

Universidade de Brasília – UnB
Instituto de Ciências Biológicas – IB
Departamento de Biologia Celular – CEL
Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana

Tese de doutorado

Determinação da influência do metabolismo de açúcares na expressão de fatores associados à virulência de linhagens de *Klebsiella pneumoniae* causadoras de bacteremia

Aluna: Laura Fernandes Gonçalves

Orientadora: Profa. Dra. Tatiana Amabile de Campos

Brasília – DF
2025

Laura Fernandes Gonçalves

Determinação da influência do metabolismo de açúcares na expressão de fatores associados à virulência de linhagens de *Klebsiella pneumoniae* causadoras de bacteremia

Tese apresentada como requisito para a obtenção do título de Doutora pelo programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília.

Orientadora: Profa. Dra. Tatiana Amabile de Campos
Brasília – DF

Dedicatória

“ Não há lugar para a sabedoria onde não há paciência ”

Santo Agostinho

Dedico aos meus pais, Cássia e Walter, e aos meus irmãos, Vinícius, Guilherme e Júlia. Tudo de bom que há em mim tem raízes fortes criadas nesse lugar de amor e suporte que é a minha família.

Agradecimentos

Agradeço a Deus por me conduzir durante todo esse caminho, por me amparar em todas as dificuldades e me permitir chegar até aqui.

Aos meus pais, pelo apoio e amor infinitos. Não existem palavras para expressar a gratidão que sinto em meu coração por ter vocês ao meu lado. Aos meus irmãos, Vinícius, Guilherme e Júlia, pelas alegrias de compartilhar a vida com vocês.

À minha orientadora, Tatiana, por todos os anos que caminhamos juntas. Agradeço por todos os ensinamentos, pela paciência, pelo apoio e pelo carinho. Você é uma mulher inspiradora que influenciou muito a minha vida profissional e pessoal. Guardarei com carinho todas as lições aprendidas ao longo de todos esses anos de convívio. Ao professor Vicente, pela disposição em me auxiliar sempre, e à professora Ana Flávia, por sua colaboração nesse trabalho.

Aos amigos do LAMP, obrigada pela colaboração e apoio ao longo desse trabalho. Um agradecimento especial à Rafa, que caminhou desde o começo comigo. Por ser sempre tão disponível em me ajudar, pelo carinho e por todos os momentos que compartilhamos.

À minha melhor amiga, Ana Paula, como foi bom ter concluído mais essa etapa ao seu lado. Foi um presente ter sido a sua dupla durante todo esse trabalho. Obrigada pelo amor, pela confiança, pela paciência, pelas conversas e pelo cuidado. Que continuemos caminhando juntas sempre.

Aos amigos de outros laboratórios, em especial ao Lucas, obrigada por tão generosamente me ajudar em tantos momentos. Pelas risadas, pela parceria e pela amizade tão especial. Foi uma surpresa ter conhecido você e os dias, com certeza, se tornaram mais especiais com você por perto.

À Érika, por participar dessa e de tantas outras jornadas comigo. Por me ajudar a me tornar uma pessoa cada dia melhor em todas as áreas da minha vida.

A todos aqueles que cruzaram meu caminho e de alguma forma contribuíram com a realização desse trabalho e com o meu crescimento, muito obrigada.

Às agências de fomento CAPES, FAPDF e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Microbiana, pelo auxílio financeiro e pelo suporte na execução desse projeto.

Resumo

Klebsiella pneumoniae é considerada um dos patógenos mais importantes causadores de infecções entre indivíduos imunocomprometidos. Apesar dessa associação frequente a infecções oportunistas, existem linhagens de *K. pneumoniae* hipervirulentas (hvKp) associadas a um fenótipo de produção de cápsula hipermucoide e que é capaz de causar infecções agressivas e metastáticas em indivíduos que não apresentam imunocomprometimento. Essas variantes possuem muitos fatores de virulência que favorecem sua multiplicação e proteção contra o sistema imune. A cápsula se destaca entre eles, sendo sua expressão — assim como a de outros fatores de patogenicidade — fortemente influenciada pelo metabolismo de diferentes açúcares, especialmente em linhagens hipervirulentas (hvKp). Portanto, nesse trabalho, tivemos por objetivo identificar o papel da utilização de açúcares por linhagens hipervirulentas de *K. pneumoniae* na expressão de fatores de virulência. Para isso, avaliamos o *fitness* bacteriano; a produção de biofilme e sideróforos; a capacidade de sobrevivência em soro humano e a expressão de fatores de virulência na presença de diversas fontes de carbono. Foram utilizadas três linhagens de *K. pneumoniae*, Kp 31 isolada de hemocultura sem fenótipo hipermucoide, Kp 34 isolada de cultura de *swab* retal com o fenótipo e M93, linhagem derivada de Kp 34 que teve a perda do fenótipo hipermucoide pela inserção de TnPhoA no gene da fucose isomerase. Com esse estudo, verificou-se que a manose é um açúcar em que as linhagens apresentam um melhor *fitness* bacteriano e produção de biofilme, embora os isolados apresentem capacidades diferentes de produzir biofilme. As três linhagens apresentam elevada produção de sideróforos e o isolado de hemocultura foi o único capaz de sobreviver em soro. Em relação à expressão de fímbrias *mrkA* observou-se que ela foi mais elevada quando as linhagens foram cultivadas em glicose e manose. O gene *fucI*, relacionado a expressão de hipermucoviscosidade em linhagens hvKp, não foi expresso pela linhagem Kp 31 e, também não foi expresso quando as demais estirpes foram cultivadas em glicose. Dessa forma, nota-se que a fonte de carbono em conjunto com fatores intrínsecos de cada linhagem, afetam a virulência bacteriana.

Palavras-chave: *Klebsiella pneumoniae*, hipervirulência, metabolismo de açúcares, fatores de virulência.

Abstract

Klebsiella pneumoniae is considered one of the most important pathogens causing infections among immunocompromised individuals. Despite this frequent association with opportunistic infections, there are hypervirulent *K. pneumoniae* strains (hvKp) associated with a hypermucooid capsule production phenotype that can cause aggressive and metastatic infections in individuals who are not immunocompromised. These variants possess numerous virulence factors that promote their multiplication and protection from the immune system. The capsule stands out among them, its expression, as well as that of other pathogenicity factors, strongly influenced by the metabolism of different sugars, especially in hypervirulent strains (hvKp). Therefore, in this work, we aimed to identify the role of the use of sugars by hypervirulent strains of *K. pneumoniae* in the expression of virulence factors. To this aim, we evaluate bacterial fitness; the production of biofilm and siderophores; the ability to survive in human serum and the expression of virulence factors in the presence of different carbon sources. Three strains of *K. pneumoniae* were used, Kp 31 isolated from blood culture without hypermucooid phenotype, Kp 34 isolated from rectal *swab* culture with the phenotype and M93, a strain derived from Kp 34 that lost the hypermucooid phenotype due to the insertion of TnPhoA in the fucose isomerase gene. With this study, it was verified that mannose is the sugar in which the strains present better bacterial *fitness* and biofilm production, although the isolates present different abilities to produce biofilm. The three strains show high production of siderophores and the blood culture isolate was the only one capable of surviving in serum. Regarding the expression of *mrkA* fimbriae, a higher expression was observed in strains cultivated in glucose and mannose. The *fucI* gene, related to the expression of hypermucoviscosity in hvKp lines, was not expressed by the Kp 31 line and was also not expressed in glucose. Thus, it is noted that the carbon source, together with intrinsic factors of each lineage, affect bacterial virulence.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, hypervirulence, sugar metabolism, virulence factors.

Lista de Figuras

Figura 1. Árvore filogenética de <i>Klebsiella</i> baseada na técnica de sequenciamento completo de genoma.	Página 17
Figura 2. Principais sítios de infecções causadas por hvKp.	Página 19
Figura 3. "String test" positivo de <i>K.pneumoniae</i> hiper mucoviscosa	Página 20
Figura 4. Plasmídeos pLVPK e pVir-CR-HvKp4 portadores de diversos genes de virulência associados as linhagens hvKp.	Página 21
Figura 5. Fatores de virulência para a caracterização de hvKp	Página 22
Figura 6. Distribuição global de CR-hvKp entre 2015 e 2022	Página 23
Figura 7. Fatores de virulência de <i>K. pneumoniae</i>	Página 24
Figura 8. Esquema do <i>cluster</i> de genes de biossíntese de CPS (polissacarídeo capsular)	Página 26
Figura 9. Esquema dos estágios de formação de biofilme	Página 29
Figura 10. Genes que participam da regulação da produção de biofilme	Página 31
Figura 11. Mecanismos de expressão e regulação de fímbrias do tipo 1 e tipo 3.	Página 34
Figura 12. Sistema de sideróforos presentes em <i>K. pneumoniae</i>	Página 36
Figura 13. Mecanismos de resistência microbiana aos antimicrobianos.	Página 38
Figura 14. Estimativa do número de mortes causadas pela resistência aos antimicrobianos em 2050 por todo o mundo	Página 39
Figura 15. Variantes de <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenamase (KPC)	Página 40
Figura 16. Alguns complexos EII específicos de alguns carboidratos.	Página 42
Figura 17. Fosforilação e transporte de carboidratos pelo sistema PTS e sua integração com o processo de glicólise.	Página 43
Figura 18. Esquema da influência de sistemas de EII na produção de CPS	Página 44

Figura 19. Esquema da regulação da expressão de fímbrias do tipo 3 por CRP-AMP _c e c-di-GMP.	Página 46
Figura 20. Crescimento dos isolados de <i>K. pneumoniae</i> Kp 31, Kp 34 e M93 em meio LB, meio M9 suplementado com glicose, frutose, galactose, lactose, maltose, manose, sacarose, sorbitol e M9 sem adição de fonte de carbono.	Página 56
Figura 21. Formação de biofilme de 5 dias em temperatura de 25°C das linhagens Kp 31, Kp 34 e M93 em meio M9 suplementado com fontes de carbono.	Página 65
Figura 22. Quantificação da produção de sideróforos pelas linhagens bacterianas Kp 31, Kp 34 e M93.	Página 69
Figura 23. Sobrevivência dos isolados de Kp 31, Kp 34 e M93 em incubação em soro humano por 120 minutos.	Página 71
Figura 24. Expressão do gene <i>mrkA</i> nos isolados Kp 31 (A), Kp 34 (B) e M93 (C).	Página 75
Figura 25. Expressão do gene <i>fucI</i> em Kp 34 (A) e M93 (B).	Página 78

Lista de Tabelas

Tabela 1. Média aritmética e desvio padrão (DP) da DO (570 nm) na formação de biofilme das linhagens de <i>K. pneumoniae</i> Kp 31, Kp 34 e M93 em 24 horas.	Página 61
---	--------------

Abreviaturas

BLSE: beta lactamase de espectro estendido

c-di-GMP: diguanilato cíclico intracelular

cKp-XDR: cepa clássica de *K. pneumoniae* extensivamente resistente

cKp: cepa clássica de *K. pneumoniae*

cps: gene que regula os *loci* da cápsula cromossômica

CPS: polissacarídeo capsular

CR-hvKp: hvKp resistente a carbapenêmicos

CRP-cAMP: proteína receptora de AMP cíclico

DO: densidade óptica

ent: gene para síntese de enterobactina

EPS: exopolissacarídeo

ESKAPE: grupo bacteriano considerado prioritário para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas, formado pelos seguintes patógenos *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter spp*

fuCI: gene de expressão de fucose isomerase

Fur: fator de transcrição responsivo ao ferro

hvKp-MDR: hvKp multirresistente

hvKp-XDR: hvKp extensivamente resistente

HvKp: linhagem hipervirulenta de *K. pneumoniae*

iro: gene para síntese de salmoquelina

iuc: gene para síntese de aerobactina

LB: meio de cultura Luria Bertani

LPS: lipopolissacarídeo

M9: meio mínimo formado por elementos inorgânicos conhecidos como sais minerais mínimos M9

MDR: multirresistência bacteriana

mrkA: gene de expressão de fímbrias do tipo 3

PDR: pan-resistente

PTS: sistemas de fosfotransferase de carboidratos

***rmpA* e *rmpA2*:** genes reguladores do fenótipo hipermucóide

***rrsH*:** gene do RNA ribossomal da unidade 16S

UFC: unidades formadoras de colônia

***ybt*:** gene para síntese de yersiniabactina

Sumário

1. Introdução.....	15
2. Revisão Bibliográfica.....	16
2.1 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	16
2.2 <i>K. pneumoniae</i> hipervirulentas (hvKp).....	18
2.3 Fatores de virulência.....	24
2.3.1 Cápsula.....	25
2.3.2 Biofilme.....	27
2.3.3 Fímbrias.....	32
2.3.4 Sideróforos.....	34
2.3.5 Resistência a antimicrobianos.....	37
2.4 Metabolismo de açúcares.....	41
3. Justificativa.....	47
4. Objetivos.....	47
5. Material e Métodos.....	48
5.1 Isolamento, crescimento e armazenamento das linhagens bacterianas.....	49
5.2 Meios de cultura e fontes de carbono.....	49
5.2.1 Meio LB.....	49
5.2.2 Meio Mínimo modificado.....	50
5.3 Curva de crescimento.....	50
5.4 Quantificação da produção de biofilme em superfície de poliestireno.....	51
5.5 Quantificação da produção de sideróforos.....	52
5.6 Sobrevivência em soro humano.....	53
5.7 qRT-PCR.....	54
5.7.1 Desenho dos primers.....	54
5.7.2 Extração de RNA e síntese de DNA complementar (cDNA).....	54
5.7.3 qRT-PCR.....	54
5.8 Análises estatísticas.....	55
6. Resultados e Discussão.....	55
6.1 Curva de crescimento.....	55
6.2 Quantificação da produção de biofilme em 24 horas.....	60
6.3 Quantificação da produção de biofilme em 5 dias.....	64
6.4 Quantificação da produção de sideróforos.....	68
6.5 Sobrevivência em soro humano.....	70

6.6 Quantificação da expressão gênica de mrkA e fucI por qRT-PCR.....	74
7. Conclusões.....	80
Referências bibliográficas.....	82

1. Introdução

Klebsiella pneumoniae é uma bactéria Gram negativa pertencente à família *Enterobacteriaceae* primordialmente associada a infecções oportunistas em ambiente hospitalar. Por portarem mecanismos de resistência antimicrobiana, infecções causadas por *K. pneumoniae* são, muitas vezes, de difícil tratamento. A bactéria pertence ao ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e espécies de *Enterobacter*) grupo bacteriano considerado prioritário para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas pela Organização Mundial da Saúde.

A natureza estritamente oportunista das infecções causadas por *K. pneumoniae* foi colocada a prova em 1980 quando a primeira linhagem hipervirulenta (hvKp) foi obtida a partir de um isolado de abscesso hepático (LIU *et al.*, 1986; CHIU *et al.*, 1988). Posteriormente, vários relatos de isolados hvKp foram publicados mundialmente (PU *et al.*, 2023).

Os isolados hvKp inicialmente não apresentavam resistência antimicrobiana. Atualmente, o isolamento de hvKp portadores de resistências múltiplas foram relatados em várias regiões do mundo (WYRES *et al.*, 2020; GU *et al.*, 2018; HAN *et al.*, 2022). Este cenário demonstra a necessidade urgente de entender os fatores de virulência associados à fisiologia bacteriana que promovem a disseminação e sobrevivência de hvKp. Além da resistência antimicrobiana, existem outros fatores que contribuem para o sucesso de infecção desse patógeno como por exemplo, a cápsula, o lipopolissacarídeo (LPS), os sideróforos, e as fímbrias. Além disso, tem-se descrito a importância da capacidade de formação de biofilme como um fator de virulência já que essa estrutura é capaz de promover um aumento da resistência aos mecanismos de defesa do hospedeiro e aos antimicrobianos (THORNTON *et al.*, 2012).

A sobrevivência e disseminação bacteriana no interior do hospedeiro demanda a utilização de nutrientes disponíveis e a expressão de fatores de virulência que promovem a colonização de tecidos. Neste sentido, a utilização das diferentes fontes de carbono no ambiente intra-hospedeiro pode estar associada ao potencial virulento de linhagens hvKp. Por estas razões, procuramos entender como a

utilização de carboidratos específicos pode estar associada ao *fitness*, à sobrevivência e à expressão de fatores de virulência de linhagens hvKp isoladas de um paciente com bacteremia (DE CAMPOS *et al.*, 2018).

2. Revisão Bibliográfica

2.1 *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella é um gênero pertencente à família *Enterobacteriaceae*, que compreende bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos, imóveis e produtores de cápsula mucoide. Inicialmente, esse gênero abrigava quatro espécies: *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella terrigena*, *Klebsiella planticola* e *Klebsiella pneumoniae* (LI *et al.*, 2014). Contudo, o sequenciamento completo do genoma (WGS) tem mostrado que uma quantidade significativa de isolados identificados como *K. pneumoniae*, por métodos bioquímicos e de proteômica, na verdade pertencem a espécies muito próximas que compartilham entre 95-96% de similaridade de nucleotídeos com *K. pneumoniae*. Esse grupo com tamanha similaridade é denominado de Complexo de espécies de *K. pneumoniae* (KpSC) e abriga as seguintes espécies: *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella quasipneumoniae subsp. quasipneumoniae*, *Klebsiella quasipneumoniae subsp. similipneumoniae*, *Klebsiella variicola subsp. variicola*, *Klebsiella variicola subsp. tropica*, *Klebsiella quasivariicola*, *Klebsiella africana* (HOLT *et al.*, 2015; RODRIGUES *et al.*, 2018) (Figura 1).

