe?* **British Medical Bulletin**, v. 54, n. 3, p. 635-645. 1998.

FALKOW, P. *Host-parasite relationships*. In: Ryan KJ (ed.) *Medical Microbiology-An introduction to infectious diseases*. **Appleton and Lange Connecticut**. 141-147. 1994.

FARAJ, S., FRENCH, J.G. e MCAUSLAN, A. *Septic arthritis due to a toxigenic strain of Corynebacterium diphtheriae gravis*. **New Zealand Medical Journal**. v. 116, p. 404. 2003.

FINN, R.D., COGGILL, P., EBERHARDT, R.Y., EDDY, S.R., MISTRY, J., MITCHELL, A.L., POTTER, S.C., PUNTA M., QURESHI, M., SANGRADOR-VEGAS, A., SALAZAR G.A., TATE, J. e BATEMAN, A. *The Pfam protein families database: towards a more sustainable future*. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. 1, p. 279-285. 2016.

FISCHETTI, V. A., PANCHOLI, V. e SCHNEEWIND, O. *Conservation of a hexapeptide sequence in the anchor region of surface proteins from gram-positive cocci*. **Molecular microbiology**, v. 4, n. 9, p. 1603-1605. 1990.

FORMIGA, L.C. *New possibilities for the laboratory diagnosis of diphtheria*. **Brazilian Journal of medical and biology research**, v.18, n. 3, p. 401-402. 1985.

FORMIGA, L.C.D. e MATTOS-GUARALDI, A.L. *Diphtheria: current status and laboratory procedures for diagnosis*. **Revista Brasileira de Patologia Clínica**, v. 29, n. 3, p. 93-96. 1993.

FRANKS, S.E., EBRAHIMI, C., HOLLANDS, A., OKUMURA, C.Y., AROIAN, R.V., NIZET, V. e MCGILLIVRAY, S.M. *Novel role for the yceGH tellurite resistance genes in the pathogenesis of Bacillus anthracis*. **Infection and Immunity**, v. 82, n. 3, p. 1132-1140. 2014.

FUKUDA, T., MATSUMURA, T., ATO, M., HAMASAKI, M., NISHIUCHI, Y., MURAKAMI, Y., MAEDA, Y., YOSHIMORI, T., MATSUMOTO, S., KOBAYASHI, K., KINOSHITA, T. e MORITA, Y.S. *Critical roles for lipomannan and lipoarabinomannan in cell wall integrity of mycobacteria and pathogenesis of tuberculosis*. **MBio**, v. 4, n. 1, p. 472-412. 2013.

FUNKE, G., Von GRAEVENITZ, A., CLARRIDGE, J. e BERNARD, K. *Clinical microbiology of coryneform bacteria*. **Clinical microbiology reviews**, v. 10, n. 1, p. 125-159. 1997.

GAHOI, S., MANDAL, R.S., IVANISENKO, N., SHRIVASTAVA, P., JAIN, S., SINGH, A.K., RAGHUNANDANAN, M.V., KANCHAN, S., TANEJA, B., MANDAL, C., IVANISENKO, V.A., KUMAR, A. e KUMAR, R. *Computational screening for new inhibitors of Mycobacterium tuberculosis mycolyltransferases antigen 85 group of proteins as potential drug targets*. **Journal of biomolecular structure e dynamic**, v. 31, n. 1, p. 30-43. 2013.

GALAZKA, A. *The changing epidemiology of diphtheria in the vaccine era*. **Brazilian Journal of Infectious diseases**, v. 181, n. 1, p. 2-9. 2000.

GALAZKA, A.M. e ROBERTSON, S.E. *Diphtheria: changing patterns in the developing world and the industrialized world*. **European Journal of Epidemiology**, v. 11, n. 1, p. 107-117. 1995.

GEIJTENBEEK, T.B., VAN VLIET, S.J., KOPPEL, E.A., SANCHEZ-HERNANDEZ, M., VANDENBROUCHE-GRAULS, C.M., APPELMELK, B. e VAN KOOYK, Y. *Mycobacteria targeted dc-sign to suppress dendritic cell function*. **Journal of Experimental Medicine**, v. 197, n. 1, p. 7-17. 2003.

GENTSCHEV, I., DIETRICH, G. e GOEBEL, W. *The E. coli alphahemolysin secretion system and its use in vaccine development*. **Trends in Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 39-45. 2002.

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

GIL-SANDE, E., BRUN-OTERO, M., CAMPO-CERECEDO, F., ESTEBAN, E., AGUILAR, L. e GARCÍA-DE-LOMAS, J. *Etiological Misidentification by Routine Biochemical Tests of Bacteremia Caused by Gordonia terrae Infection in the Course of an Episode of Acute Cholecystitis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 7, p. 2645–2647. 2006.

GOMES, D.L., PEIXOTO, R.S., BARBOSA, E.A., NAPOLEÃO, F., SABBADINI, P.S., SANTOS, K.R., MATTOS-GUARALDI, A.L. e HIRATA, R. Jr. *SubMICs of penicillin and erythromycin enhance biofilm formation and hydrophobicity of Corynebacterium diphtheriae strains*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. 5, p. 754-760. 2013.

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

GOMES, D.L.R. *Propriedades adesivas e invasivas de amostras de Corynebacterium diphtheria causadoras de infecções atípicas*. [Tese de Doutorado]. Rio de Janeiro, RJ: Universidade do Estado do Rio de Janeiro. 152f. 2012.

GRIMMINGER, F., WALMRATH, D., BIRKEMEYER, R.G.; BHAKDI, S. e SEEGER, W. *Leukotriene and hidroxyeicosatetraenoic acid generation elicited by low doses of Escherichia coli hemolysin in rabbits lungs*. **Infection and Immunity**, v. 58, N. 8, p. 2659-2663. 1990.

GROVE, D.I., DER-HAROUTIAN, V. e RATCLIFF, R.M. *Aureobacterium masquerading as 'Corynebacterium aquaticum' infection: case report and review of the literature*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 48, n. 10, p. 965-970. 1999.

GURAN, P., MOLLARET, H.H., CHATELAIN, R., GROPMAN, M., PRIGENT, F. e BÉAL, G. *Septic arthritis due to a nontoxigenic diphtheria bacillus*. **Archives françaises de Pédiatrie**, v. 36, n. 9, p. 926-929. [Article in French]. 1979.

- HACKER, E., OTT, L., HASSELT, K., MATTOS-GUARALDI, A.L., TAUCH A. e BURKOVSKI, A. *Colonization of human epithelial cell lines by Corynebacterium ulcerans from human and animal sources. Microbiology*, v. 161, n. 8, p. 1582-1591. 2015.
- HACKER, E., OTT, L., SCHULZE-LUEHRMANN, J., LÜHRMANN, A., WIESMANN, V., WITTENBERG, T. e BURKOVSKI, A. *The killing of macrophages by Corynebacterium ulcerans. Virulence*, v. 7, n. 1, p. 45-55. 2016.
- HACKER, J., BENDER, L., OTT, M., WINGENDER, J., LUND, B., MARRE, R. e GOEBEL, W. *Deletions of chromosomal regions coding for fimbriae and hemolysin occur in vitro and in vivo in various extraintestinal Escherichia coli. Microbial Pathogenesis*, v. 8, n. 3, p. 213-225. 1990.
- HADFIELD, T.L., MCEVOY, P., POLOTSKY, Y., TZINSERLING, V.A. e YAKOVLEV, A.A. *The pathology of diphtheria. Journal of Infectious Diseases*, v. 181, n. 1, p. 116-120. 2000.
- HARDY, I.R.B., DITTMAN, S. e SUTTER, R.W. *Current situation and control strategies for resurgence of diphtheria in newly independent states of the former Soviet Union. Lancet*, v. 347, n. 9017, p. 1739-1744. 1996.
- HAUSER, D., POPOFF, M.R., KIREDJIAN, M., BOQUET, P. e BIMET, F. *Polymerase chain reaction assay for diagnosis of potentially toxinogenic Corynebacterium diphtheriae strains: correlation with ADP-ribosylation activity assay. Journal of Clinical Microbiology*, v. 31, n. 10, p. 2720-2723. 1993.
- HIRATA, R. JR., SOUZA, S.M., ROCHA-DE-SOUZA, C.M., ANDRADE, A.F., MONTEIRO-LEAL, L.H., FORMIGA, L.C. e MATTOS-GUARALDI, A.L. *Patterns of adherence to HEp-2 cells and actin polymerization by toxigenic Corynebacterium diphtheriae strains. Microbial Pathogenesis*, v. 36, n. 3, p. 125-130. 2004.
- HIRATA, R. JR., PACHECO, L.G., SOARES, S.C., SANTOS, L.S., MOREIRA, L.O., SABBADINI, P.S., SANTOS, C.S., MIYOSHI, A., AZEVEDO, V.A. e MATTOS-GUARALDI, A.L. *Similarity of rpoB gene sequences of sucrose-fermenting and non-fermenting Corynebacterium diphtheriae strains. Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 99, n. 3, p. 733-737. 2011.
- HIRATA, R. JR., PEREIRA, G.A., FILARDY, A.A., GOMES, D.L.R., DAMASCO, P.V., ROSA, A.C.P., NAGAO, P.E., PIMENTA, F.P. e MATTOS-GUARALDI, A.L. *Potential pathogenic role of aggregative-adhering Corynebacterium diphtheriae of different clonal groups in endocarditis. Brazilian Journal of medical and biology research*, v. 41, n. 11, p. 986-991. 2008.
- HIRATA, R., NAPOLEÃO, F., MONTEIRO-LEAL, L.H., ANDRADE, A.F., NAGAO, P.E., FORMIGA, L.C., FONSECA, L.S. e MATTOS-GUARALDI, A.L. *Intracellular viability of toxigenic Corynebacterium diphtheriae strains in HEp-2 cells. FEMS Microbiology Letters*, v. 215, n. 1, p. 115-119. 2002.
- HOLMES, R. K. *Biology and molecular epidemiology of diphtheria toxin and the tox gene. Journal of infectious diseases*, v. 181, n. 1, p. 156-167. 2000.

HUGHES, C., HACKER, J., ROBERTS, A. e GOEBEL W. *Hemolysin production as a virulence marker in symptomatic and asymptomatic urinary tract infections caused by Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 39, n. 2, p. 546-551. 1983.

*IN SILICO PCR AMPLIFICATION*. Disponível em <<http://insilico.ehu.es/PCR/>> . Acesso em: 12 de maio de 2013.

IWAKI, M., KOMIYA, T., YAMAMOTO, A., ISHIWA, A., NAGATA, N., ARAKAWA, Y. e TAKAHASHI, M. *Genome organization and pathogenicity of Corynebacterium diphtheriae C7(-) and PW8 strains*. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 9, p. 3791-3800. 2010.

JAIN, A. e AGARWAL, A. *Biofilm production, a marker of pathogenic potential of colonizing and commensal staphylococci*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 76, n. 1, p. 88-92. 2009.

JOLIFF, G., MATHIEU, L., HAHN, V., BAYAN, N., DUCHIRON, F., RENAUD, M., SCHECHTER, E. e LEBLON, G. *Cloning and nucleotide sequence of the csp1 gene encoding PS1, one of the two major secreted proteins of Corynebacterium glutamicum: the deduced N-terminal region of PS1 is similar to the Mycobacterium antigen 85 complex*. **Molecular microbiology**, v. 6, n. 16, p. 2349-2362. 1992.

JOUBE, M., GARCIA, M.I., COURCOUX, P., LABIGNE, A., GOUNON, P. e Le BOUGUÉNEC, C. *Adhesion to and invasion of HeLa cells by pathogenic Escherichia coli carrying the afa-3 gene cluster are mediated by the afaE and afaD proteins, respectively*. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 10, p. 4082-4089. 1997.

KADIROVA, R., KARTOGLU, H.Ü. e STREBEL, P.M. *Clinical characteristics and management of 676 hospitalized diphtheria cases, Kyrgyz Republic, 1995*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 181, n. 1, p. 110-115. 2000.

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

KELLEY, L.A., MEZULIS, S., YATES, C.M., WASS, M.N. e STERNBERG M.J. *The Phyre<sup>2</sup> web portal for protein modeling, prediction and analysis*. **Nature Protocols**, v. 10, n. 6, p. 845-858. 2015.

KHAMIS, A., RAOULT, D. e LA SCOLA, B. *rpoB gene sequencing for identification of Corynebacterium species*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 9, p. 3925-3931. 2004.

KHAN, N., SHASTRI, J., AIGAL, U. e DOCTOR B. *Resurgence of diphtheria in the vaccination era. Indian*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 25, n. 4, p. 434. 2007.