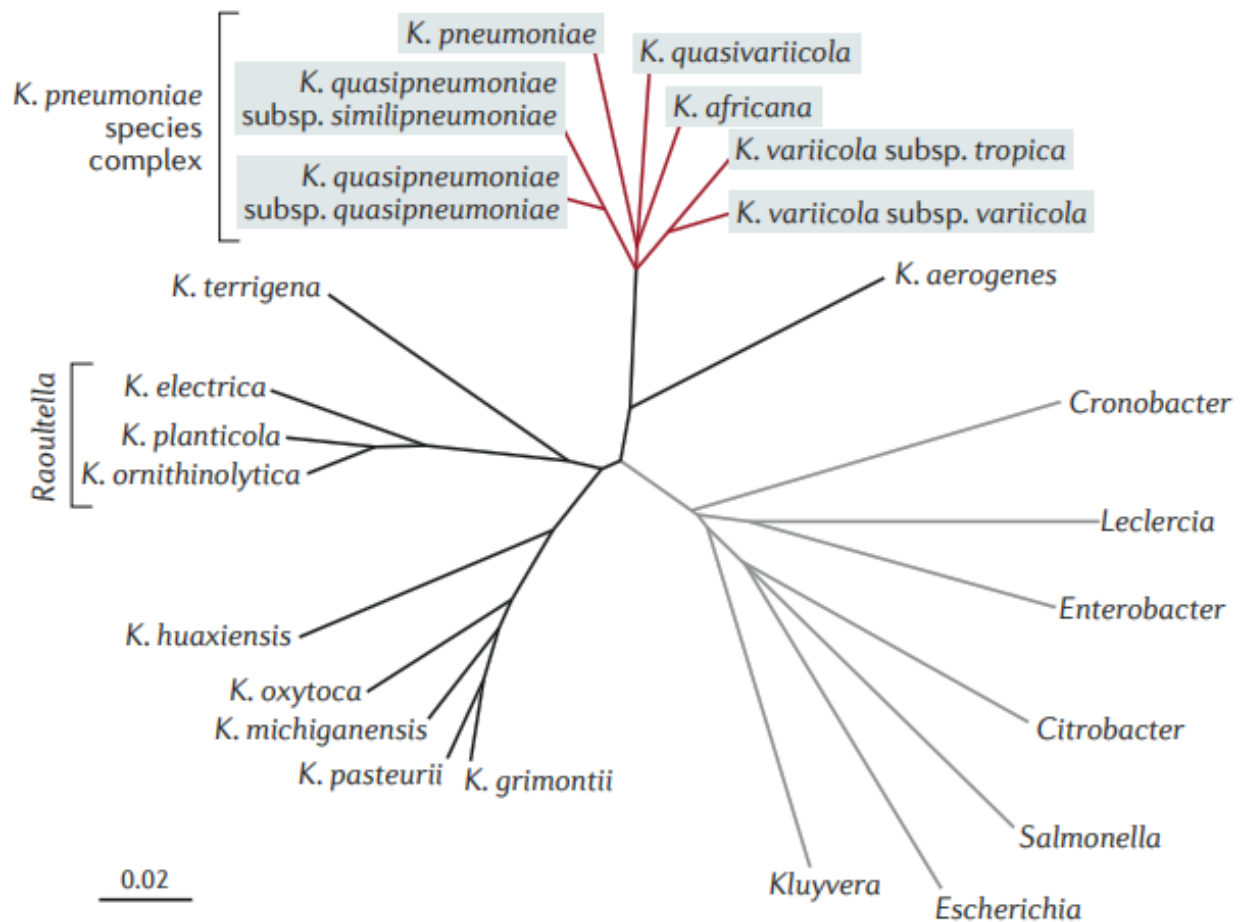


Figura 1. Árvore filogenética baseada na técnica de sequenciamento completo de genoma. Em vermelho podemos observar o complexo de espécies de *K. pneumoniae* (KpSC) com grande similaridade de nucleotídeos. Imagem retirada de *Population genomics of Klebsiella pneumoniae* (WYRES *et al.*, 2020).

As peculiaridades de cada uma dessas espécies ainda não foram completamente elucidadas. Contudo, todas são encontradas em amostras ambientais e em sítios de infecção em humanos e outros animais, mostrando resistência a múltiplas drogas e fenótipos virulentos em todo o mundo (ROCHA *et al.*, 2021).

K. pneumoniae é a espécie mais estudada dentro desse complexo, principalmente devido a sua relevância clínica em infecções adquiridas na comunidade ou em ambiente intra-hospitalar. Esse patógeno está incluído no grupo ESKAPE devido à sua associação com a disseminação de multirresistência bacteriana (MDR), sendo considerado um dos maiores desafios de saúde pública em todo o mundo (DE OLIVEIRA *et al.*, 2020).

K. pneumoniae é capaz de habitar uma grande diversidade de nichos como solo, água, espécies de plantas, insetos, pássaros, répteis, mamíferos. Nesses ambientes pode ser encontrada de forma livre ou associada a um hospedeiro. Também pode estar em uma relação comensal ou como um patógeno potencial (WYRES *et al.*, 2018). Contudo, observa-se que a maior parte das vezes esse microrganismo é identificado em ambientes hospitalares causando algum tipo de infecção. As principais síndromes causadas por esse patógeno são pneumonia, infecções do trato urinário (ITUs), infecções abdominais, infecções em dispositivos intravasculares, infecções em sítios cirúrgicos e bacteremia (POMAKOVA *et al.*, 2012) e são causadas por linhagens conhecidas como *K. pneumoniae* clássica (cKp). A aquisição de multirresistência por cKp principalmente devido a aquisição de betalactamases de espectro estendido (BLSEs) e carbapenamases tem sido um dos motivos pelos quais esse patógeno se tornou tão bem-sucedido e perigoso em ambientes hospitalares (MOELLERING *et al.*, 2010; POMAKOVA *et al.*, 2012).

Nas últimas décadas, uma nova variante de *K. pneumoniae* conhecida como hipervirulenta (hvKp) vem sendo relatada. Esse microrganismo apresenta características diferentes de cKp principalmente em relação ao seu potencial virulento.

2.2 *K. pneumoniae* hipervirulentas (hvKp)

A variante de *K. pneumoniae* denominada hvKp (*Hyper Virulent K. pneumoniae*) foi primeiramente descrita em meados de 1980 em Taiwan em casos de abscessos hepáticos adquiridos na comunidade por pacientes que não apresentavam nenhum imunocomprometimento. Essa variante apresentava como característica principal a produção de hiper mucoviscosidade. Além dos abscessos hepáticos, esses pacientes ainda apresentavam outras patologias concomitantes, como meningites e endoftalmias (LIU *et al.*, 1986; CHIU *et al.*, 1988).

Após o primeiro relato de infecção causada por hvKp, outros casos foram observados na Ásia, Europa e América. Embora a disseminação endêmica tenha ocorrido principalmente em países da Ásia como Taiwan, China, Coreia do Sul e Irã, esta variante apresenta distribuição mundial. A

quantidade de doenças associadas a hvKp é extensa, contudo, já se tem definidos os principais sítios de infecções causadas por essa variante (Figura 2) (PU *et al.*, 2023).

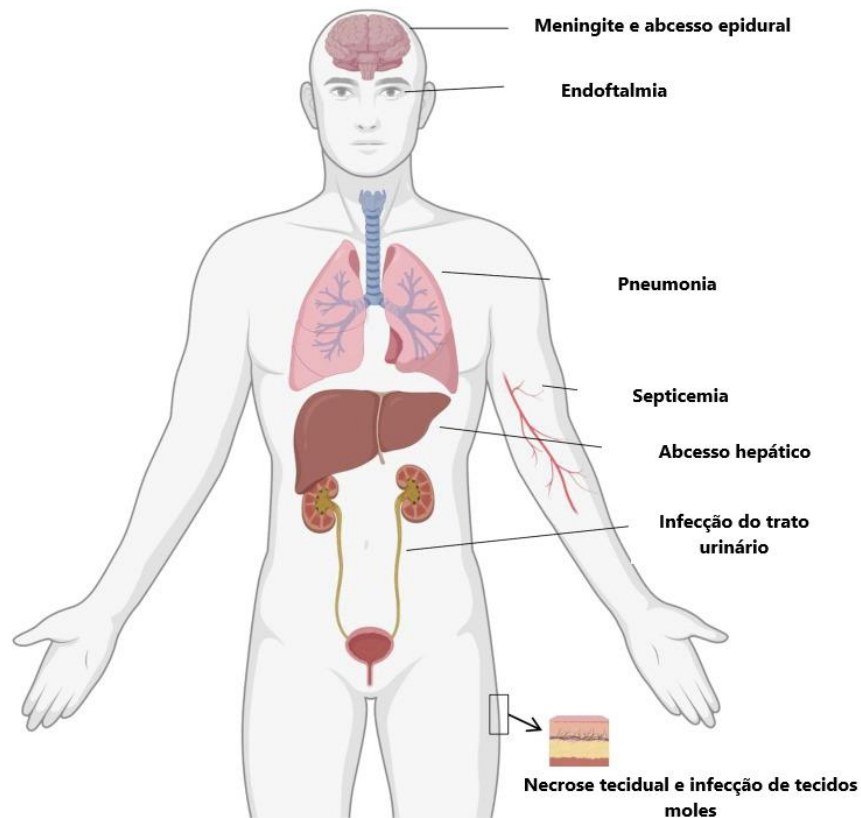


Figura 2: Principais sítios de infecções causadas por hvKp. Imagem retirada de “*Superbugs*” with hypervirulence and carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae*: the rise of such emerging nosocomial pathogens in China (PU *et al.*, 2023).

O fenótipo da hipermucoviscosidade foi inicialmente indicado como uma forma de identificação de hvKp. Para identificar esse fenótipo, a linhagem deve apresentar um “string test” positivo (Figura 3) (FANG *et al.*, 2004).

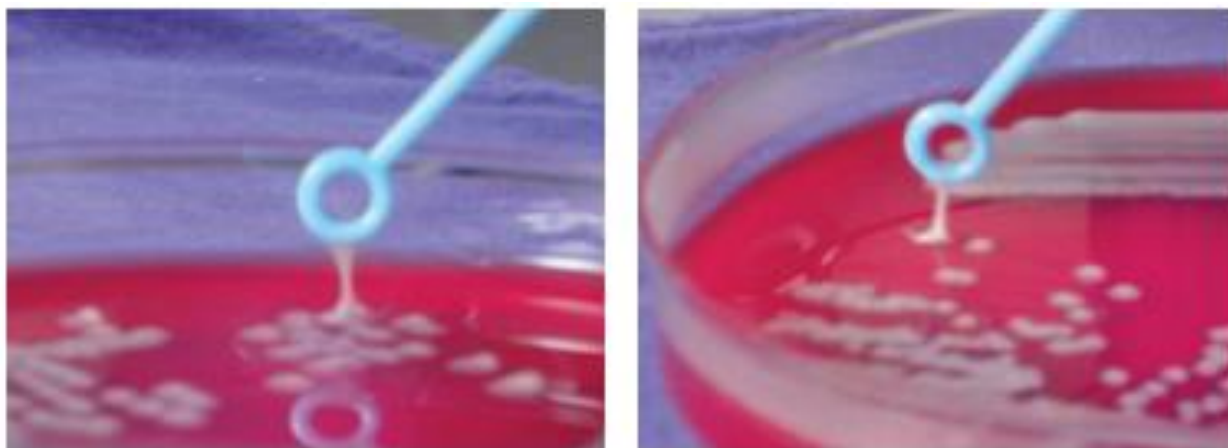


Figura 3: Resultado de um "string test" positivo de *K. pneumoniae*. Para um resultado positivo, ao tocar com uma alça de inoculação em uma colônia isolada cultivada em ágar sangue, deve ocorrer a formação de uma corda viscosa com mais de 5 mm de comprimento. Imagem de *Klebsiella pneumoniae liver abscess: a new invasive syndrome* (SIU *et al.*, 2012).

Entretanto, posteriormente, observou-se que nem todas as linhagens hvKp apresentavam hipermucoviscosidade e que algumas linhagens cKp apresentavam esse fenótipo (CATALAN-NAJERA *et al.*, 2017; RUSSO *et al.*, 2018). Atualmente, a identificação de estirpes hvKp tornou-se mais complexa e verifica-se que a maioria das linhagens apresentam genes codificando os sideróforos *iro* (síntese de salmoquelina), *iuc* (síntese de aerobactina), *rmpA* e *rmpA2* (reguladores do fenótipo hipermucóide (RUSSO *et al.*, 2018; LAM *et al.*, 2018). Esses genes frequentemente estão presentes em dois grandes plasmídeos de virulência bastante semelhantes: pK2044 (224.152 bp) e pLVPK (219.385 bp) (Figura 4) (CHEN *et al.*, 2004; WU *et al.*, 2009). Estudos indicam que a perda desses plasmídeos provoca uma diminuição significativa da virulência dessas linhagens (NASSRF X *et al.*, 1986; NASSRF X *et al.*, 1989; TANG *et al.*, 2010).

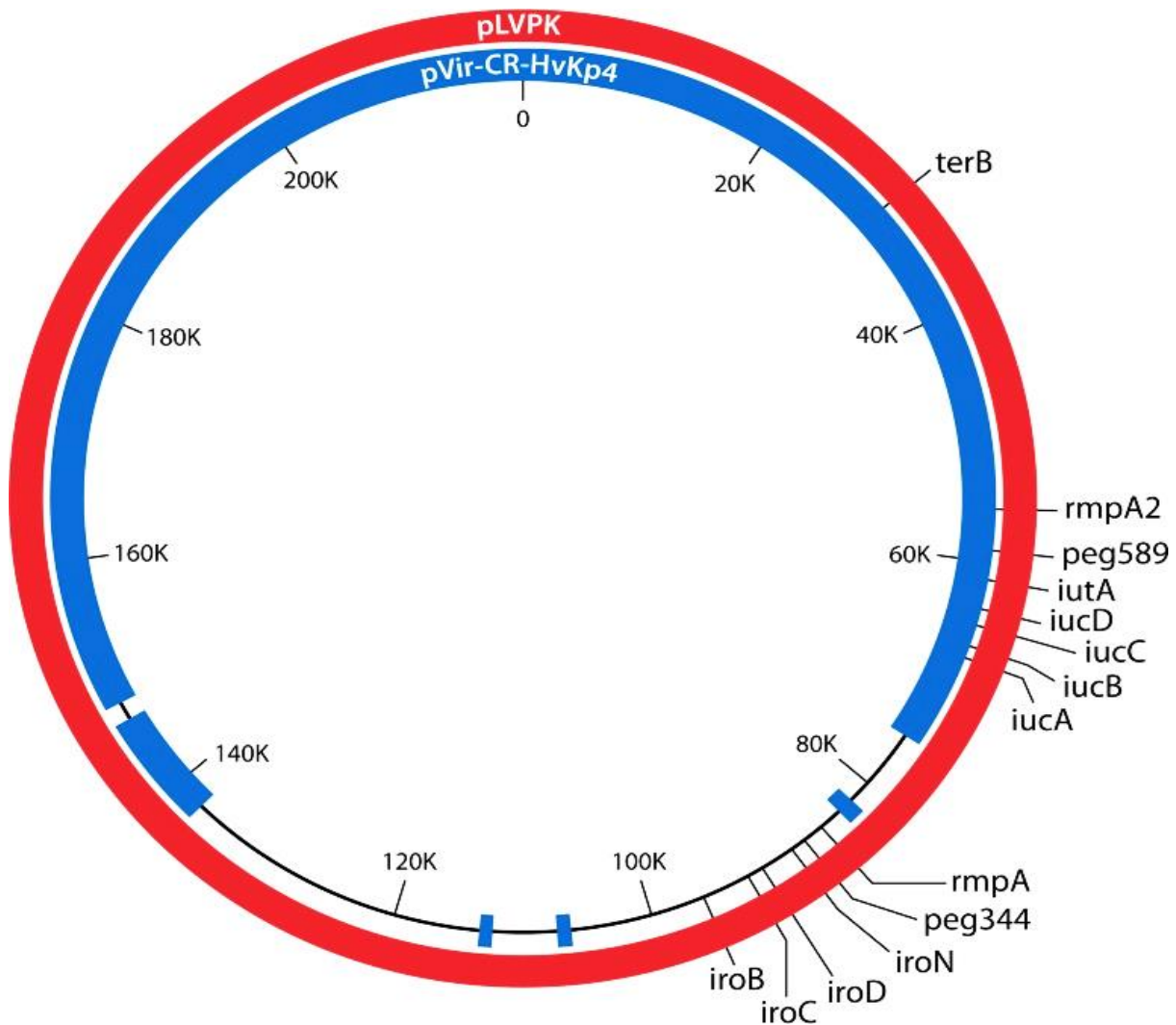


Figura 4: Plasmídeos pLVPK (vermelho) e pVir-CR-HvKp4 (azul) portadores de diversos genes de virulência associados as linhagens hvKp. Imagem obtida de *Hypervirulent Klebsiella pneumoniae* (RUSSO *et al.*, 2019).