KIM, S., OH, D. B., KWON, O. e KANG, H. A. *Identification and functional characterization of the NanH extracellular sialidase from Corynebacterium diphtheriae*. **Journal of biochemistry**, v. 147, n. 4, p. 523-533. 2010.

- KIM, S., OH, D.-B. e KWON, O. *Sialidases of Corynebacteria and their Biotechnological Applications. In Corynebacterium diphtheriae and Related Toxigenic Species*, pp. 247-262. 2014.
- KIM, Y. H., LEE, Y., KIM, S., YEOM, J., YEOM, S., KIM, B.S., OH, S., PARK, S., JEON, C. O. e PARK, W. *The role of periplasmatic antioxidant enzymes (superoxide dismutase and thiol peroxidase) of the Shiga toxin-producing Escherichia coli O157:H7 in the formation of biofilms. Proteomics*, v. 6, n. 23, p. 6181-6193. 2006.
- KIEVIT, T. R. *Quorum sensing in Pseudomonas aeruginosa biofilms. Environmental Microbiology*, v.11, n.2, p.279-288. 2009.
- KLEE, E.W. e ELLIS, L.B.M. *Evaluating eukaryotic secreted protein prediction. BMC Bioinformatics*, v. 14, n. 6, p. 256. 2005.
- KOLODKINA, V., DENISEVICH, T. e TITOV, L. *Identification of Corynebacterium diphtheriae gene involved in adherence to epithelial cells. Infection, genetics and evolution. Infection, Genetics and Evolution*, v. 12, p. 518-521. 2011.
- KONEMAN, E.W., ALLEN, S.D., JANDA, W.M., SCHRECKENBERGER, P.C. e WINN, W.C. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. 6ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2008.
- KORONAKIS, V. e HUGHES, C. *Bacterial signal peptide-independent protein export: HlyB-directed secretion of hemolysin. Nature Cell Biology*, v. 4, n. 1, p. 7-15. 1993.
- KORONAKIS, V., KORONAKIS, E. e HUGHES, C. *Isolation and analysis of the C-terminal signal directing export of Escherichia coli hemolysin protein across both bacterial membranes. The EMBO Journal*, v. 8, n. 2, p. 595-605. 1989.
- KOSTYUKOVA, N.N. e PEREVERZEV, N.A. *Adhesion in Corynebacterium diphtheriae. Zh Mikrob Epidem Immunol SSSR*, v. 11, p. 30-33. 1985.
- KROGH, A., LARSSON, B., Von HEIJNE, G. e SONNHAMMER, E.L. *Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. Journal of Molecular Biology*, v. 305, n. 3, p. 567-580. 2011.
- LANG, R. *Recognition of the mycobacterial cord factor by Mincle: relevance for granuloma formation and resistance to tuberculosis. Frontiers in immunology*, v. 24, n. 4, p. 5. 2013.
- LAU, S.K.P., WOO, P.C.W., WOO, G.K.S. e YUEN, K.Y. *Catheter-related Microbacterium bacteremia identified by 16S rRNA gene sequencing. Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, n. 7, p. 2681-2685. 2002.
- LECLERCQ, S.Y., SULLIVAN, M.J., IPE, D.S., SMITH, J.P., CRIPPS, A.W. e ULETT, G.C. *Pathogenesis of Streptococcus urinary tract infection depends on bacterial strain and  $\beta$ -hemolysin/cytolysin that mediates cytotoxicity, cytokine synthesis, inflammation and virulence. Scientific Reports – Nature*, v. 7. 2016.

- LEGGETT, B.A., De ZOYZA A., ABBOTT Y.E., LEONARD, N., MARKEY, B. e EFSTRATIOU, A. *Toxigenic Corynebacterium diphtheriae isolated from a wound in a horse. Veterinary Record*, v. 166, n. 21, p. 656-657. 2010.
- LEMICHEZ, E., BOMSEL, M., DEVILLIERS, G., VANDERSPEK, J., MURPHY, J.R., LUKIANOV, E.V., OLSNES, S. e BOQUET, P. *Membrane translocation of diphtheria toxin fragment A exploits early to late endosome trafficking machinery. Molecular Microbiology*, v. 23, n. 3, p. 445-457. 1997.
- MACAMBIRA, R.P., FORMIGA, L.B. e FORMIGA, L.C.D. Difteria: o grave prognóstico brasileiro. **Jornal Brasileiro de Medicina**, v. 66, p. 69-81.1994.
- MACGREGOR, R.R.C. *Corynebacterium diphtheriae*. In: Mandrell DL, Douglas RG, Bennett JE (eds.) *Enfermidades Infecciosas. Princípios y Practica II*. Buenos Aires, Argentina: Editorial Medica Panamericana, 1990.
- MACHADO, T.L. Avaliação dos testes de toxigenicidade na comprovação da real atoxinogenicidade de amostras de *Corynebacterium diphtheriae* isoladas de casos clínicos e portadores. Tese (Mestrado em Microbiologia) – UFRJ. 1989.
- MAN, P., MONTAGNER, C., VITRAC, H., KAVAN, D., PICHARD, S., GILLET, D., FOREST, E. e FORGE, V. *Accessibility changes within diphtheria toxin T domain when in the functional molten globule state, as determined using hydrogen/deuterium exchange measurements. FEBS Journal*, v. 277, n. 3, p. 653-662. 2010.
- MANDLIK, A., SWIERCZYNSKI, A., DAS, A. e TON-THAT, H. *Corynebacterium diphtheriae employs specific minor pilins to target human pharyngeal epithelial cells. Molecular microbiology*, v. 64, n. 1, p. 111-124. 2007.
- MARCHLER-BAUER, A., DERBYSHIRE, M.K., GONZALES, N.R., LU, S., CHITSAZ, F., GEER, L.Y., GEER, R.C., HE, J., GWADZ, M., HURWITZ, D.I., LANCZYCKI, C.J., LU, F., MARCHLER, G.H., SONG, J.S., THANKI, N., WANG, Z., YAMASHITA, R.A., ZHANG, D., ZHENG, C. e BRYANT S.H. CDD: *NCBI's conserved domain database. Nucleic Acids Research*, v. 43, p. 222-226. 2015.
- MARTINS, C., FARIA, L., SOUZA, M., CAMELLO, T., VELASCO, E., HIRATA, R. JR., THULER, L. e MATTOS-GUARALDI, A. *Microbiological and host features associated with corynebacteriosis in cancer patients: a five-year study. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.104, n. 6, p. 905-913. 2009.
- MATTOS-GUARALDI, A.L. e FORMIGA, L.C.D. *Agglutination of sheep erythrocytes by Corynebacterium diphtheriae. Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 19, p. 75-77. 1986.
- MATTOS-GUARALDI, A.L. e FORMIGA, L.C.D. *Hemagglutination pattern of Corynebacterium diphtheriae. Revista de Microbiologia*, v. 23, n. 1, p. 8-12. 1992.