Além dos fatores de virulência que contribuía para a patogenicidade de toda linhagem de *K. pneumoniae* como cápsula, fímbrias, LPS e sideróforos do tipo enterobactina (*ent*) e yersiniabactina (*ybt*), as linhagens hvKp possuem outros fatores que potencializam sua virulência e patogenicidade. Esses fatores incluía os plasmídeos mencionados que codificam os genes de virulência *rmpA/rmpA2* (regulador do fenótipo hiper mucoviscoso), sideróforos salmoquelina (*iro*) e aerobactina (*iuc*), bem como a toxina secretada colibactina (*clb*) codificada por um elemento

integrativo e conjugativo no cromossomo. Todos esse fatores juntos, definem as características necessárias para a caracterização de hvKp (Figura 5) (CHOBY *et al.*, 2020).

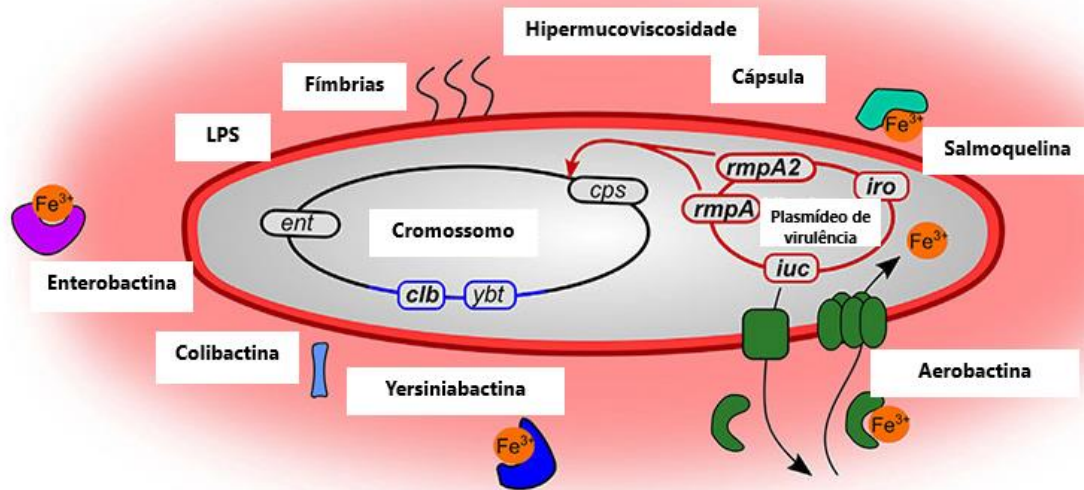


Figura 5: Fatores de virulência para a caracterização de hvKp. Além dos fatores de virulência característicos de todas as *K. pneumoniae* como cápsula, fímbrias, LPS e sistema de sideróforos yersiniabactina (*ybt*) e enterobactina (*ent*), temos também os genes responsáveis pela hipermucoviscosidade (*rmpA/rmpA2*), salmoquelina (*iro*) e aerobactina (*iuc*). Além disso, temos os genes codificados por cromossomos *clb*, que codifica a toxina secretada colibactina e o gene *cps* que regula os *loci* da cápsula cromossômica. Esse gene *cps* produz a hipercápsula associada ao fenótipo hipermucoviscoso quando reguladas pelos reguladores transcricionais *rmpA* e *rmpA2*. Juntos, esses fatores caracterizam as linhagens de *K. pneumoniae* hipervirulentas. Imagem retirada de *Hypervirulent Klebsiella pneumoniae – clinical and molecular perspectives* (CHOBY *et al.*, 2020).

Os primeiros isolados hvKp, apresentavam grande suscetibilidade a antimicrobianos, contudo, esse perfil está mudando e um novo desafio tem se apresentado. Atualmente, umas das questões de maior relevância e preocupação é a junção da ampla resistência antimicrobiana das linhagens cKp com os fatores de virulência presentes em hvKp. O resultado desse fenômeno é a identificação cada vez mais frequente de linhagens hvKp-MDR (hvKp *multidrug resistant*) e hvKp-XDR (hvKp *extremely drug resistant*). Isso ocorre por meio de alguns mecanismos: aquisição de plasmídeos de resistência antimicrobiana por hvKp (WEI *et al.*, 2016; FENG *et al.*, 2018); a inserção de elementos

de resistência no plasmídeo de virulência característico de hvKp (ZHANG *et al.*, 2016; FU *et al.*, 2018); e a aquisição do plasmídeo de virulência de hvKp por linhagens cKp-XDR (GU *et al.*, 2018).

Dessa forma, as linhagens hvKp-MDR são portadoras de enzimas beta lactamases de espectro estendido (BLSE) ou carbapenamases (WYRES *et al.*, 2020) e passam a ser nomeadas como CR-hvKp (*carbapenem-resistant hypervirulent K. pneumoniae*). As CR-hvKp podem carregar uma série de genes de resistência como *bla*_{IMP}, *bla*_{KPC} e *bla*_{NDM}, mas a maioria dos isolados clínicos desse tipo são portadores do gene *bla*_{KPC} (LI *et al.*, 2022). Então, CR-hvKP exibe fenótipos de hipervirulência e resistência antimicrobiana podendo causar infecções graves de difícil tratamento (GU *et al.*, 2018). Atualmente, o CR-hvKP já se espalhou pelo mundo (Figura 6) e representa uma grande ameaça à saúde pública mundial (HAN *et al.*, 2022).

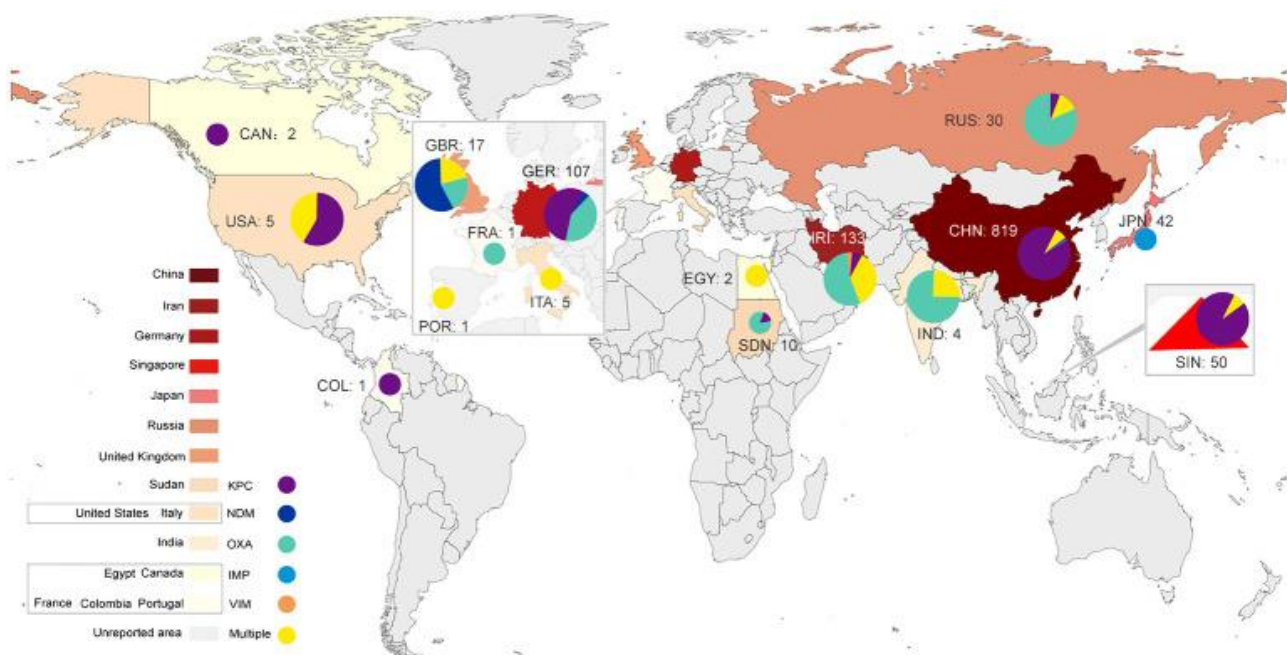


Figura 6: Distribuição global de CR-hvKp entre 2015 e 2022. Os círculos coloridos indicam o gene encontrado promovendo a multirresistência de hvKp, KPC (carbapenemase de *Klebsiella pneumoniae*); NDM (metalo- β -lactamase de Nova Delhi); VIM (metalo- β -lactamase codificada por integron de Verona); IMP (imipenemase); OXA (oxacilinase). Imagem retirada de *Epidemiological characteristics and molecular evolution mechanisms of carbapenem-resistant hypervirulent Klebsiella pneumoniae* (HAN *et al.*, 2022).

2.3 Fatores de virulência

Uma grande quantidade de fatores de virulência já foi descrita em *K. pneumoniae*, como fímbrias, cápsula, lipopolissacarídeo (LPS), sideróforos etc (Figura 7). Esses fatores possuem uma grande relevância na sobrevivência e patogênese desse microrganismo (KARAMPATAKIS *et al.*, 2023). Além desses, existem ainda outros fatores de virulência como a produção de biofilme e a resistência a antimicrobianos que contribuem de forma significativa para a virulência desses patógenos.

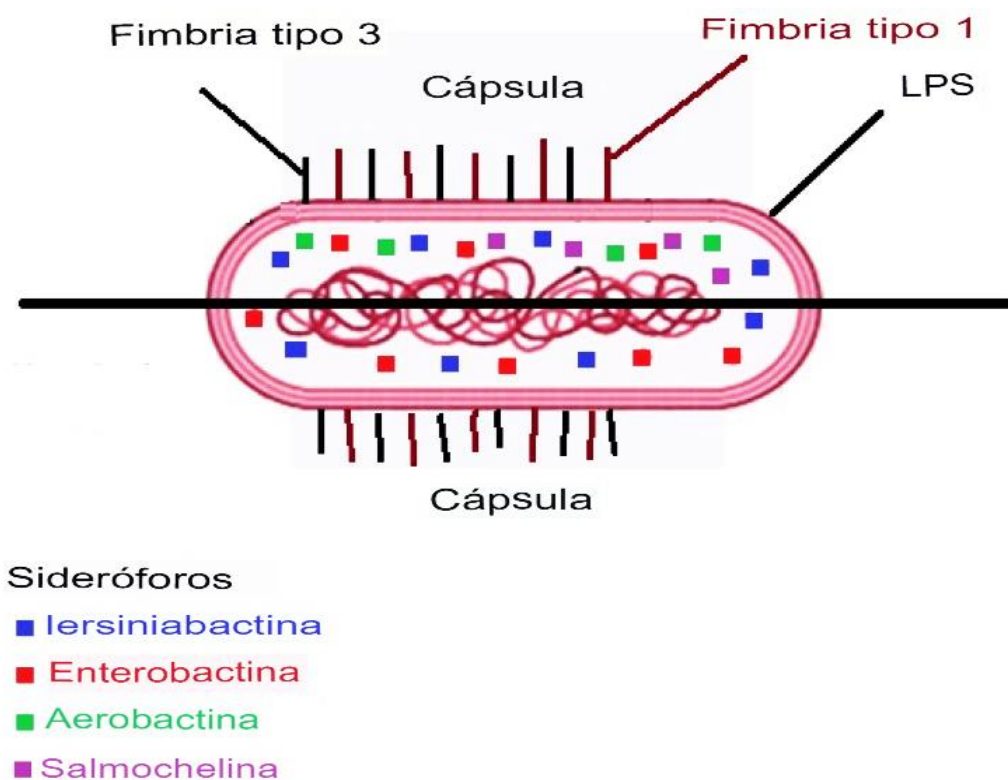


Figura 7: Fatores de virulência de *K. pneumoniae*. Fímbrias do tipo 1 e tipo 3 responsáveis pelo processo de adesão, colonização e formação de biofilme em superfícies bióticas e abióticas. A cápsula polissacarídica responsável pela evasão do sistema imune do hospedeiro. Lipopolissacarídeo (LPS) responsável pela proteção do sistema complemento do hospedeiro juntamente com a cápsula. Sideróforos que participam no processo de patogênese bacteriana e captam o ferro do hospedeiro. Os principais sideróforos descritos são yersiniabactina, enterobactina, aerobactina e salmoquelina. Imagem adaptada de *Carbapenem-Resistant Klebsiella pneumoniae: Virulence Factors, Molecular Epidemiology and Latest Updates in Treatment Options* (KARAMPATAKIS *et al.*, 2023).

2.3.1 Cápsula

A cápsula polissacarídica de *K. pneumoniae* é considerado o fator de virulência central da bactéria. A estrutura é a camada mais externa da célula e interage diretamente com o hospedeiro. A cápsula é produto da polimerização dependente de *wzx/wzy* codificada pelo *cluster* gênico *cps*. A cápsula é uma barreira de proteção da célula bacteriana aos mecanismos do sistema imune do hospedeiro como a fagocitose, proteínas do sistema complemento, opsonofagocitose, estresse oxidativo e peptídeos antimicrobianos. Além disso, também protege a bactéria contra dissecação e ajuda no processo de osmorregulação (PACZOSA *et al.*, 2016; HUANG *et al.*, 2022; PAN *et al.*, 2015; WHITFIELD *et al.*, 2020).

Os antígenos capsulares, conhecidos como antígenos K, compõem a cápsula e são formados por 3 a 6 monossacarídeos em sua cadeia principal e ramificações. Esses monossacarídeos formadores incluem manose, glicose, galactose, fucose e ramnose. Moléculas como Piruvato, O-acetil e O-formil estão envolvidos na modificação dos polissacarídeos, o que leva à diversidade entre as cápsulas que influenciam os níveis de imunogenicidade e virulência de *K. pneumoniae* (NONNE *et al.*, 2024). Os antígenos K são o critério utilizado para classificação e sorotipagem das linhagens de *K. pneumoniae*. Atualmente, mais de 80 sorotipos de cepas patogênicas são reconhecidas de acordo com essa classificação (LI *et al.*, 2014).

A produção de cápsula por *K. pneumoniae* é um processo complexo que envolve uma grande quantidade de genes. Os *clusters* responsáveis pela codificação da cápsula estão presentes no cromossomo e em plasmídeos. Um desses *clusters* é o *cps* que inclui mais de 20 genes, de *galF* a *ugd* envolvidos na síntese de cápsula (Figura 8). Existem três promotores que estão presentes no locus *cps* que são *galF*, *wzi* e *manC*. A extremidade 5' da região *cps* é um *cluster* altamente conservado composto por *galF*, *cpsACP*, *wzi*, *wza*, *wzb* e *wzc* envolvido na translocação, transporte e processamento de polissacarídeos capsulares. A extremidade 3' contém os genes conservados *gnd* e *ugd*. A região intermediária é altamente variável e compreende genes específicos que codificam proteínas que são essenciais para a polimerização e montagem de subunidades de polissacarídeos. Esta região normalmente contém genes que codificam glicosil transferases (GTs), translocases,

polimerases e enzimas modificadoras, que variam entre os diferentes sorotipos de cápsula. Cada gene estrutural tem um impacto distinto no nível de virulência (SHU *et al.*, 2009; XU *et al.*, 2024).



Figura 8: Esquema do cluster de genes de biossíntese de CPS (polissacarídeo capsular). As setas em preto indicam os três promotores da região de síntese CPS, os genes azuis são altamente conservados em diferentes sorotipos e os genes vermelhos mostram aqueles que são altamente variáveis. Imagem adaptada de *Klebsiella pneumoniae capsular polysaccharide: Mechanism in regulation of synthesis, virulence, and pathogenicity* (XU *et al.*, 2024).

K. pneumoniae sintetiza seu CPS (polissacarídeo capsular) por meio do mecanismo dependente de *wzx/wzy*, que envolve biossíntese e exportação (PATRO *et al.*, 2020). Uma das primeiras etapas da biossíntese é a glicosilação das unidades repetitivas de monossacarídeos, realizada por *wbaP* ou *wcaJ* (DEVANGA RAGUPATHI *et al.*, 2020). A flipase codificada por *wzx* transporta a unidade de repetição para o lado periplasmático da membrana interna, e a copolimerase codificada por *wzy* promove a polimerização da unidade de repetição através de um mecanismo de captura e liberação (ISLAM *et al.*, 2014).

Em seguida, proteínas codificadas por *wza* (um translocon de membrana externa) e *wzc* (uma tirosina autoquinase) formam um complexo de translocação que está envolvido na montagem do CPS e no seu transporte do periplasma para a superfície celular bacteriana (PAN *et al.*, 2013). A inibição da via dependente de *Wzy* interrompe a síntese do peptidoglicano da parede celular e normalmente resulta em defeitos no formato da célula. Mutantes *wzy*, *wza* e *wcaJ* apresentam uma redução na biossíntese da cápsula, e os mutantes *wzy* e *wza* também apresentam defeitos substanciais na estabilidade do envelope celular (TAN *et al.*, 2020). Por fim, o CPS é então ancorado em uma proteína da membrana externa codificada por *wzi*, que não é considerada necessária para a biossíntese da cápsula, mas desempenha uma função vital na fixação da superfície da cápsula, de modo que os

mutantes de *wzi* têm um fenótipo capsular deficiente (BRISSE *et al.*, 2013). Além de todos os genes mencionados acima necessários para que ocorra a síntese da cápsula bacteriana, ainda existem os genes reguladores desse processo como os genes A e B (*rcaA* e *rcaB*) que regulam a síntese da cápsula, reguladores de virulência de *Klebsiella* (*kvrA* e *kvrB*) e o regulador do fenótipo mucóide A e A2 (*rmpA* e *rmpA2*). Dessa forma, verifica-se a complexidade do processo de síntese da cápsula de *K. pneumoniae*.

Além disso, alguns sorotipos capsulares são considerados mais patogênicos que outros, vários estudos sugerem que os sorotipos K1 e K2 são mais virulentos que outros sorotipos (YEH *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2017). A ausência de manose e ramnose na composição de sua cápsula está associada a virulência, uma vez que estes carboidratos podem ser reconhecidos pelos receptores de lectina de macrófagos, promovendo a fagocitose bacteriana (FUNG *et al.*, 2002). Esses sorotipos mais virulentos (K1 e K2) possuem fucose em sua cápsula. Esse carboidrato é obtido a partir da conversão de manose realizada pelos genes *gmd* e *wcaG* (PAN *et al.*, 2011). Inclusive, a presença de fucose na cápsula seria responsável pela característica hiper mucoviscosa presente em grande parte das cepas desses dois sorotipos (LIN *et al.*, 2018).

Por fim, a cápsula é também um fator de grande relevância na produção de biofilme. Ela afeta diferentes estágios da formação dessa estrutura, ela controla o processo de adesão inicial, a distribuição espacial bacteriana ao longo da maturação do biofilme e por fim, garante a formação de uma estrutura tridimensional típica no biofilme maduro (BALESTRINO *et al.*, 2008).

2.3.2 Biofilme

O biofilme é uma comunidade de microrganismos envoltos em uma matriz polissacarídica, DNA extracelular e proteínas. Os biofilmes podem se formar em superfícies bióticas como diversos locais do corpo humano (dentes, pele, pulmões, bexiga) ou podem se formar também em superfícies abióticas como dispositivos hospitalares (cateteres, tubos endotraqueais, implantes articulares) (HØIBY *et al.*, 2011).

As estruturas mais importantes envolvidas nesse processo são as fímbrias do tipo 3 e os CPS. As fímbrias promovem uma adesão estável, enquanto os CPS afetam a estrutura do biofilme e a comunicação intercelular. Dada a dinâmica da formação de biofilme e a variabilidade dos estímulos ambientais, as bactérias compondo essa estrutura devem ter a capacidade de alterar rápida e extensivamente sua expressão genética (CLEGG *et al.*, 2017).

A produção de biofilme é considerada um importante fator de virulência por promover um aumento da resistência aos mecanismos de defesa do hospedeiro e aos antimicrobianos (THORNTON *et al.*, 2012). A matriz polissacarídica impede a proximidade dos anticorpos hospedeiros e dos peptídeos antimicrobianos o que diminui os efeitos do sistema complemento e da fagocitose sobre o patógeno (FUX *et al.* 2005). Comparando com células plantônicas, estudos mostram que as células bacterianas em biofilme são mil vezes mais resistentes aos antibióticos. Isso devido às camadas de matriz exopolissacarídica, da expressão aumentada de bombas de efluxo e da presença de células persistentes (SINGH *et al.*, 2022). Um outro dado importante para entender a dimensão da importância de se estudar esse fator de virulência é que, atualmente, entre 60-80% das infecções bacterianas estão associadas à formação de biofilme (RIBEIRO *et al.*, 2016).

O biofilme é o resultado de uma série de eventos que começam com o contato de bactérias plantônicas com uma superfície. A evolução das bactérias do estado plantônico para o estado de biofilme é um processo complexo regulado por fatores genéticos e ambientais. Os genes envolvidos na formação de biofilme de *K. pneumoniae* incluem principalmente fímbrias, polissacarídeos, sistema de *quorum sensing* (QS), bomba de efluxo etc (SCHROLL *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2020; GUERRA *et al.*, 2022). Essa formação ocorre em quatro estágios (Figura 9) , (1) a ligação bacteriana de forma reversível; (2) adesão e proliferação; (3) maturação do biofilme; e (4) difusão de biofilme (ALAV *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2020). As bactérias plantônicas respondem a vários estímulos ambientais e fixam-se às superfícies para formar colônias. Após a formação das colônias, a bactéria produz uma matriz composta por polissacarídeos, proteínas e lipídios, e a colônia amadurece em colônias maiores. Nesta fase, as bactérias podem separar-se do biofilme e retornar ao estado flutuante ou continuar no

biofilme. A composição do biofilme, em termos de porcentagem de proteína, açúcar e DNA extracelular varia entre isolados de diferentes locais de infecção (SINGH *et al.*, 2019).

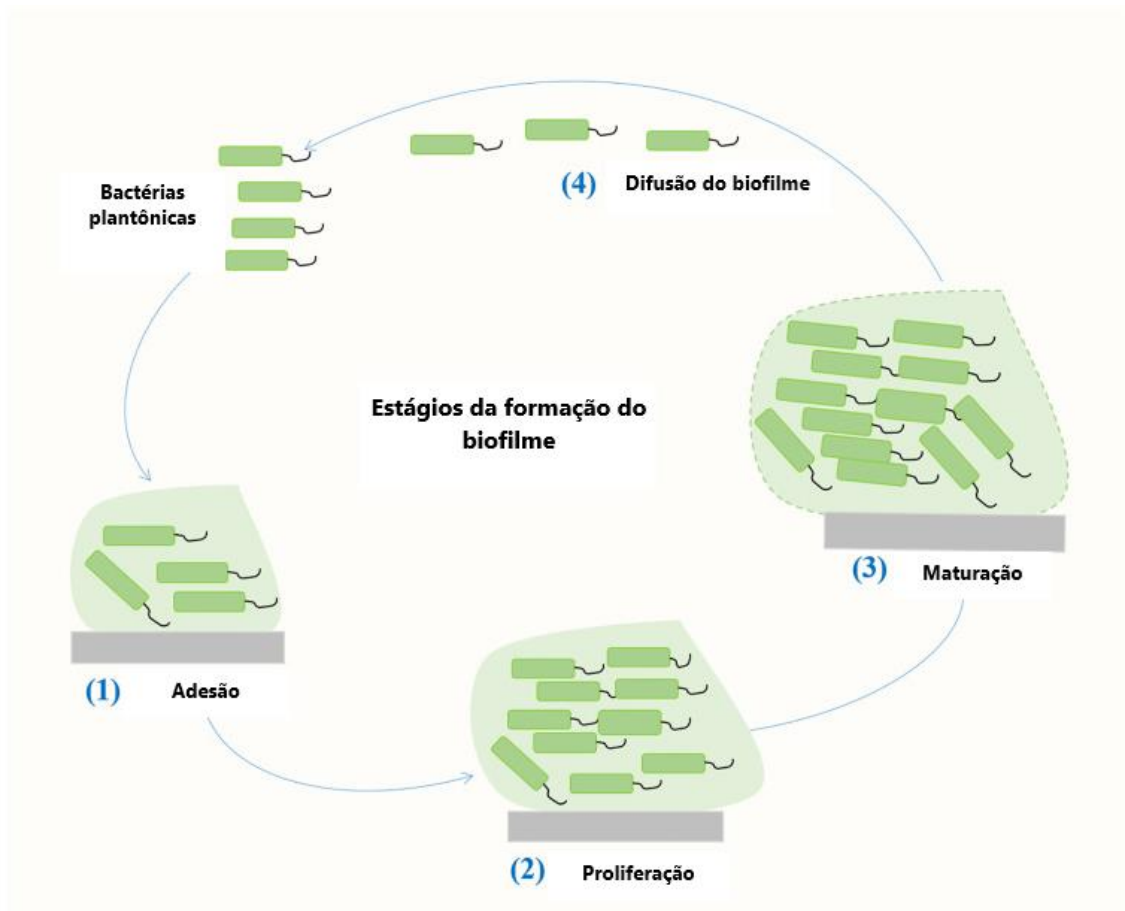


Figura 9: Esquema dos estágios de formação de biofilme. As células planctônicas realizam uma adesão inicial à superfície (1), em seguida ocorre a proliferação dessas células aderidas (2) e essa estrutura vai amadurecendo em colônias bacterianas maiores e mais complexas (3). Nessa fase, pode ocorrer a difusão do biofilme (4) em que células bacterianas se separam e voltam a ficar em sua forma planctônica ou continuam no biofilme. Imagem retirada de *Relationship between biofilm formation and antibiotic resistance of Klebsiella pneumoniae and updates on antibiofilm therapeutic strategies* (LI *et al.*, 2024)

Existe uma grande quantidade de genes estudados de diversas vias e processos fisiológicos bacterianos que são capazes de influenciar na formação do biofilme, como genes relacionados ao LPS, à cápsula, às fímbrias, ao *quorum sensing*, às bombas de efluxo, etc (Figura 10). Estudos mostram, por exemplo, que o LPS está envolvido na adesão inicial bacteriana em vidro e em superfícies de cloreto de polivinila (PVC). Os genes que estão relacionados à síntese de LPS e capazes de influenciar

na formação de biofilme são: *wzm* (via de transporte de LPS) e *wbbM* (biossíntese de LPS; BALESTRINO *et al.*, 2008).

Além disso, temos os genes relacionados à cápsula e que afetam esse processo, mutações no *loci* CPS nos genes *wza* e *wzc* resultam em formação deficiente de biofilme. A produção de CPS relacionadas aos genes *treC* (uma enzima que divide a trealose-6-fosfato em glicose e glicose-6-fosfato) e *sugE* (codifica uma proteína da membrana interna com uma cauda voltada para o citoplasma) afetam a formação de biofilme por meio da modulação dessa produção (WU *et al.*, 2011).

Fímbrias tipo 1 e tipo 3 também estão associadas à produção de biofilme. Estudos envolvendo mutantes de fímbrias tipo 1 (C3091 Δ *fim*), mutante de fímbrias tipo 3 (C3091 Δ *mrk*) e mutante duplo (C3091 Δ *fim* Δ *mrk*) mostraram que as fímbrias do tipo 3 são importantes para a fixação bacteriana na formação de biofilme (SCHROLL *et al.*, 2010). Contudo, outros estudos mostram uma atenuação significativa de biofilme em cateteres na ausência tanto de um quanto do outro tipo de fímbria, mostrando que cada uma tem o seu papel na colonização bacteriana e na formação de biofilme (STAHLHUT *et al.*, 2012). As fímbrias do tipo 3 formadas pelas hemaglutininas do tipo *Klebsiella* resistentes a manose (MR/K) são codificadas pelo operon *mrkABCDF* e as mutações dos genes desse operon são extremamente deletérias para a produção de biofilme (WILKSCH *et al.*, 2011). O diguanilato cíclico intracelular (c-di-GMP) é um segundo mensageiro em bactérias, que está envolvido na formação de biofilme bacteriano. O ativador transcricional MrkH dependente de c-di-GMP liga-se ao operon *mrkABCDF* e ativa a expressão de fímbrias do tipo 3 (TAN *et al.*, 2015).

O sistema de *quorum sensing* (QS) promove a maturação do biofilme através da detecção de moléculas sinalizadoras bacterianas e da coordenação da densidade populacional bacteriana. O QS tipo II é um sistema de comunicação bacteriana dependente de *luxS* e que possui como molécula sinalizadora o autoindutor-2 (AI-2). A deleção de *luxS* leva a uma mudança na arquitetura do biofilme com menos cobertura de superfície e redução da formação de macrocolônias. A deleção desse gene também promove a diminuição da expressão do gene de biossíntese de lipopolissacarídeo *wzm* que também afeta a produção de biofilme (BALESTRINO *et al.*, 2005; CHEN *et al.*, 2020).

As bombas de efluxo desempenham diversos papéis relevantes para o biofilme, promovem o efluxo de moléculas de EPS e/ou QS para promover a formação de matriz de biofilme; regulam genes envolvidos na formação de biofilme; promovem o efluxo de moléculas prejudiciais, como antibióticos e intermediários metabólicos; controlam a agregação promovendo ou impedindo a adesão a superfícies e a outras células (ALAV *et al.*, 2018). Os níveis transcricionais dos genes codificadores de bombas de efluxo *acrA*, *emrB*, *oqxA*, e *qacEΔ1* em biofilmes de *K. pneumoniae* estão aumentados quando comparamos com os níveis em células planctônicas. Além disso, os estudos de (KVIST *et al.* 2008) relataram que os inibidores de bombas de efluxo (EPIs) afetam significativamente a formação de biofilme de *Klebsiella* uropatogênica, e combinações de diferentes tipos de EPIs resultaram em quase 100% de inibição da formação de biofilme bacteriano, mostrando a relevância que as bombas de efluxo possuem na formação de biofilme.

Além de todos os genes mencionados de diferentes vias que afetam a produção de biofilme, ainda existem os fatores ambientais. Temperatura, pH, disponibilidade de nutrientes, composição do substrato, entre outros, possuem a capacidade direta de afetar a formação de biofilmes bacterianos (RIBEIRO *et al.*, 2016) (Figura 10).

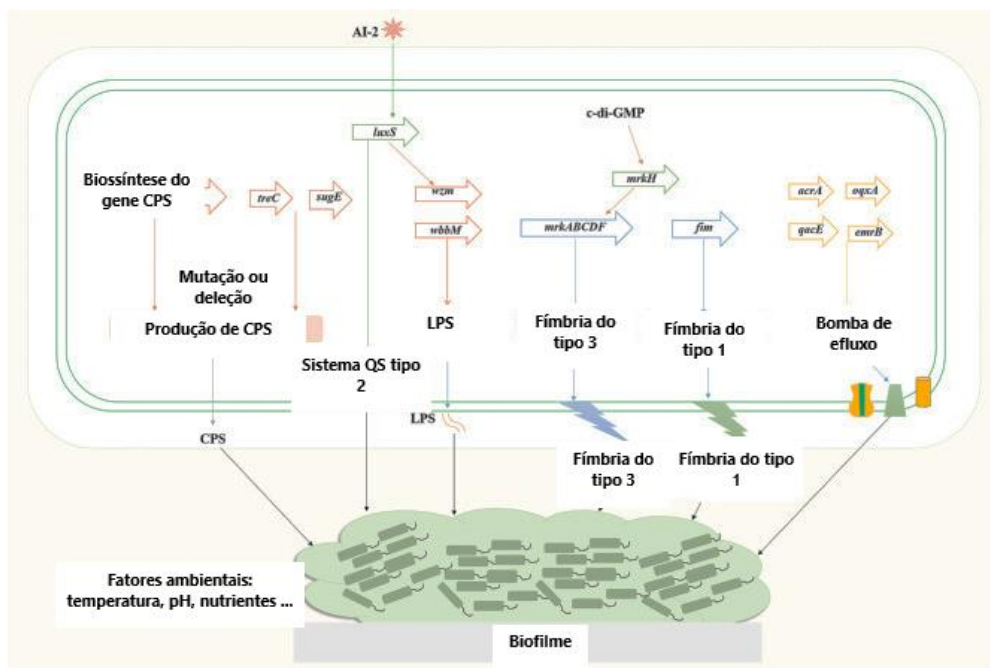


Figura 10: Genes que participam da regulação da produção de biofilme. Os genes mencionados estão relacionados ao LPS, à cápsula bacteriana, às fímbrias, ao quorum sensing, às bombas de efluxo.

Imagem retirada de *Relationship between biofilm formation and antibiotic resistance of Klebsiella pneumoniae and updates on antibiofilm therapeutic strategies* (LI *et al.*, 2024).

2.3.3 Fímbrias

As fímbrias são apêndices proteicos que se estendem a partir da superfície celular bacteriana. *K. pneumoniae* é capaz de codificar uma diversidade de fímbrias, mas as principais são as fímbrias do tipo 1 e do tipo 3, que são codificadas pelos *clusters fim* e *mrk* respectivamente (WILKSCH *et al.*, 2011; ALCÁNTAR-CURIE *et al.*, 2013).

As fímbrias do tipo 3 são formadas pela proteína Mrk, que é codificada pelo operon contendo os genes *mrkABCDF* (ALLEN *et al.*, 1991). A parte principal é a subunidade *mrkA*, de forma que os mutantes $\Delta mrkA$ são incapazes de se aderir a superfícies para formar o biofilme e durante o espessamento do biofilme esse gene mantém sua expressão aumentada (DI MARTINO *et al.*, 2003; VUOTTO *et al.*, 2017). *mrkB* codifica uma chaperona periplasmática, *mrkC* uma translocatase e *mrkD* é responsável por codificar uma proteína presente na parte superior da superfície das fímbrias, que promove a adesão e determina a especificidade da ligação (MURPHY *et al.*, 2012). Para a formação de biofilme, *mrkA* e *mrkD* representam os papéis centrais, *mrkA* contribui para a rápida formação do biofilme e *mrkD* para a formação de um biofilme denso (ASHWATH *et al.*, 2022).