- MATTOS-GUARALDI, A.L., FORMIGA, L.C. e ANDRADE, A.F. *Cell surface hydrophobicity of sucrose fermenting and nonfermenting Corynebacterium diphtheriae strains evaluated by different methods. Current Microbiology*, v. 38, n. 1, p. 37-42. 1999.
- MATTOS-GUARALDI, A.L. e FORMIGA, L.C.D. *Bacteriological properties of a sucrose fermenting Corynebacterium diphtheriae strain isolated from a case of endocarditis. Current Microbiology*, v. 37, p. 156-158. 1998a.
- MATTOS-GUARALDI, A.L. e FORMIGA, L.C.D. *Corynebacterium diphtheriae e difteróides: ensaios de aderência. Revista Brasileira de Patologia Clínica*, v. 27, p. 53-60. 1991.
- MATTOS-GUARALDI, A.L.; FORMIGA, L.C.D. e MARQUES, E.A. *Diphtheria in a vaccinated adult in Rio de Janeiro, Brazil. Brazilian Journal of Microbiology*, v. 32, p. 236-239. 2001.
- MATTOS-GUARALDI, A.L.; FORMIGA, L.C.D. e PEREIRA, G.A. *Cell surface components and adhesion in Corynebacterium diphtheriae. Microbes and Infection*, v. 2, p. 1507-1512. 2000.
- MATTOS-GUARALDI, A.L., MOREIRA, L.O., DAMASCO, P.V. e HIRATA, R. JR. *Diphtheria remains a threat to health in the developing world - an overview. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 98, p. 987-993. 2003.
- MATTOS-GUARALDI, A.L., FORMIGA, L.C.D., CAMELLO, T.C.F, PEREIRA, G.A., HIRATA, R. JR. e HALPERN, M. *Corynebacterium diphtheriae threats in cancer patients. Revista Argentina de Microbiología*, v. 33, n. 2, p. 96-100. 2001.
- MEKADA, E., OKADA, Y. e UCHIDA, T. *Identification of diphtheria toxin receptor and a nonproteinous diphtheria toxin-binding molecule in Vero cell membrane. The Journal of Cell Biology*, v. 107, n. 2, p. 511-519. 1988.
- MEKALANOS, J. J. *Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. Journal of Bacteriology*, v. 174, n. 1, p. 1-7. 1992.
- MENON, T., SENTHILKUMAR, S. e PACHAIAPPAN, P. *Native valve endocarditis caused by non-toxigenic strain of Corynebacterium diphtheriae. Indian Journal of Pathology and Microbiology*, v. 53, n. 4, p. 899-900. 2010.
- MIKHAILOVICH, V.M., MELNIKOV, V.G., MAZUROVA, I.K., WACHSMUTH, I.K., WENGER, J.D., WHARTON, M., NAKAO, H. e POPOVIC, T. *Application of PCR for detection of toxigenic Corynebacterium diphtheriae strains isolated during the Russian diphtheria epidemic, 1990 through 1994. Journal of Clinical Microbiology*, v. 33, n. 11, p. 3061-3063. 1995.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, Sistema de Informação de Agravos de Notificação – SINAN. Casos confirmados de difteria: Brasil e Grandes Regiões, 1997-2006. Brasília (DF); 2007. Acesso em 10 de maio de 2013. Disponível em [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/casos\\_difteria.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/casos_difteria.pdf)



MISTRY, N.F., DHOLAKIA, Y., D'SOUZA, D.T.B., TAYLOR, M., HOFFNER, S. e BIRDI, T.J. *Rhodococcus and Mycobacterium tuberculosis: masquerade or mixed infection. The International Journal of Tuberculosis Lung Disease*, v. 10, n. 3, p. 351-353. 2006.

MOAYERI, M. e WELCH, R.A. *Effects of temperature, time and toxin concentration on lesion formation by the Escherichia coli hemolysin. Infection and Immunity*, v. 62, n. 10, p. 4124-4134. 1994.

MOBLEY, H.L., GREEN, D.M., TRIFILLIS, A.L., JOHNSON, D.E., CHIPPENDALE, G.R., LOCKATELL, C.V., JONES, B.D. e WARREN, J.W. *Pyelonephritogenic Escherichia coli and killing of cultured human renal proximal tubular epithelial cells: role of hemolysin in some strains. Infection and Immunity*, v. 58, N. 5, p. 1281-1289. 1990.

MOREIRA, L.O. Aspectos estruturais e biológicos de lipoarabinomananas isoladas de *Corynebacterium diphtheriae*. [Dissertação de Doutorado]. Rio de Janeiro, RJ: Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2005

MOREIRA, L.O. Influência da limitação de ferro nas propriedades adesivas de amostras de *Corynebacterium diphtheriae*. Dissertação (Mestrado em microbiologia) – UERJ, Rio de Janeiro. 1999.

MOREIRA, L.O., ANDRADE, A.F., VALE, M.D., SOUZA, S.M., HIRATA, R.JR., ASAD, L.M., ASAD, N.R., MONTEIRO-LEAL, L.H., PREVIATO, J.O. e MATTOS-GUARALDI, A.L. *Effects of iron limitation on adherence and cell surface carbohydrates of Corynebacterium diphtheriae strains. Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, n. 10, p. 5907-5913. 2003.

MOREIRA, L.O., MATTOS-GUARALDI, A.L. e ANDRADE, A.F. *Novel lipoarabinomannan-like lipoglycan (CdiLAM) contributes to the adherence of Corynebacterium diphtheriae to epithelial cells. Archives of Microbiology*, v. 190, n. 5, p. 521-530. 2008.

MORREY, B.F., FITZGERALD, R.H., KELLY, P.J., DOBYNS, J.H. e WASHINGTON, J.A. *Diphtheroid osteomyelitis. The Journal of Bone & Joint Surgery*, v. 59, n. 4, p. 527-530. 1997.

MORRIS, R.E., GERSTEIN, A.S., BONVENTRE, P.F. e DAELINGER, C.B. *Receptor-mediated entry of diphtheria toxin into monkey kidney (Vero) cells: electron microscopic evaluation. Infection and Immunity*, v. 50, n. 3, p. 721-727. 1985.