O *cluster* de genes *mrkHIJ* adjacente ao operon *mrkABCDF* é que regula a expressão de fímbrias do tipo 3. MrkH é um ativador de transcrição do *cluster mrk*, que regula a expressão de *mrkHI* e contém o domínio PilZ. O MrkH liga-se à região adjacente ao promotor *mrkA* e ativa a expressão do operon *mrkABCDF*. Portanto, *mrkH* é frequentemente referido como um “interruptor de biofilme”, pois pode iniciar a expressão de genes envolvidos na produção de fímbrias do tipo 3 (WILKSCH *et al.*, 2011; TAN *et al.*, 2015). A transcrição de *mrkHI* pode ser ativada por MrkI que é um fator regulatório semelhante ao LuxR. A ausência de *mrkI* promove a redução de fímbrias do tipo 3 na superfície bacteriana mostrando esse importante papel regulatório na expressão dessa fímbria (WU *et al.*, 2012; JOHNSON *et al.*, 2011). A expressão de *mrkHI* também é regulada ativamente por

Fur (fator de transcrição responsivo ao ferro), a deleção de Fur reduz a transcrição de *mrkH*, *mrkI* e *mrkA*, reduzindo assim a expressão de fímbrias tipo 3 (WU *et al.*, 2012).

As fímbrias do tipo 3 também realizam a mediação da transformação do modo de crescimento bacteriano de plantônico para biofilme por meio do segundo mensageiro c-di-GMP. A atividade da diguanilato ciclase (DGC) e da fosfodiesterase (PDE) regulam a concentração intracelular de c-di-GMP em bactérias e a concentração desse mensageiro que regula a expressão de *mrkHIJ*. Quando ativado por c-di-GMP, MrkH recruta a RNA polimerase para o promotor *mrkHI* para ativar automaticamente a expressão de *mrkH*. O aumento da produção de MrkH impulsiona subsequentemente a expressão de *mrkABCDF*, levando à biossíntese de fímbrias tipo 3 e à formação de biofilme (TAN *et al.*, 2015). MrkJ é quem codifica PDE que promove a hidrólise de c-di-GMP, regulando as concentrações desse mensageiro e regulando esse processo de síntese de fímbrias do tipo 3. YfiN abriga o domínio DGC e desempenha um papel positivo na expressão de fímbrias tipo 3 também pelo controle do c-di-GMP intracelular (WILKSCH *et al.*, 2011). Outra molécula capaz de controlar a expressão dessas fímbrias é o CRP-cAMP também por meio da inibição da via do sinal c-di-GMP.

As fímbrias tipo 1, também conhecidas como fímbrias sensíveis a manose, já que podem se ligar a manose solúvel, são codificadas pelo *cluster* de genes *fimAICDFGHK* (GOMES *et al.*, 2021). A regulação da expressão do gene *fim* é controlada por elementos reversíveis de DNA (*fimS*). As fímbrias tipo 1 são compostas por uma subunidade principal de fímbrias, FimA, e uma proteína de adesão apical, FimH (ALCÁNTAR-CURIEL *et al.*, 2013). O gene regulador *fimK* faz parte do operon *fim*, e FimK possui um domínio com características de PDE, que permite a regulação dos níveis intracelulares de c-di-GMP e o controle da expressão de fímbrias do tipo 1 (JOHNSON *et al.*, 2011). As fímbrias do tipo 1 são as principais causas de infecção do trato urinário (STRUVE *et al.*, 2008) já que possuem alta afinidade por resíduos de manose presentes na superfície das células da bexiga (ROZEN *et al.*, 2000). Dessa forma, essas fímbrias podem promover a adesão e invasão dessas células da bexiga, formando assim comunidades bacterianas intracelulares.

Os mecanismos de expressão e regulação das fímbrias do tipo 1 e tipo 3 mencionados acima podem ser observados na Figura 11.

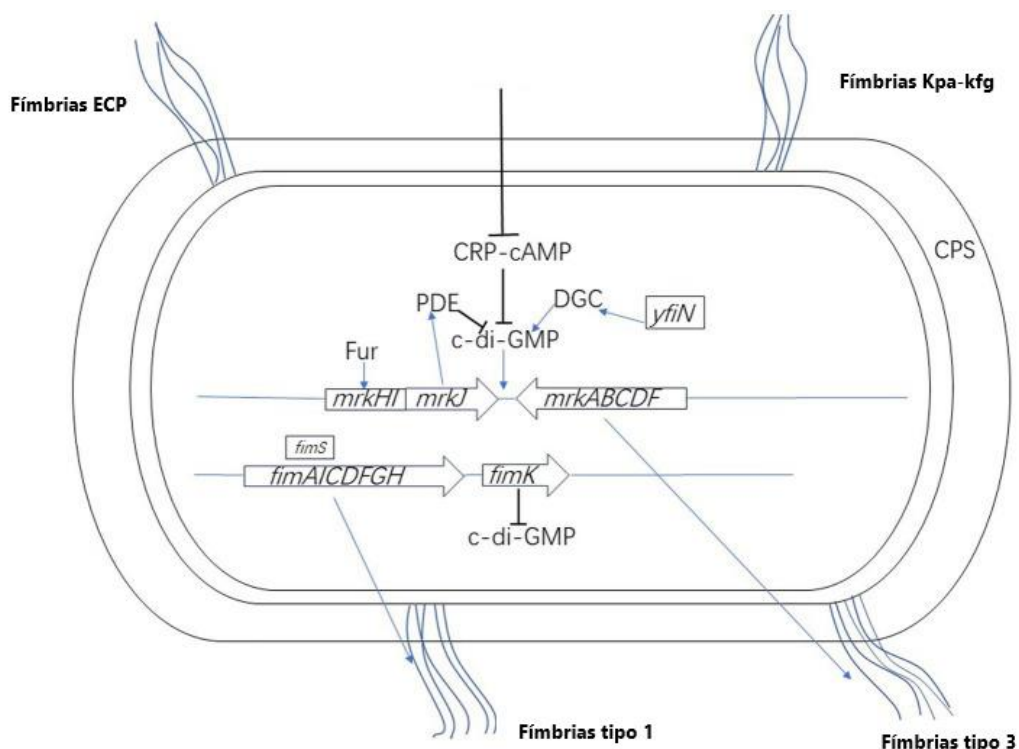


Figura 11: Mecanismos de expressão e regulação de fímbrias do tipo 1 e tipo 3. Ativado pelo mediador c-di-GMP, MrkH recruta RNA polimerase para o promotor *mrkHI* para iniciar a expressão de *mrkH*. O aumento da produção de MrkH impulsiona a expressão de *mrkABCDF*, levando à biossíntese de fímbrias tipo 3. A expressão de *mrkHI* também é regulada ativamente por Fur, que atua como um ativador transcricional de *mrkHI*. MrkJ codifica PDE que promove a hidrólise de c-di-GMP controlando os níveis intracelulares desse mediador. YfiN abriga o domínio DGC desempenhando um papel positivo na expressão de fímbrias tipo 3, também pelo controle dos níveis de c-di-GMP. O CRP-cAMP também é um regulador da expressão de fímbrias tipo 3 através da inibição da via do sinal c-di-GMP. As fímbrias tipo 1 são codificadas pelo agrupamento de genes *fim*. A regulação da expressão do gene *fim* é controlada pelo *fimS*. O gene regulador *fimK* constitui o operon *fim*, e controla os níveis intracelulares de c-di-GMP. Imagem retirada de *Regulation of biofilm formation in Klebsiella pneumoniae* (LI et al., 2023).

2.3.4 Sideróforos

Outro fator de grande relevância principalmente para o crescimento e replicação bacteriana é a aquisição de ferro. Este é um recurso escasso e, por isso, deve ser adquirido pela bactéria no sítio

de infecção. O ferro é primordial para a fisiologia bacteriana, incluindo biossíntese ou replicação de DNA, transcrição, produção de energia, metabolismo central e reações enzimáticas (MURDOCH *et al.*, 2022). Contudo, não se encontra livremente disponível no hospedeiro, a maior parte está ligada a transportadores de ferro como as transferrinas, lactoferrinas e ferritinas. A principal estratégia usada pela bactéria para adquirir esse ferro é a secreção de sideróforos que são moléculas com maior afinidade pelo ferro do que as proteínas do hospedeiro e que, dessa forma, são capazes de sequestrar o ferro quelado nessas proteínas (MIETHKE *et al.*, 2007).

Os principais sideróforos utilizados por *K. pneumoniae* são: enterobactina, yersiniabactina, salmoquelina e aerobactina (Figura 12). Enterobactina é o sideróforo com maior afinidade pelo ferro e está presente quase que unanimemente em todas as linhagens de *K. pneumoniae* (TARKKANEN *et al.*, 1992; EL FERTAS-AISSANI *et al.*, 2013). Os sideróforos yersiniabactina, salmoquelina e aerobactina apresentam afinidades variadas ao ferro e uma grande prevalência em linhagens hvKp (WEISER *et al.*, 2011; HSIEH *et al.*, 2008; EL FERTAS-AISSANI *et al.*, 2013). Além disso, estudos mostram que a produção de sideróforos associados à hipermucoviscosidade são fatores importantes na determinação do perfil hipervirulento desse patógeno (CHENG *et al.* 2010), tanto que a deleção de genes relacionados à produção de hipercápsulas e de sideróforos é capaz de reduzir a letalidade das variantes de *K. pneumoniae* (STANTON *et al.* 2024; RUSSO *et al.* 2024).

Os genes necessários para a biossíntese de enterobactina e yersiniabactina estão localizados no cromossomo, no *cluster ent* e nos *loci ybt*, respectivamente. Enquanto a biossíntese de salmoquelina e aerobactina ocorre nos *clusters* de plasmídeos de virulência *iroBCDN* e *iucABCD iutA*, respectivamente (Figura 12) (ZHU *et al.*, 2021). Os vários sistemas de transporte de ferro em *K. pneumoniae* são complementares, pois podem desempenhar um papel em diferentes condições microambientais durante a infecção.

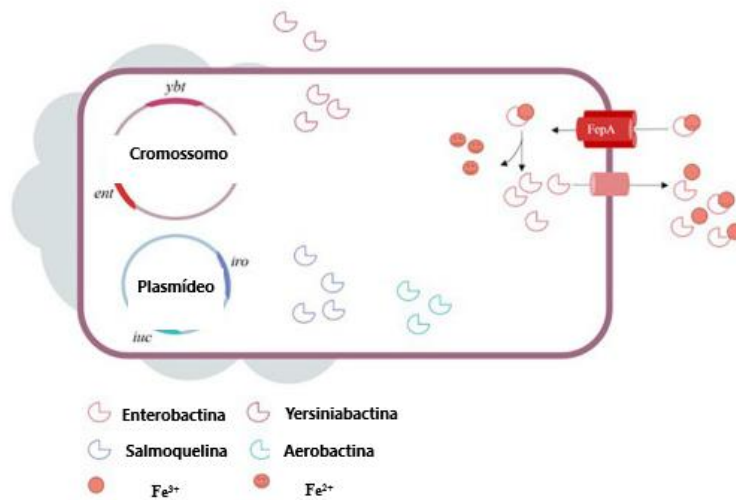


Figura 12: Sistema de sideróforos presentes em *K. pneumoniae*. No cromossomo a presença dos genes codificadores de enterobactina (*ent*) e yersiniabactina (*ybt*). No plasmídeo os genes de salmoquelina (*iro*) e aerobactina (*iuc*). Um exemplo de transportador de ferro, FepA. Imagem retirada de *Virulence Factors in Hypervirulent Klebsiella pneumoniae* (ZHU *et al.*, 2021).

O mecanismo regulador da produção de sideróforos envolve uma interação complexa de disponibilidade de ferro, reguladores responsivos ao ferro e sistemas de dois componentes. Em primeiro lugar, *K. pneumoniae* detectam a concentração ambiental de ferro e alteram a sua produção de sideróforos para alterar a sua capacidade de obter ferro do hospedeiro, o que é possível principalmente por meio de reguladores responsivos ao ferro. Esses reguladores detectam a concentração de ferro e modulam a expressão de genes envolvidos na síntese e transporte de sideróforos. O regulador de absorção de ferro (Fur) atua como um repressor da produção de sideróforos sob condições ricas em ferro, enquanto a desmetalização de Fur permite a aquisição eficiente de ferro e aumenta o *fitness* do patógeno em condições de escassez desse elemento (TROXELL *et al.*, 2013). Além disso, *K. pneumoniae* também utiliza um sistema de dois componentes (QseBC e CpxAR) para regular a produção de sideróforos, a expressão de outros genes de virulência como o sistema de secreção bacteriana tipo VI, fímbrias tipo 1 e 3 e outros mecanismos relacionados a produção de biofilme (KUO *et al.*, 2023; LV *et al.*, 2022). O sistema CpxAR pode

regular negativamente a expressão de fímbrias tipo 3, modulando os níveis de ferro celular, demonstrando ainda mais as complexas interações entre os fatores de virulência (KUO *et al.*, 2023).

Dessa forma, essa série de mecanismos garantem que *K. pneumoniae* pode, de forma eficiente, obter ferro do hospedeiro e sobreviver em condições em que o ferro é um elemento limitado.

2.3.5 Resistência a antimicrobianos

A resistência bacteriana é definida como a capacidade dos microrganismos de neutralizar a ação de agentes antimicrobianos e essas substâncias perdem, então, sua eficiência em inibir o crescimento bacteriano (NADEEM *et al.*, 2020). O aumento da utilização de antibióticos em vários setores da saúde e da agricultura selecionou microrganismos resistentes que ameaçam a saúde humana. Esta questão tornou-se uma das principais ameaças à saúde pública dos tempos atuais e a OMS (Organização Mundial de Saúde) estima que poderão ocorrer 10 milhões de mortes até 2050 devido à falta de opções terapêuticas para microrganismos resistentes (DE KRAKER *et al.*, 2016; PULINGAM *et al.*, 2020; WHO *et al.*, 2014).

A problemática da resistência bacteriana é agravada pela diminuição do surgimento de novos antibióticos desde a década de 1990 (LEWIS *et al.*, 2012; SINGER *et al.*, 2020). Embora se espere que os novos antimicrobianos ofereçam um melhor mecanismo de proteção contra agentes patogênicos, os seus efeitos são breves devido ao uso excessivo que logo permitem a aquisição e disseminação de resistência a esses novos fármacos também (LEE *et al.*, 2013). Os mecanismos de resistência aos antibióticos por bactérias são principalmente em quatro vias, incluindo mecanismos de diminuição da absorção do antibiótico, modificação ou destruição da molécula do antibiótico, inibição da ligação do antibiótico em seu sítio alvo e eliminação por meio de bombas de efluxo (Figura 13).

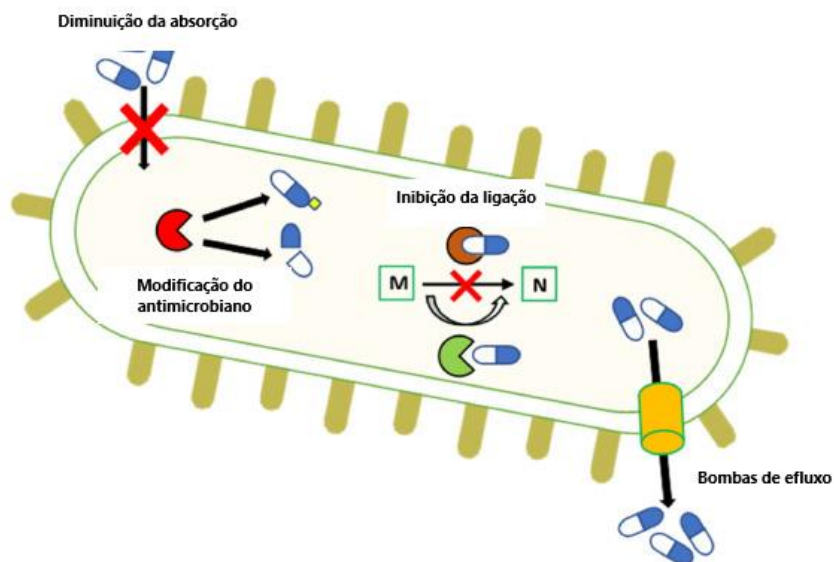


Figura 13: Mecanismos de resistência microbiana aos antimicrobianos. Esses mecanismos incluem diminuição da absorção dos antimicrobianos pela célula bacteriana, modificação ou destruição da molécula antimicrobiana, inibição da ligação em seu sítio alvo e eliminação por meio de bombas de efluxo. Imagem retirada de *Antimicrobial resistance: Prevalence, economic burden, mechanisms of resistance and strategies to overcome* (PULINGAM *et al.*, 2022).

Em 2014, a resistência aos antibióticos causou aproximadamente 700.000 mortes e estima-se que a população mundial até 2050 será entre 11 milhões e 444 milhões menor do que seria caso não existisse este problema de saúde global (O'NEILL *et al.*, 2014). A Figura 14 mostra uma estimativa do número de mortes atribuíveis à resistência aos antibióticos até o ano 2050 para diferentes regiões do mundo. Existe uma disparidade substancial a nível mundial no padrão de resistência aos antibióticos, onde diferentes países enfrentam diferentes tipos de obstáculos. A variação na resistência aos antibióticos de cada país está relacionada com as variações no uso de antibióticos, onde o uso inadequado e excessivo contribuirá para o desenvolvimento da resistência aos antibióticos (O'NEILL *et al.*, 2014; PULINGAM *et al.*, 2022).

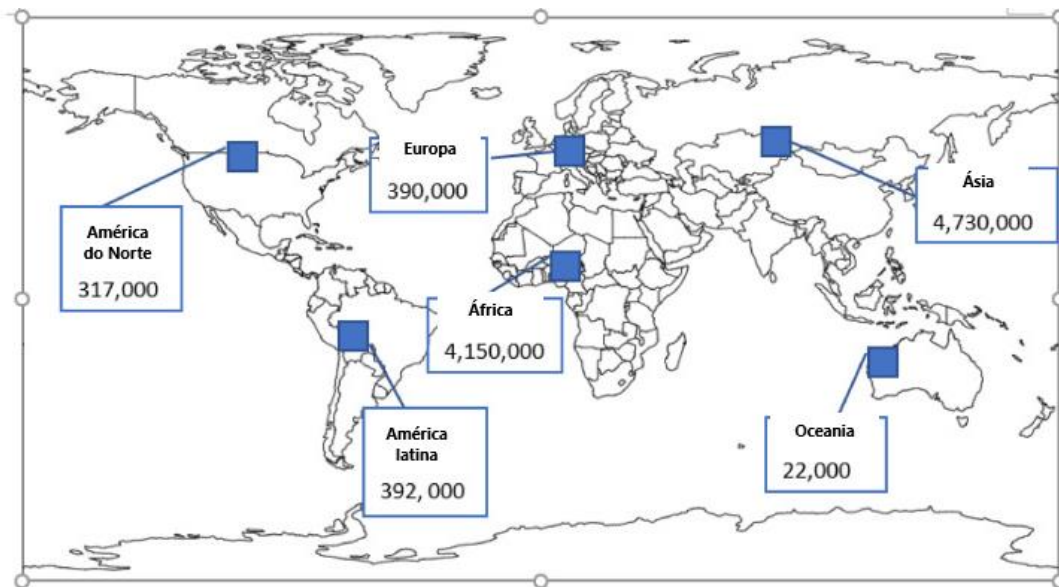


Figura 14: Estimativa do número de mortes causadas pela resistência aos antimicrobianos em 2050 por todo o mundo. Imagem retirada de *Antimicrobial resistance: Prevalence, economic burden, mechanisms of resistance and strategies to overcome* (PULINGAM *et al.*, 2022).

De acordo com o perfil de resistência apresentado o patógeno pode ser classificado como: MDR (*multi-drug resistant*), XDR (*extensively drug-resistant*) e PDR (*pan-drug-resistant*). A resistência MDR foi definida como resistência adquirida a pelo menos um agente de três ou mais categorias antimicrobianas, a XDR é resistência adquirida a pelo menos um agente de todas as categorias antimicrobianas, exceto duas ou menos, enquanto a PDR foi definida como resistência adquirida a todas as categorias antimicrobianas (MAGIORAKOS *et al.*, 2012).

Dentro da diversidade de mecanismos por meio dos quais *K. pneumoniae* desenvolve resistência aos antimicrobianos, os mais comumente descritos são as beta-lactamases de espectro estendido (BLSEs), que conferem resistência as cefalosporinas e monobactâmicos, e as carbapenamases, que conferem resistência a praticamente todos os antibióticos beta-lactâmicos disponíveis incluindo os antibióticos carbapenêmicos (PACZOSA *et al.*, 2016).

A expressão das carbapenamases é ainda mais preocupante visto que os carbapenêmicos são a última linha de antibióticos efetivos para o tratamento de infecções causadas por *K. pneumoniae* multirresistentes (TZOUVELEKIS *et al.*, 2012). Dentro das carbapenamases, KPCs são as

carbapenemases mais comuns e amplamente distribuídas (BRATU *et al.*, 2005). Variantes esporádicas de bla_{KPC} foram identificadas em 2006–2018 (≤ 7 relatadas por ano). No entanto, desde 2019, os relatos de variantes do bla_{KPC} aumentaram dramaticamente. O número relatado entre 2019 e 2020 excede a soma das variantes relatadas nos 17 anos anteriores (CARATTOLI *et al.*, 2021). As variantes de bla_{KPC} observadas em diversos países ao longo dos anos podem ser observadas na Figura 15.

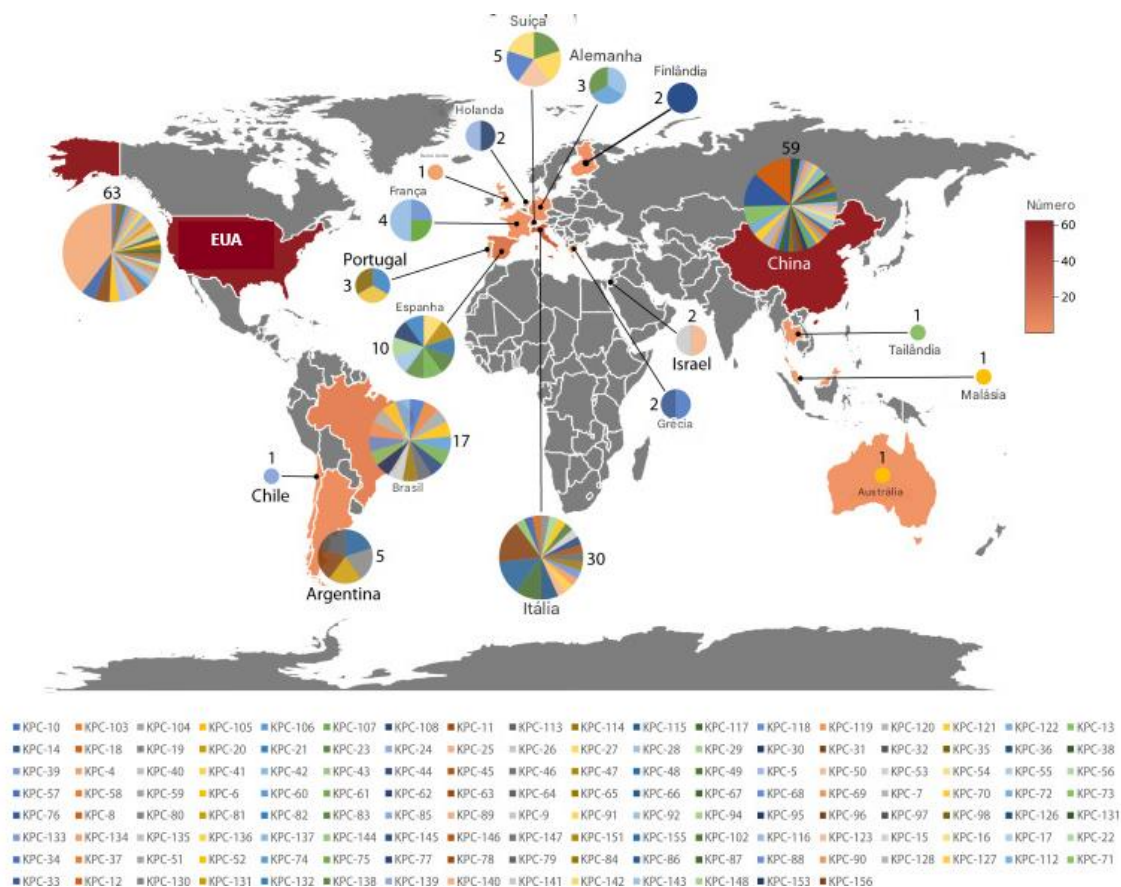


Figura 15: Variantes de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC). Os dados são calculados com base no número de variantes de KPCs registradas no Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia a cada ano em cada região. Imagem retirada de *Klebsiella pneumoniae carbapenemase variants: the new threat to global public health* (DING *et al.*, 2023).

Dessa forma, a fim de enfrentar os desafios colocados pela propagação global da resistência antimicrobiana, vários estudos precisam ser realizados para conter as infecções causadas por estas bactérias. Além disso, no contexto das opções de tratamento limitadas atualmente disponíveis, há uma necessidade urgente de desenvolver diretrizes de tratamento para infecções causadas por esses patógenos.

2.4 Metabolismo de açúcares

O PTS (*carbohydrate phosphotransferase systems*) é um transportador de açúcar que medeia a captação de açúcar na célula bacteriana (POSTMA *et al.*, 1993). O sistema PTS fosforila açúcares e os transporta para dentro da célula bacteriana para serem usados como fontes de energia e materiais para diversas atividades biossintéticas. As funções secundárias do PTS incluem a regulação da expressão de fatores de virulência por meio do controle metabólico e transcricional (SUNDAR *et al.*, 2017; FAN *et al.*, 2019; HOUOT *et al.*, 2010).

As bactérias possuem vários PTSs para translocar e fosforilar diferentes açúcares a depender da disponibilidade. Em geral, o PTS é formado pelo complexo de enzima I (EI), por uma proteína fosfocarreadora contendo histidina (HPr) e pelo complexo de enzima II (EII). EI e HPr são proteínas citoplasmáticas comuns a todos os PTSs, enquanto os complexos EII (contendo proteínas/domínios A, B, C e às vezes D – EIIA/ EIIB/ EIIC/ EIID) são específicos do açúcar e variam em cada PTS (Figura 16). As bactérias contêm vários complexos EII, *E. coli*, por exemplo, contém pelo menos 15 complexos EII diferentes. Na maior parte dos PTS, o complexo EII consiste em duas proteínas/domínios solúveis (EIIA, EIIB) e uma proteína/domínio ligado à membrana (EIIC). No PTS do tipo manose, o complexo EII também contém EIID ligado à membrana. Os domínios EIIC e EIID facilitam a translocação de um substrato através da membrana celular.

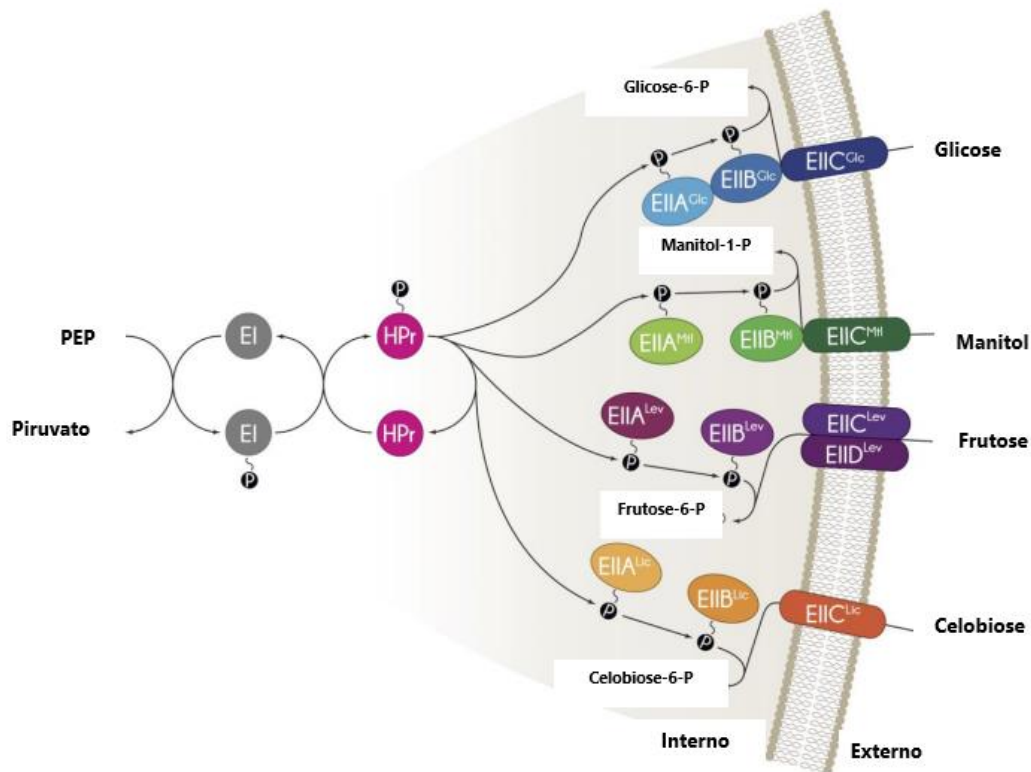


Figura 16: Alguns complexos EII específicos de alguns carboidratos. É representado o EII específico de glicose, manitol, frutose, celobiose. Também é representado o processo de fosforilação de todas as proteínas envolvidas na internalização desses carboidratos. Imagem retirada de *Sophisticated regulation of transcriptional factors by the bacterial phosphoenolpyruvate: Sugar phosphotransferase system* (GALINIER *et al.*, 2017).

Para fosforilar o carboidrato na maioria dos casos de translocação por PTS, a cadeia de transferência do grupo fosforil começa com a autofosforilação de EI enquanto utiliza PEP (fosfoenolpiruvato) como substrato para fornecer esse grupo. Posteriormente, o grupo fosforil é transferido de EI para HPr. O HPr fosforilado fosforila um dos EIIA específicos de carboidratos, que então passa o grupo fosforil para seu cognato, EIIB. Finalmente, na maior parte dos PTS, o EIIB fosforilado transfere o grupo fosforil para o carboidrato ligado ao EIIC cognato (DEUTSCHER *et al.*, 2006) O esquema de fosforilação e transporte de carboidratos por PTS pode ser observado na Figura 17.

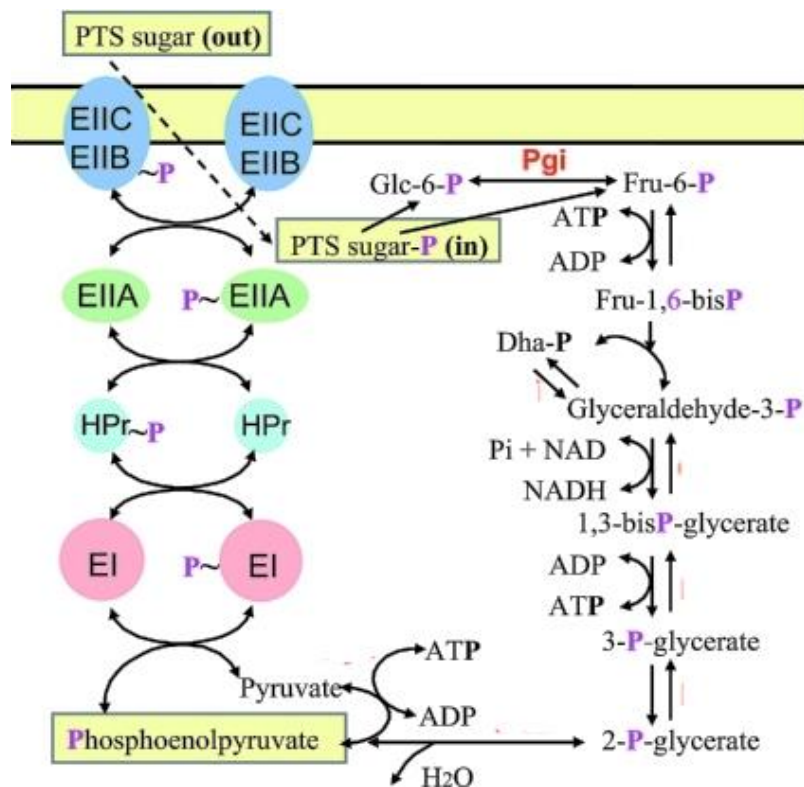


Figura 17: Fosforilação e transporte de carboidratos pelo sistema PTS e sua integração com o processo de glicólise. O carboidrato fosforilado alimenta a glicólise, normalmente no nível de glicose-6-P ou frutose-6-P. Duas moléculas de PEP são geralmente formadas na glicólise, uma das quais é usada para conduzir o transporte e a fosforilação inicial do carboidrato. Como resultado, o estado de fosforilação das proteínas PTS depende tanto da concentração de carboidratos extracelulares quanto da quantidade de PEP internos. Imagem retirada de *How Phosphotransferase System-Related Protein Phosphorylation Regulates Carbohydrate Metabolism in Bacteria* (DEUTSCHER *et al.*, 2006).

Além do transporte de açúcar, os componentes dos PTS estão envolvidos em vários processos fisiológicos bacterianos. Por exemplo, o Crr (*catabolite repression resistance*) localizado no citoplasma, é um EIIA específico de glicose (EIIAGlc) do PTS em bactérias entéricas (DEUTSCHER *et al.*, 2006) e está relacionado a processos regulatórios também. Foi demonstrado que esse Crr desfosforilado interage com a glicerol quinase (GlpK) e o sistema de transporte ABC de maltose / maltodextrina (MalK), levando à inibição do transporte de glicerol e maltose em *E. coli* e *Salmonella enterica* sorovar *Typhimurium*. Em *E. coli*, a forma desfosforilada de Crr também interage com a lactose permease (LacY) para prevenir a absorção de lactose na presença de glicose. Além disso, a

forma fosforilada/desfosforilada de Crr também liga-se à adenilato ciclase (AC), levando a um aumento/diminuição na síntese de AMPc, que é uma molécula cuja concentração celular afeta muitos genes catabólicos bacterianos (DEUTSCHER *et al.*, 2014). Também verificou-se um envolvimento de Crr e EtcABC (um outro sistema EII) na síntese de CPS, afetando a produção da cápsula bacteriana. O Crr afeta negativamente os genes produtores de cápsula *wzi* e *gnd* enquanto o EtcABC afeta positivamente o gene *galF* também produtor de cápsula. Além disso, um sistema afeta o outro, Crr afeta negativamente o sistema EtcABC (Figura 18). O Crr também aumenta a resistência bacteriana ao estresse oxidativo e a atividade bactericida dos fagossomos (PANJAITAN *et al.*, 2021).