MOKROUSOV, I. *Corynebacterium diphtheria: genome diversity, population structure and genotyping perspectives. Infection, Genetics and Evolution*, v. 9, n. 1, p. 1-15.2009.

MOSKAUG, J.O., SANDVIG, K. e OLSNES, S. *Low pH-induced release of diphtheria toxin A-fragment in Vero cells. Biochemical evidence for transfer to the cytosol. The Journal of Biological Chemistry*, v. 263, n. 5, p. 2518-2525. 1988.

MURASE, K., OOKA, T., IGUCHI, A., OGURA, Y., NAKAYAMA, K., ASADULGHANI, MD., ISLAM, M.D. R., HIYOSHI, H., KODAMA, T., BEUTIN, L. e HAYASHI, T.

*Haemolysin E- and enterohaemolysin – derived haemolytic activity of O55/O157 strains and other Escherichia coli lineages. Microbiology*, v. 158, n. 3, p. 746-758. 2012.

MURRAY, P.R. *Manual of clinical microbiology: Coryneform Gram-positive*. 9. ed. Washington, p. 485-514. 2007.

NAKAO, H., PRUCKLER, J.M., MAZUROVA, I.K., NARVSKAIA, O.V., GLUSHKEVICH, T., MARIJEVSKI, V.F, KRAVETZ, A.N, FIELDS, B.S, WACHSMUTH, I.K e POPOVIC, T. *Heterogeneity of diphtheria toxin gene, tox, and its regulatory element, dtxR, in Corynebacterium diphtheriae strains causing epidemic diphtheria in Russia and Ukraine. Journal of Clinical Microbiology*, v. 34, n. 7, p. 1711-6. 1996.

NAKAO, H. e POPOVIC, T. *Development of a direct PCR for detection of the diphtheria toxin gene. Journal of Clinical Microbiology*, v. 35, n. 7, p. 1651-1655. 1997.

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

OSTALAZA, H., BARTALOME, B., ZARATE, I.O., De La Cruz, F. e GOÑI, F.M. *Release of vesicle contentes by the bacterial protein toxin  $\alpha$ -haemolysin. Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1147, n. 1, p. 81-88. 1993.

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

OTT, L., HÖLLER, M., GERLACH, R. G., HENSEL, M., RHEINLAENDER, J., SCHAFFER, T. E. e BURKOVSKI, A. *Corynebacterium diphtheriae invasion-associated protein (DIP1281) is involved in cell surface organization, adhesion and internalization in epithelial cells. BMC Microbiology*, v. 10, n. 2. P. 1-9. 2010a.

OTT, L., HÖLLER, M., RHEINLAENDER, J., SCHÄFFER, T.E., HENSEL, M., E BURKOVSKI, A. *Strain-specific differences in pili formation and the interaction of Corynebacterium diphtheriae with host cells. BMC Microbiology*, v. 10, n. 257, p. 1- 12. 2010b.

PALLEN, M.J. *Rapid screening for toxigenic Corynebacterium diphtheriae by the polymerase chain reaction. Journal of Clinical Pathology*, v. 44, n. 12, p. 1025-1026. 1991.

PALLEN, M.J., HAY, A.J., PUCKEY, L.H. e EFSTRATIOU, A. *Polymerase chain reaction for screening clinical isolates of corynebacteria for the production of diphtheria toxin. Journal of Clinical Pathology*, v. 47, n. 4, p. 353-356. 1994.

PAPPENHEIMER, A.M. Jr. *Diphtheria toxin. Annual Review of Biochemistry*, v. 46, p. 69-94. 1977.

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

- PASCUAL, C., LAWSON, P.A., FARROW, J.A., GIMENEZ, M.N. e COLLINS, M.D. *Phylogenetic analysis of the genus Corynebacterium based on 16S rRNA gene sequences. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 45, n. 4, p. 724-728. 1995.
- PEI, B., WANG, Y., KATZIANER, D. S., WANG, H., WU, H., ZHONG, Z. e ZHU, J. *Role of a TehA homolog in Vibrio cholerae C6706 antibiotic resistance and intestinal colonization. Canadian Journal of Microbiology*, v. 59, n. 2, p. 136-139. 2013.
- PEREIRA, G.A. Aspectos fenotípicos e genotípicos de cepas de *Corynebacterium diphtheriae* isoladas no Brasil. 140 f. Dissertação [Dissertação de Mestrado em microbiologia] - Universidade do Estado do Rio de Janeiro. 2001.
- PEROTTONI, C. Clonagem e expressão de proteína heteróloga com potencial imunogênico contra *Corynebacterium diphtheriae*. [Tese de Doutorado]. Curitiba. Universidade Federal do Paraná. 2015.
- PIMENTA, F.P., DAMASCO, P.V., CERBINO, N.J., LOPES, G.S., HIRATA, R. JR., MILAGRES, L.G. e MATTOS-GUARALDI, A.L. *Diphtheria-neutralizing antibody levels in healthy adults from Rio de Janeiro, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 101, n. 4, p. 459-462. 2006.
- PIMENTA, F.P., SOUZA, M.C., PEREIRA, G.A., HIRATA, R. JR., CAMELLO, T.C. e MATTOS-GUARALDI, A.L. *DNase test as a novel approach for the routine screening of Corynebacterium diphtheriae. Letters in applied Microbiology*, v.46, n. 3, p. 307-311. 2008.
- POILANE, I., FAWAZ, F., NATHANSON, M., CRUAUD, P., MARTIN, T., COLLIGNON, A. e GAUDELUS, J. *Corynebacterium diphtheria osteomyelitis in an immunocompetent child: a case report. European Journal of Pediatric*, v. 154, n. 5, p. 381-383. 1995.
- POPOVIC, T., KOMBAROVA, S., REEVES, M., NAKAO, H., MAZUROVA, I., WHARTON, M., WACHSMUTHA, I. e WENGER, J. *Molecular epidemiology of diphtheria in Russia 1985-1994. The Journal of Infectious Diseases*, v.174, n. 5, p. 1064-1072. 1996.
- PUECH, V., CHAMI, M., LEMASSU, A., LANÉELLE, M.A., SCHIFFLER, B., GOUNON, P., BAYAN, N., BENZ, R. e DAFFÉ M. *Structure of the cell envelope of corynebacteria: importance of the non-covalently bound lipids in the formation of the cell wall permeability barrier and fracture plane. Microbiology*, v. 147, n. 5, p. 1365-1382. 2001.
- PULITI, M., VON HUNOLSTEIN, C., MARANGI, M., BISTONI, F. e TISSI, L. *Experimental model of infection with non-toxigenic strains of Corynebacterium diphtheriae and development of septic arthritis. Journal of Medical Microbiology*, v. 55, n. 2, p. 229-235. 2006.
- PULITI, M., NIZET, V., VON HUNOLSTEIN, C., BISTONI, F., MOSCI, P., OREFICI, G. e TISSI, L. *Severity of group B streptococcal arthritis is correlated with  $\beta$ -hemolysin expression. The Journal of Infectious Diseases*, v.182, n. 3, p. 824-832. 2000.
- QUICK, M.L., SUTTER, R.W., KOBALIDZE, K., MALAKMADZE, N., STREBEL, P.M., NAKASHIDZE, R. e MURVANIDZE, S. *Epidemic diphtheria in the Republic of Georgia*,