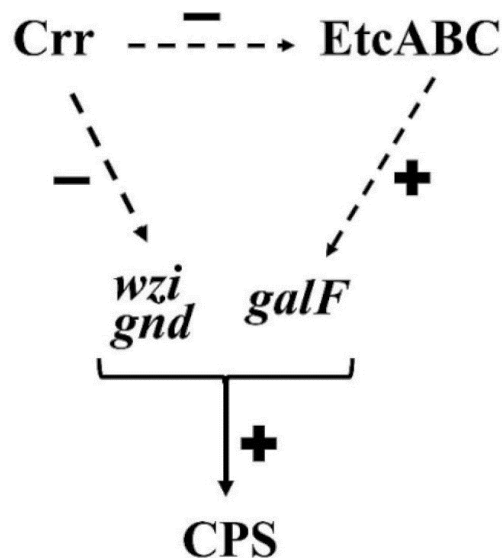


Figura 18: Esquema da influência de sistemas de EII na produção de CPS. Crr afeta negativamente a atividade de EtcABC. Contudo, EtcABC afeta positivamente a atividade transcricional de *galF*. Além disso, Crr afeta negativamente a atividade transcricional de *wzi* e *gnd*. Os papéis de *galF*, *wzi* e *gnd* estão envolvidos na síntese de CPS em *K. pneumoniae*. Imagem retirada de *The PTS Components in Klebsiella pneumoniae Affect Bacterial Capsular Polysaccharide Production and Macrophage Phagocytosis Resistance* (PANJAITAN *et al.*, 2021)

Dessa forma, observamos que além de transportar e fosforilar açúcares do meio ambiente, os componentes bacterianos do PTS desempenham vários papéis na fisiologia bacteriana. Esses dois sistemas EII diferentes (Crr e EtcABC) afetam as atividades transcricionais de genes relacionados a

produção de CPS, que é um fator de virulência essencial para a infecção por *K. pneumoniae*. Além disso, a regulação das atividades transcricionais de um complexo EII por outro componente PTS mostram uma resposta bacteriana complicada às flutuações ambientais da fonte de carbono.

Outros estudos também mostram a influência de PTS na imunomodulação. Nesses trabalhos, observou-se que os agrupamentos de genes PTS de manose, frutose e galactitol correlacionou-se positivamente com a capacidade de indução de Th1. Além disso, a análise metagenômica de amostras fecais de pacientes com doença inflamatória intestinal revelou que o PTS foi significativamente regulado positivamente (ATARASHI *et al.*, 2019; GREENBLUM *et al.*, 2012). Esses achados sugerem que o gene PTS possui efeito imunomodulador, o que pode contribuir para a indução de células Th1.

Um outro mecanismo importante no metabolismo de açúcares é o CCR (*carbon catabolite repression*) que regula a absorção de glicose e a repressão de genes necessários para a utilização de fontes de carbono menos preferidas (DEUTSCHER *et al.*, 2008). O CCR é geralmente controlado pelo segundo mensageiro AMP cíclico (cAMP), que tem um papel fundamental na regulação genética global (SAIER *et al.*, 1996). Bactérias cultivadas em glicose apresentam produção diminuída de AMPc, enquanto bactérias cultivadas em fontes de carbono menos preferidas produzem níveis elevados de AMPc (BOTSFORD *et al.*, 1992; MCDONOUGH *et al.*, 2012; PETERKOFISKY *et al.*, 2012). Para equilibrar os níveis intracelulares de AMPc, a adenilato ciclase CyaA e a AMPc fosfodiesterase CpdA são necessárias para a biossíntese e degradação de AMPc, respectivamente (BOTSFORD *et al.*, 1992; MCDONOUGH *et al.*, 2012). O alvo celular para sinalização de cAMP é a proteína receptora de cAMP (CRP) (BERG *et al.*, 1988). Em *E. coli*, o CRP-cAMP atua como um regulador global da expressão gênica, controlando a expressão de quase 200 operons (GOSSET *et al.*, 2004; MARTINEZ-ANTONIO *et al.*, 2003; ZHENG *et al.*, 2004).

Além da regulação dos genes do metabolismo do carbono, foi demonstrado que a sinalização do AMPc regula a expressão de vários genes que codificam fatores de virulência, como flagelos,

fímbrias, protease, exotoxina e sistemas de secreção em bactérias (BAGA *et al.*, 1985; STELLA *et al.*, 2008).

A expressão de CRP-cAMP nas fímbrias tipo 3 é um desses processos que já foram descritos. Em *K. pneumoniae*, o estímulo externo de glicose reprime a função do CRP-cAMP, com isso, ocorre a elevação da concentração intracelular de c-di-GMP e a expressão de MrkH e MrkI, resultando em aumento da expressão de fímbrias tipo 3. Isso mostra a coordenação entre a sinalização CRP-cAMP e c-di-GMP na modulação da expressão de fímbrias tipo 3 (Figura 19) (LIN *et al.*, 2016).

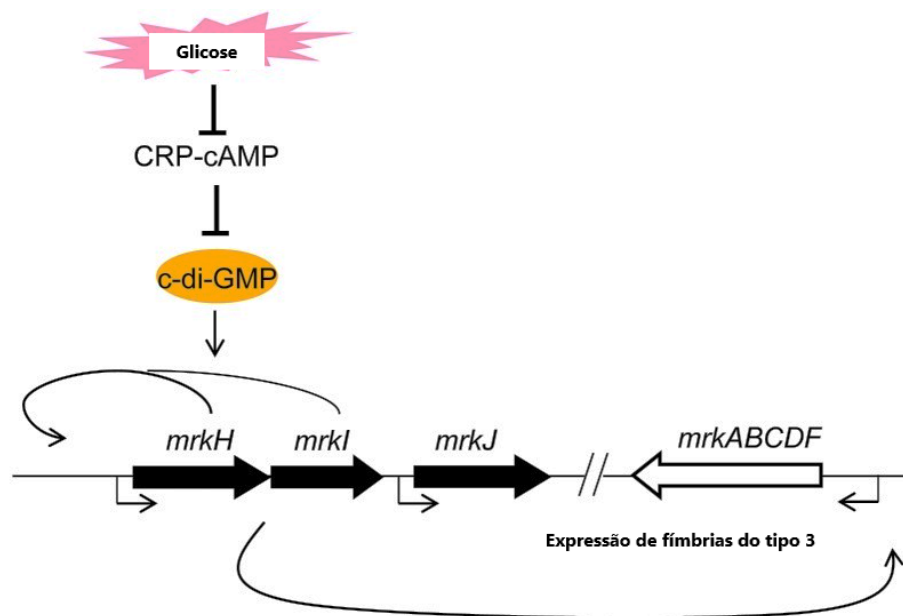


Figura 19: Esquema da regulação da expressão de fímbrias do tipo 3 por CRP-AMPC e c-di-GMP. A presença de glicose exógena reprime a função do CRP-cAMP e isso eleva a concentração intracelular de c-di-GMP e a expressão de MrkH e MrkI, resultando no aumento da expressão de fímbrias tipo 3. Imagem retirada de *CRP-cyclic AMP regulates the expression of type 3 fimbriae via cyclic di-GMP in Klebsiella pneumoniae* (LIN *et al.*, 2016).

Dessa forma, podemos observar que o metabolismo de diferentes açúcares está intimamente ligado a expressão de cápsula, fímbrias do tipo 3 e outros fatores de patogenicidade de *K. pneumoniae*.

3. Justificativa

Considerando a relevância clínica de linhagens hipervirulentas de *K. pneumoniae* como causadoras de bacteremias, abscessos e infecções sistêmicas em pacientes não imunocomprometidos é essencial identificar os mecanismos associados à expressão de fatores de virulência que promovem a colonização, sobrevivência e disseminação dentro do hospedeiro. A disponibilidade de nutrientes e fontes de carbono no interior do hospedeiro é específica de cada nicho fisiológico. Por esta razão, a bactéria utiliza diferentes fontes nutricionais que promovem a colonização e sobrevivência no hospedeiro. Assim, a expressão de fatores de virulência está interligada ao metabolismo de açúcares. Além disso, conhecer a respeito dos mecanismos associados à patogenicidade bacteriana contribuem fortemente ao desenvolvimento de abordagens terapêuticas às infecções causadas por *K. pneumoniae* visto que as opções atuais disponíveis são limitadas resultando em altas taxas de morbidade e mortalidade.

4. Objetivos

Objetivo Geral

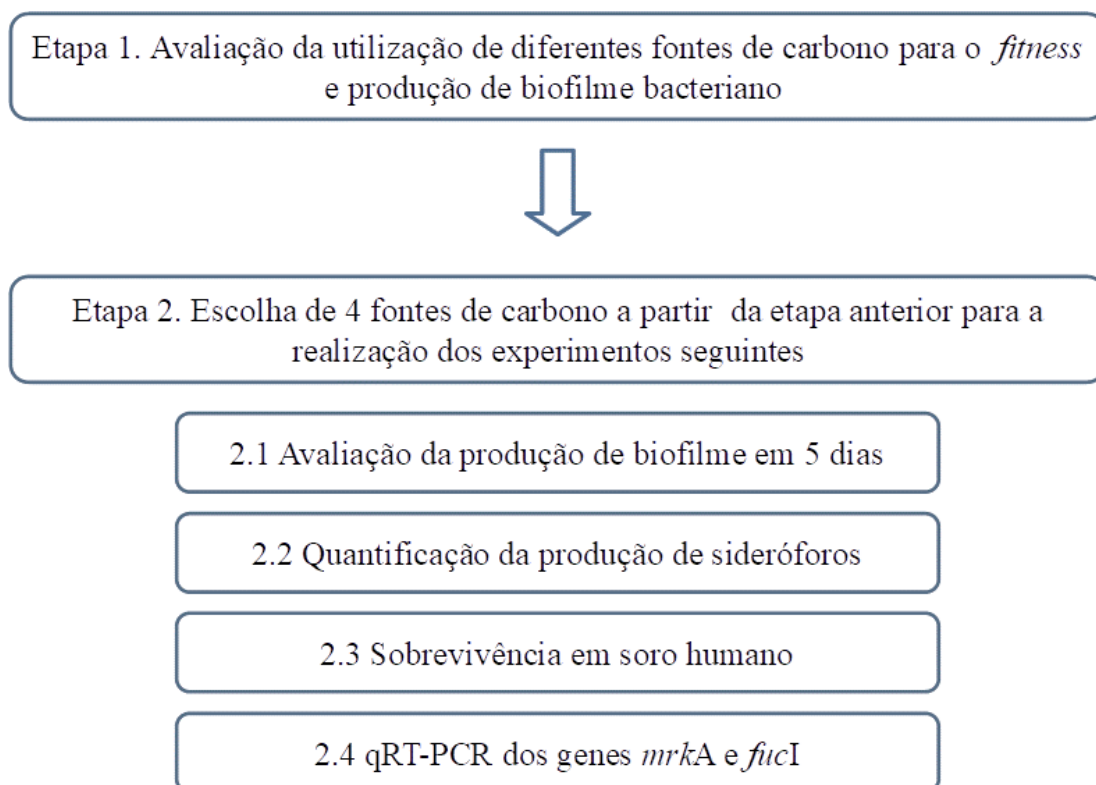
Identificar o papel da utilização de diferentes fontes de carbono por linhagens hipervirulentas de *Klebsiella pneumoniae* na expressão de fatores de virulência.

Objetivos específicos

- Determinar como a utilização de diferentes açúcares como única fonte de carbono atuam na promoção do crescimento bacteriano e na produção de biofilme;
- Verificar como a utilização de diferentes fontes de carbono interfere na produção de sideróforos e sobrevivência em soro humana pelas linhagens bacterianas;
- Verificar como a utilização de diferentes fontes de carbono interfere na expressão de genes associados à expressão de fatores de colonização.

5. Material e métodos

- Desenho experimental



A execução do projeto foi realizada em duas etapas. Na primeira etapa, diferentes carboidratos foram utilizados como fonte única de carbono para avaliação do crescimento bacteriano e produção de biofilme em 24 horas. Nessa primeira etapa, foram utilizadas as seguintes fontes de carbono: glicose, frutose, lactose, sorbitol, sacarose, maltose, galactose e manose. A partir disto, foram selecionadas 4 fontes de carbono para a realização dos experimentos subsequentes: biofilme em 5 dias, produção de sideróforos, sobrevivência em soro humano e determinação da expressão dos genes de virulência *mrkA* (fímbria) e *fucI* (fucose isomerase). Para esta última etapa foram utilizados glicose, sorbitol, lactose e manose como fontes de carbono.

Para a realização dos ensaios, foram utilizadas duas linhagens bacterianas causadoras de bacteremia Kp 31 e Kp 34 e uma linhagem derivada de Kp 34 portadora de uma inserção do transposon TnPhoA no gene da fucose isomerase, linhagem M93.

A abordagem foi utilizada para compararmos o efeito do metabolismo de diferentes fontes de carbono entre linhagens hipervirulentas (Kp 31 e Kp 34) e uma linhagem com o gene da fucose isomerase interrompido. Além disso, também procurou-se verificar as variações na expressão de fatores de virulência a depender da fonte de carbono utilizada.

5.1 Isolamento, crescimento e armazenamento das linhagens bacterianas

Os isolados bacterianos de *K. pneumoniae* Kp 31 e Kp 34 foram obtidos de um paciente com bacteremia no Hospital Universitário de Brasília (HUB) em 2016. A cepa Kp 31 foi isolada de hemocultura e a Kp 34 foi isolada de cultura de *swab* retal. Kp 34 é produtora de hiper mucoviscosidade. Após isolamento, estas estirpes foram cultivadas por 18 horas em meio Luria Bertani (LB) (Sigma Aldrich) líquido a 37 °C e, em seguida, armazenada em freezer -80 °C em meio LB com glicerol.

O isolado bacteriano M93 foi obtido a partir da inserção do transposon TnPhoA na linhagem Kp 34 no gene *fccI* (fucose isomerase) (TALOR *et al.*, 1989; DAS *et al.*, 2014).

A obtenção das linhagens foi realizada conforme aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (parecer número 1.131.054 – CAEE 44867915.1.0000.5558).

5.2 Meios de cultura e fontes de carbono

5.2.1 Meio LB (SEZONOV *et al.*, 2007)

Meio de crescimento rico, utilizado para a manutenção e rápido crescimento de diversos microrganismos. Constituído de

Triptona	10,00g
Cloreto de sódio	10,00g
Extrato de levedura	05,00g
Água destilada	1000,00mL

5.2.2. Meio Mínimo modificado (SAMBROOK *et al.*, 2001)

Utilizado em experimentos cujo principal objetivo é a observação da fisiologia celular e a expressão gênica, o Meio Mínimo M9 é um meio de crescimento microbiano formado por elementos inorgânicos conhecidos como sais minerais mínimos M9, que pode ser suplementado com diferentes aminoácidos, vitaminas e fontes de carbono. O meio é composto por :

Fosfato de potássio monobásico anidro – KH ₂ PO ₄	60,00g
Fosfato de potássio dibásico anidro – K ₂ HPO ₄	14,00g
Sulfato de amônio - (NH ₄) ₂ . SO ₄	20,00g
Sulfato de magnésio – MgSO ₄ . 7H ₂ O	02,00g
Água destilada.....	1000,00mL

Para realização dos experimentos, o meio M9 foi suplementado com 2% das seguintes fontes de carbono: D-Glicose, D(-)Frutose, Lactose, D(-)Sorbitol, D(+)Sacarose, D(+)Maltose, D(+)Galactose e Manose (Sigma Aldrich).

5.3 Curva de crescimento

A curva de crescimento bacteriana foi realizada com o objetivo de analisar a sobrevivência e capacidade de multiplicação de isolados clínicos utilizando diferentes fontes de carbono. Para tanto, as cepas bacterianas foram cultivadas a 37 °C em meio LB e M9 suplementado com as fontes de carbono até que a densidade óptica (DO) no comprimento de onda de 600nm fosse 0,1 (SEZONOV *et al.*, 2007). Os valores de DO foram medidos em espectrofotômetro (Pharmacia LKB Ultrospec III (Pharmacia, LKB; DG Apeldoorn, Holanda). Em seguida, 50 µL da cultura bacteriana foram adicionados a 150 µL do seu respectivo meio de cultura esterelizado em uma placa de 96 poços. A placa foi então incubada a 37 °C por 24 horas em condições aeróbicas e estáticas com valores de DO medidos a cada 30 minutos no SpectraMax M3 (Molecular Devices, LLC; San Jose, Califórnia, EUA). Todas as curvas de crescimento foram realizadas em triplicata.