1993-1996: risk factors for fatal outcome among hospitalized patients. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 181, n. 1, p. 130-307. 2000.

REACHER, M., RAMSAY, M., WHITE, J., DE ZOYSA, A., EFSTRATIOU, A., MANN, G., MACKAY, A. e GEORGE, R.C. *Nontoxigenic Corynebacterium diphtheriae: an emerging pathogen in England and Wales. Emerging Infectious Diseases Journal*, v. 6, n. 6, p. 640-645. 2000.

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

REITER, K.C., Da SILVA, T.G.P., De OLIVEIRA, C.F. e D'AZEVEDO, P.A. *High biofilm production by invasive multiresistant staphylococci. APMIS*, v. 119, n. 11, p. 776-781. 2011.

REY, M., PATEY, O. e VINCENT-BALLEREAU, F. *Diphtheria's European come back. European Communicable Disease Bulletin*, v. 1, n. 2, p. 14-16. 1996.

ROLERSON, E., SWICK, A., NEWLON, L., PALMER, C., PAN, Y., KEESHAN, B. e SPATAFORA, G. *The SloR/Dlg metalloregulator modulates Streptococcus mutans virulence gene expression. Journal of Bacteriology*, v. 188, n. 14, p. 5033-5044. 2006.

ROMNEY, M.G., ROSCOE, D.L., BERNARD, K., LAI, S., EFSTRATIOU, A., e CLARKE, A.M. *Emergence of an invasive clone of nontoxigenic Corynebacterium diphtheriae in the urban poor population of Vancouver, Canada. Journal of Clinical Microbiology*, v. 44, n. 5, p. 1625-1629. 2006.

RUIMY, R., RIEGEL, P., BOIRON, P., MONTEIL, H. e CHRISTEN R. *Phylogeny of the genus Corynebacterium deduced from analyses of small-subunit ribosomal DNA sequences. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 45, n. 4, p. 740-746. 1995.

SABBADINI, P.S., ASSIS, C.M., TROST, E., GOMES, D.L., MOREIRA, L.O., DOS SANTOS, C.S., PEREIRA, G.A., NAGAO, P.E., AZEVEDO, V.A., HIRATA, R.JR., DOS SANTOS, A.L., TAUCH, A. e MATTOS-GUARALDI, A.L. *Corynebacterium diphtheriae 67-72p hemagglutinin, characterized as the protein DIP0733, contributes to invasion and induction of apoptosis in HEp-2 cells. Microbial Pathogenesis*, v. 52, n. 3, p. 165-176. 2012.

SALYERS, A.A. e WHITT, D.D. *Diphtheria. In: Bacterial pathogenesis: a molecular approach. American Society for Microbiology*. Washington, DC. 113-121. 1994.

SANDOE, J.A., WITHERDEN, I.R., COVE, J.H., HERITAGE, J. e WILCOX, M.H. *Correlation between enterococcal biofilm formation in vitro and medical-device-related infection potential in vivo. Journal of Medical Microbiology*, v. 52, n. 7, p. 547-550. 2003.

SANGAL, V., TUCKER, N.P., BURKOVSKI, A. e HOSKISSON, P. *Draft genome sequence of Corynebacterium diphtheria biovar intermedius NCTC5011. Journal of Bacteriology*, v. 194, n. 17, p. 4738. 2012a.

SANGAL, V., TUCKER, N.P., BURKOVSKI, A. e HOSKISSON, P. *Draft genome sequence of Corynebacterium diphtheriae* NCTC3529 reveals significant diversity between the primary disease-causing biovars. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 12, p. 3269. 2012b.

SANGAL, V., BURKOVSKI, A., HUNT, A.C., EDWARDS, B., BLOM, J. e HOSKISSON, P.A. *A lack of genetic basis for biovar differentiation in clinically important Corynebacterium diphtheriae from whole genome sequencing.* **Infection, Genetics and Evolution**, v. 21, p. 54-57. 2014.

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

SANTOS, A.F., CAYÔ, R., SCHANDERT, L. e GALES, A.C. *Evaluation of MALDI-TOF MS in the microbiology laboratory.* **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 49, n. 3, p. 191-197. 2013.

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

SANTOS, L.S. *Estudo sobre o efeito do telurito de potássio em atividades biológicas do Corynebacterium diphtheriae [Dissertação de Mestrado].* Rio de Janeiro, RJ: Universidade do Estado do Rio de Janeiro. 2009.

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

SANTOS, L.S., ANTUNES, C.A., SANTOS, C.S., PEREIRA, J.A., SABBADINI, P.S., LUNA, M.D., AZEVEDO, V., HIRATA JÚNIOR, R., BURKOVSKI, A., ASAD, L.M. e MATTOS-GUARALDI, A.L. *Corynebacterium diphtheriae putative tellurite-resistance protein (CDCE8392\_0813) contributes to the intracellular survival in human epithelial cells and lethality of Caenorhabditis elegans.* **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 5, p. 662-668. 2015a

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

SCHAUER, R. e KAMERLING, J.P. *Chemistry, biochemistry and biology of sialic acids.* In: "Glycoproteins" J. Montreuil, H. Schachter and J.F.G. Vliegthart. Eds. 1997.

- SCHMIDT, H., BEUTIN, L. e KARCH, H. *Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of Escherichia coli O157:H7 strain EDL 933. Infection and Immunity*, v. 63, n. 3, p. 1055-1061. 1995.
- SCHMITT, M.P. *Transcription of the Corynebacterium diphtheriae hmuo gene is regulated by iron and heme. Infection and Immunity*, v. 65, n. 11, p. 4634-4641. 1997.
- SCHMITT, M.P., TALLEY, B.G. e HOLMES, R.K. *Characterization of lipoprotein IRP1 from Corynebacterium diphtheriae, which is regulated by the diphtheria toxin repressor (DtxR) and Iron. Infection and Immunity*, v. 65, n. 12, p. 5364-5367. 1977.
- SCHNEEWIND, O., FOWLER, A. e FAULL, K.F. *Structure of the cell wall anchor of surface proteins in Staphylococcus aureus. Science*, v. 268, n. 5207, p. 103-106. 1995.
- SCHNEEWIND, O., MODEL, P. e FISCHETTI, V.A. *Sorting of protein A to the staphylococcal cell wall. Cell*, v. 70, n. 2, p. 267-281. 1992.
- SIMONSEN, O., KLARKE, M., KLARKE, A., BLOCH, A.V., HANSEN, B.R., HALD, N., HAU, C. e HERON, I. *Revaccination of adults against diphtheria ii: combined diphtheria and tetanus revaccination with different doses of diphtheria toxoid 20 years after primary vaccination. APMIS*. v. 94, n. 5, p. 219-226. 1986.
- SIMPSON-LOUREDO, L., RAMOS, J.N., STAVRACAKIS-PEIXOTO, R., SANTOS, L.S., ANTUNES, C.A., LADEIRA, E.M., SANTOS, C.S., VIEIRA, V.V., BÔAS, M.H., HIRATA, R. JR. e MATTOS-GUARALDI, A.L. *Corynebacterium ulcerans isolates from humans and dogs: fibrinogen, fibronectin and collagen-binding, antimicrobial and PFGE profiles. Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 105, n. 2, p. 343-352. 2013.
- SMITH, W.P., TAI, P.C., MURPHY, JR. e DAVIS, B.D. *Precursor in cotranslational secretion of diphtheria toxin. Journal of Bacteriology*, v. 141, n. 1, p. 184-189. 1980.
- SMITH, H.W. e HALLS, S. *The transmissible nature of the genetic factor in Escherichia coli that controls haemolysin production. Microbiology Society Journals*, v. 47, n. 1, p. 153-161. 1967.
- SMITH, H.W. *The haemolysins of Escherichia coli. The Journal of pathology and bacteriology*, v. 85, p. 197-211. 1963.
- SOARES, S.C., ABREU, V.A., RAMOS, R.T., CERDEIRA, L., SILVA, A., BAUMBACH, J., TROST, E., TAUCH, A., HIRATA, R. JR., MATTOS-GUARALDI, A.L., MIYOSHI, A. e AZEVEDO, V. *PIPS: pathogenicity island prediction software. PLoS.*, v. 7, n. 2, p. 1-10. 2012.
- SPATAFORA, G., MOORE, M., LANDGREN, S., STONEHOUSE, E. e MICHALEK, S. *Expression of Streptococcus mutans fimA is iron-responsive and regulated by a DtxR homologue. Microbiology*, v. 147, n. 6, p. 1599-1610. 2001.
- STAVRACAKIS-PEIXOTO, R., PEREIRA, G.A., SANTOS, L.S., SOUZA, M.C., GOMES, D.L., SANTOS, C.S., WERNECK, L.M., DIAS, A.A., HIRATA, R. JR., NAGAO, P.E. e MATTOS-GUARALDI, A.L. *Invasion of endothelial cells and arthritogenic potential of*

endocarditis-associated *Corynebacterium diphtheriae*. **Microbiology**, v. 160, n. 3, p. 537-546. 2014.

STAVRACAKIS-PEIXOTO, R., SIQUEIRA, G.C.O., LUCA, F.M., SANT'ANNA, L.O., SANTOS, L.S., RAMA, D.L.R., SOUZA, M.C., SABBADINI, P.S., HIRATA, R. JR., MARTINS, C.A.S. e MATTOS-GUARALDI, A.L. *Aspectos fenotípicos e do potencial patogênico de cepa de Corynebacterium diphtheriae isolada de processo de osteomielite em paciente com neoplasia*. **RBAC**, v. 43, n. 3, p. 230-236. 2011.

STAVRACAKIS-PEIXOTO, Renata. *Potencial de virulência de cepas de Corynebacterium diphtheriae isoladas de infecções atípicas e caracterização funcional de genes de patogenicidade DIP2093*. 2016. 215 f. Tese (Doutorado em Ciências – Microbiologia) - Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

STEPANOVIC, S., VUKOVIC, D., DAVIC, I., SAVIC, B. e SVABIC-VLAHOVIC, M. A *modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation*. **Journal Microbiol Methods**, v. 40, n. 2, p. 175-179. 2000.

STROHMEIER, G. R. e FENTON, M. J. *Roles of lipoarabinomannan in the pathogenesis of tuberculosis*. **Microbes and infection / Institut Pasteur**, v. 1, n. 9, p. 709-717. 1999.

SUWANTARAT, N., WEIK, C., ROMAGNOLI, M., ELLIS, B.C., KWIATKOWSKI, N. e CARROLL, K.C. *Practical Utility and Accuracy of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of Corynebacterium Species and Other Medically Relevant Coryneform-Like Bacteria*. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 145, n. 1, p. 22-28. 2016.

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

TANG, Y.W. *Identification of coryneform bacterial isolates by ribosomal DNA sequence-analysis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 1676-1678. 2000.

TAYLOR, D.E. *Bacterial tellurite resistance*. **Trends in Microbiology**, v. 7, n. 3, p. 111–115. 1999.

TISSI, I., MARCONI, P., MOSCI, P., MERLETTI, L., CORNACCHIONE, P., ROSATI, E., RECCHIA, S., VON HUNOLSTEIN, C. e OREFICI, G. *Experimental model of type IV Streptococcus agalactiae (Group B Streptococcus) infection in mice with early development of septic arthritis*. **Infection and Immunity**, v. 58, n. 9, p. 3093-3100. 1990.

TMHMM 2. Disponível em <<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>> . Acesso em: 12 de maio de 2013.

TON-THAT, H. e SCHNEEWIND, O. *Assembly of pili in Gram-positive bacteria*. **Trends in Microbiology**, v. 12, n. 5, p. 228-234. 2004.

TRABULSI, L.R. e ALTERTHUM, F. Microbiologia. In: *Corynebacterium diphtheriae* e outras espécies do gênero. 6ª Edição. Editora Atheneu.2015.

TROST, E., BLOM, J., SOARES, S.C., HUANG, I.H., AL-DILAIMI, A., SCHRÖDER, J., JAENICKE, S., DORELLA, F.A., ROCHA, F.S., MIYOSHI, A., AZEVEDO, V., SCHNEIDER, M.P., SILVA, A., CAMELLO, T.C., SABBADINI, P.S., SANTOS, C.S., SANTOS, L.S., HIRATA, R. JR., MATTOS-GUARALDI, A.L., EFSTRATIOU, A., SCHMITT, M.P., TON-THAT, H. e TAUCH, A. *Pangenomic study of Corynebacterium diphtheriae that provides insights into the genomic diversity of pathogenic isolates from cases of classical diphtheria, endocarditis, and pneumonia. Journal of bacteriology*, v. 194, n. 12, p. 3199-3215. 2012.

UHLEN, P., LAESTADIUS, A., JAHNUKAINEN, T., SODERBLOM, T., BACKHED, F., CELSI, G., BRISMAR, H., NORMARK, S., APERIA, A. e RICHTERDAHLFORS, A. *Alpha-haemolysin of uropathogenic E. coli induces Ca<sup>2+</sup> oscillations in renal epithelial cells. Nature*, v. 405, n. 6787, p. 694-697. 2000.

van den VELDE, S., LAGROU, K., DESMET, K., WAUTERS, G. e VERHAEGEN, J. *Species identification of corynebacteria by cellular fatty acid analysis. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 54, n. 2, p. 99-104. 2006.

van der PEET, P.L., GUNAWAN, C., TORIGOE, S., YAMASAKI, S. e WILLIAMS, S. J. *Corynomycolic acid-containing glycolipids signal through the pattern recognition receptor Mincle. Chemical communications*, v. 51, n. 24, p. 5100-5103. 2015.

VANEECHOUTTE, M., DIJKSHOORN, L., TJERNBERG, I., ELAICHOUNI, A., De VOS, P., CLAEYS, G. e VERSCHRAEGEN, G. *Identification of Acinetobacter genomic species by amplified ribosomal DNA restriction analysis. Journal of Clinical Microbiology*, v. 33, n. 1, p. 11-15. 1995.

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

VIGUETTI, S.Z., PACHECO, L.G., SANTOS, L.S., SOARES, S.C., BOLT, F., BALDWIN, A., DOWSON, C.G., ROSSO, M.L., GUIZO, N., MIYOSHI, A., HIRATA, JR. R., MATTOS-GUARALDI, A.L. e AZEVEDO, V. *Multilocus sequence types of invasive Corynebacterium diphtheria isolates in the Rio de Janeiro urban area, Brazil. Epidemiology & Infection*, v. 140, n. 4, p. 617-620. 2011.

WAGNER, K. S., WHITE, J. M., CROWCROFT, N. S., De MARTIN, S., MANN, G. e EFSTRATIOU, A. *Diphtheria in the United Kingdom, 1986-2008: the increasing role of Corynebacterium ulcerans. Epidemiology and infection*, v. 138, n. 11, p. 1519-1530. 2010.

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



- WANDERSMAN, C. e DELEPELAIRE, P. *TolC, an Escherichia coli outer membrane protein required for hemolysin secretion. Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 87, n. 12, p. 4776-4780. 1990.
- WHO. *Vaccine-preventable diseases: monitoring system 2016 global summary*. Disponível em: [http://www.who.int/immunization/monitoring\\_surveillance/burden/diphtheria/en/](http://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/diphtheria/en/). Acesso em 09/06/2016. 2016.
- WOO, P.C.Y., NG, K.H.L., LAU, S.P.K., YIP, K., FUNG, A.M.Y., LEUNG, K., TAM, D.M.W., QUE, T. e YUEN, K. *Usefulness of the MicroSeq 500 16S Ribosomal DNA-Based Bacterial Identification System for Identification of Clinically Significant Bacterial Isolates with Ambiguous Biochemical Profiles. Journal of Clinical Microbiology*, v. 41, n. 5, p. 1996-2001. 2003.
- WU, H. e FIVES-TAYLOR, P.M. *Molecular strategies for fimbrial expression and assembly. Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, v. 12, n. 2, p. 101-115. 2001.
- YAMAIZUMI, M., MEKADA, E., UCHIDA, T. e OKADA, Y. *One molecule of diphtheria toxin fragment A introduced into a cell can kill the cell. Cell*, v. 15, n. 1, p. 245-250. 1978.
- YANAGAWA, R. e HONDA, E. *Presence of Pili in Species of Human and Animal parasites and pathogens of the genus Corynebacterium. Infection and Immunity*, v. 13, n. 4, p. 1293-1295. 1976.
- YIN, X., WHEATCROFT, R., CHAMBERS, JR., LIU, B., ZHU, J. e GYLES, C.L. *Contributions of O island 48 to adherence of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 to epithelial cells in vitro and in ligated pig ileal loops. Applied and Environmental Microbiology*, v. 75, n. 18, p. 5779-5786. 2009.
- YUKAWA, H., OMUMASABA, C.A., NONAKA, H., KÓS, P., OKAI, N., SUZUKI, N., SUDA, M., TSUGE, Y., WATANABE, J., IKEDA, Y., VERTÈS, A.A. e INUI, M. *Comparative analysis of the Corynebacterium glutamicum group and complete genome sequence of strain. Microbiology*, v. 153, n. 4, p. 1042-1058. 2007.
- ZASADA, A.A., BACZEWSKA-REJ, M. e WARDAK, S. *An increase in non-toxigenic Corynebacterium diphtheriae infections in Poland--molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of strains isolated from past outbreaks and those currently circulating in Poland. International Journal of Infectious Diseases*, v. 14, n. 10, p. 907-912. 2010.
- ZASADA, A.A., ZALESKA, M., PODLASIN, R.B. e SEFERYNKA, I. *The first case of septicemia due to nontoxigenic Corynebacterium diphtheriae in Poland: case report. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, v. 4, n. 8, p. 1-3. 2005.

## ANEXO – Aprovação no Comitê de Ética



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



**COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS**

**CERTIFICADO**

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

Rio de Janeiro, 28 de Julho de 2015.

---

Prof. Dr. Israel Felzenszwalb  
CEUA/IBRAG/UERJ

---

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