Para caracterizar o crescimento bacteriano foram utilizados parâmetros como taxa de crescimento (μ) e tempo de geração (g). A taxa de crescimento (μ) foi calculada usando a fórmula μ

= $\ln(\text{OD}_2) - \ln(\text{OD}_1) / t_2 - t_1$ onde OD2 é o valor de DO (600nm) em 8 horas determinado como o tempo da fase log intermediária e OD1 é o valor de DO (600nm) em 0 horas. O tempo t2 é o tempo de 8 horas e t1 é o tempo de zero horas.

O tempo de geração foi calculado usando a fórmula $g = \ln(2)/\mu$ onde μ é a taxa de crescimento calculada.

5.4 Quantificação da produção de biofilme em superfície de poliestireno

A quantificação da produção de biofilme foi feita por meio da quantificação da densidade óptica conforme descrito por (STEPANOVIC *et al.*, 2004). O experimento foi realizado em meios LB e M9 suplementado com as fontes de carbono já citadas e realizado em triplicata biológica.

Cada isolado foi previamente cultivado em meio de cultura a 37 °C até que a DO fosse 0,3. Em seguida, 150uL de meio de cultura estéril e 50uL de cada suspensão bacteriana foram adicionados a uma placa de poliestireno de 96 poços. A placa foi então incubada a 37 °C por 24 horas para formação de biofilme. Após esse tempo, o sobrenadante foi descartado e os poços lavados com solução salina (0,9%). A fixação foi feita colocando metanol por 15 minutos em cada poço. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e a placa deixada em temperatura ambiente até secar. Após a secagem, adicionou-se cristal violeta durante 5 minutos. Após esse tempo, o excesso de corante foi lavado com água corrente e a placa deixada em temperatura ambiente para secar. Após a secagem, foram adicionados 200 uL de ácido acético glacial (33%) para resolubilizar o biofilme. A DO foi então medida utilizando o espectrofotômetro de microplacas SpectraMax em um comprimento de onda de 570 nm.

Para o ensaio de biofilme de 5 dias, a temperatura de incubação da placa para formação de biofilme foi de 25 °C e o tempo de incubação foi de 5 dias.

Para quantificar a produção de biofilme, foi feita uma média aritmética dos três valores de absorbância obtidos para cada amostra em cada triplicata biológica.

5.5 Quantificação da produção de sideróforos

A síntese de sideróforos é um mecanismo regulado pela presença de ferro e por isso as condições de crescimento bacteriano são essenciais para garantir a maior produção possível destas moléculas. Portanto, é fundamental que o meio de cultura possua uma quantidade mínima de ferro para evitar a inibição da síntese de sideróforos pelas bactérias.

Os sideróforos são encontrados no sobrenadante da cultura bacteriana e esse sobrenadante é utilizado em ensaios que permitem a quantificação dos sideróforos com base em suas propriedades funcionais e biológicas.

A quantificação da produção de sideróforos pelos isolados foi realizada de acordo com (PAYNE *et al.* 1994) utilizando a técnica Chrome Azurol S (CAS). Este método utiliza um complexo de corante de ferro que muda de cor quando o ferro é removido. Os sideróforos têm maior afinidade pelo ferro do que pelo corante, portanto, quando o sideróforo sequestra o ferro ocorre uma mudança na cor, do azul para o amarelo.

Primeiramente, os isolados são cultivados em caldo Muller Hinton e incubados a 37 °C por 18 horas. Em seguida, a DO é ajustada para 0,1 e novo inóculo é feito em 10 ml de meio mínimo SSD sem ferro acrescido de 2% de cada fonte de carbono, também sem ferro. O novo inóculo é incubado no shaker a 37° C por 24 horas.

Após este período, a cultura é centrifugada, o sobrenadante é recolhido e filtrado através de uma membrana de 0,22 µm para remoção de quaisquer células bacterianas. O filtrado obtido é então liofilizado. Posteriormente, o extrato liofilizado é ressuspensionado em 1 ml de meio SSD sem ferro.

Para a próxima etapa, são preparadas 2 soluções. Solução 1 contendo 0,6 ml de HDTMA, 0,15 ml de solução de ferro e 0,750 ml de CAS. A solução 2 contém 0,43g de PIPES, 0,625 ml de NaOH e água MilliQ até um volume de 10 ml. A solução 2 deve ter o pH ajustado para 6,8.

Em seguida, as soluções 1 e 2 são misturadas para formar a solução 3. Utilizando uma placa de microdiluição de 96 poços, são adicionados 100 µL do extrato liofilizado ressuspensionado em SSD sem ferro e 100 µL da solução 3. Em seguida, é realizada uma leitura em espectrofotômetro no

comprimento de onda de 630 nm. Se houver presença de sideróforos na amostra testada, eles sequestram o ferro e a amostra perde a cor azul, tornando-se mais amarelada.

O meio mínimo SSD é usado como branco e a solução 3 como referência. O cálculo para obtenção da quantidade de sideróforos é dado pela fórmula $[(Ar - As)/Ar]*100$. Sendo Ar a absorção da referência e a absorção da amostra testada.

5.6 Sobrevivência em soro humano

A abordagem descrita por (DELEO *et al.* 2017) foi utilizada para avaliar a taxa de sobrevivência das linhagens bacterianas em soro humano.

Foram coletadas amostras de sangue de 3 doadores saudáveis para obtenção do *pool* de soro a ser utilizado no experimento. As linhagens foram cultivadas em meio M9 acrescido de 2% da fonte de carbono escolhida, em estufa a 37 °C por 18 horas. Todos os isolados foram diluídos para uma DO de 0,3 correspondendo a aproximadamente 10^8 UFC/mL. As cepas foram submetidas à centrifugação por 4 minutos a 12.000 g e após a centrifugação, o *pellet* foi ressuscitado em 550 µL de soro humano. Em seguida, as linhagens bacterianas em soro humano foram agitadas a 60 rpm em uma incubadora mantida a 37 °C. Em cada tempo de coleta determinado (0, 30, 60, 90 e 120 minutos), 10 µL da suspensão foram coletados e diluídos em PBS. Em seguida, 10 uL das duas diluições finais foram plaqueados em ágar MacConkey e incubados durante 18 horas a 37 °C. Depois desse período, as unidades formadoras de colônia (UFC) foram contadas.

Para determinar a taxa de sobrevivência em porcentagem foi utilizada a fórmula $(UFC_f / UFC_0)*100$ em que UFC_f é a quantidade de colônias obtidas nos tempos de 30, 60, 90 e 120 minutos e UFC_0 é sempre a quantidade de colônias obtidas no tempo de 0 minutos, ou seja, o inóculo bacteriano inicial.

5.7 qRT-PCR

5.7.1 Desenho dos primers

O desenho dos iniciadores foi realizado utilizando o programa Primer tools IDT. Foram desenhados primers para 3 genes. Para o gene *rrsH* (RNA ribossomal da unidade 16S) utilizado como controle de expressão interna. Primers para o gene *mrkA* (fímbria) e o gene *fucI* (fucose isomerase). As sequências dos primers mencionados estão descritas na tabela seguinte.

Gene	Primers (5' – 3')
<i>rrsH</i>	GACGATCCCTAGCTGGTCTG GTGCAATATCCCCACTGCT
<i>mrkA</i>	GCGGATACTTACCTGAAACC TGCTTACGTCATCCTGTTTAG
<i>fucI</i>	TCTATCGTCGACCACAAC CCAGCTCGGTTTCATCATAG

5.7.2 Extração de RNA e síntese de DNA complementar (cDNA)

O RNA total foi extraído de amostras preservadas em fenol a -80 °C. As amostras preservadas eram bactérias crescidas até a DO de 0,3 em meio M9 suplementado com as fontes de carbono. As amostras congeladas em fenol foram purificadas e o RNA extraído com o kit ReliaPrep™ miRNA Cell and Tissue Miniprep System (Promega) seguindo o protocolo do fabricante.

A qualidade do RNA foi avaliada em gel de agarose 1% e a concentração e pureza do RNA foi verificada com o NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Uma alíquota de 1 µg de RNA extraído foi utilizada para síntese de cDNA utilizando o kit SuperScript™ IV Reverse Transcriptase (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

5.7.3 qRT-PCR

A análise da expressão gênica foi realizada utilizando o kit iTaq™ Universal SYBR® Green (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). Cada reação foi realizada em um volume final de 10 µL, contendo 2

μL de uma diluição 1:20 de cada estoque de cDNA, 0,2 μM de cada primer e 5 μL do kit iTaq™ Universal SYBR® Green. Os ciclos de amplificação foram realizados em um termociclador ABI StepOne™ Real-Time PCR (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) de acordo com os seguintes parâmetros: uma fase inicial de duas etapas de 52°C por 2 minutos e 95°C por 10 minutos. Em seguida, 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 segundos e hibridização e extensão do primer a 60 °C por 60 segundos.

Três replicatas biológicas e três replicatas técnicas foram realizadas para cada gene. As temperaturas de *melting* foram determinadas usando o software StepOne v2.3 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA).

5.8 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas no GraphPad Prism v.10.0. Os testes aplicados foram ANOVA one-way e Kruskal-Wallis.

6. Resultados e Discussão

6.1 Curva de crescimento

Inicialmente, todas as linhagens foram cultivadas em LB e meio M9 suplementado com carboidratos específicos como fonte única de carbono durante 24 horas para o delineamento das curvas de crescimento das linhagens de *K. pneumoniae*. Como controle de crescimento, foi utilizado o meio M9 sem adição de qualquer fonte de carbono. Os resultados obtidos para os isolados são apresentados na Figura 20.

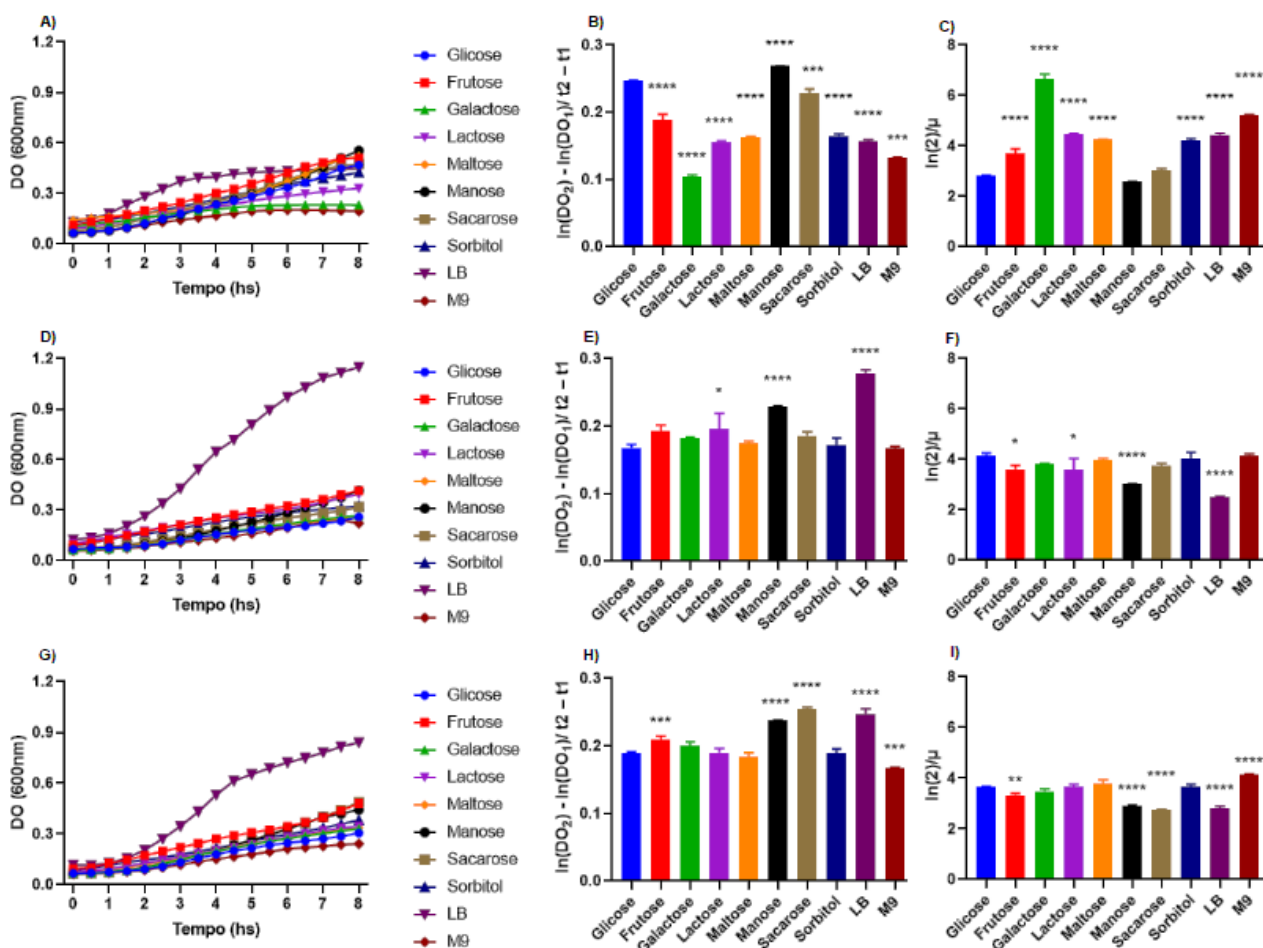


Figura 20: Crescimento dos isolados de *K. pneumoniae* Kp 31, Kp 34 e M93 em meio LB, meio M9 suplementado com glicose, frutose, galactose, lactose, maltose, manose, sacarose, sorbitol e M9 sem adição de fonte de carbono. A fase logarítmica média da curva de crescimento foi observada entre o período de 0 e 8 horas. A fase logarítmica média de Kp 31 está representada em (A), de Kp 34 em (D) e M93 em (G). A taxa de crescimento específica (μ) calculada com base nesse período de 8 horas de crescimento está representada para Kp 31 em (B), Kp 34 (E) e M93 (H). O tempo de geração (g), que é o tempo que leva para a população bacteriana duplicar durante o crescimento logarítmico, está representada para Kp 31 em (C), Kp 34 (F) e M93 (I). Para determinar as diferenças significativas, os valores obtidos de taxa de crescimento e de tempo de geração foram comparados utilizando a glicose como o valor de referência.

A curva de crescimento dos isolados foi realizada durante um período de 24 horas em que a DO (600nm) foi medida a cada 30 minutos. As estirpes apresentaram crescimento diferente entre os meios utilizados e entre as cepas. Para a análise do crescimento microbiano foram calculados indicadores de taxa de crescimento específica (μ) e o tempo de geração bacteriano (g). Esses

indicadores são calculados utilizando-se um período da fase logarítmica de crescimento que foi determinado entre os tempos de 0 e 8 horas .

Podemos observar a fase exponencial de crescimento escolhida na Figura 20. Para Kp 31 (A) observamos um crescimento similar da linhagem em todos os meios e fontes de carbono testados. Para os isolados Kp 34 (D) e M93 (G) também observamos um crescimento similar para todos os meios testados exceto para o LB que nesses dois isolados apresentou crescimento mais acelerado a partir de 3 horas.

A taxa de crescimento (μ) foi calculada usando esta faixa de crescimento de oito horas. Podemos observar que para Kp 31 (B) a fonte de carbono em promoveu maior taxa de crescimento foi a manose, seguida de glicose e sacarose. Quando usamos a glicose como fonte de carbono de referência observam-se diferenças significativas ($p < 0,0001$) dessa fonte com frutose, galactose, lactose, maltose, manose, sorbitol, LB e M9 sem adição de fontes de carbono . Em relação a sacarose também observamos diferenças significativas ($p = 0,004$) em relação a glicose. A taxa μ de Kp 34 (E) mostra LB e manose como os meios em que ocorreu maior crescimento. Utilizando o crescimento em glicose como referência observamos diferenças significativas com a lactose ($p = 0,0357$), manose ($p < 0,0001$) e LB ($p < 0,0001$). Para a linhagem M93 (H) a taxa μ foi maior em sacarose, LB e manose. Comparando com a glicose observamos diferenças significativas com a frutose ($p = 0,0009$), M9 sem fonte de carbono ($p = 0,0002$), manose ($p < 0,0001$), sacarose ($p < 0,0001$) e LB ($p < 0,0001$).

O tempo de geração (g) é o período necessário para uma população bacteriana duplicar durante o crescimento. Dessa forma, quanto menor for o valor encontrado, mais rápido a população bacteriana duplicou nas condições testadas. Em Kp 31 (C), o tempo de geração apresentou variações de acordo com a fonte de carbono utilizada, manose ($g = 2,578$), glicose ($g = 2,808$) e sacarose ($g = 3,022$) foram os açúcares em que observou-se o menor tempo de geração, indicando que a duplicação bacteriana ocorreu mais rapidamente nesses três açúcares e corroborando os resultados obtidos da taxa μ . Se usarmos o tempo g da glicose como referência, observamos diferenças significativas ($p < 0,0001$) com frutose, galactose, lactose, maltose, sorbitol, LB e M9 sem adição de carbono. Para Kp 34 (F)

observamos que o cultivo em LB apresentou o menor tempo de geração ($g=2,483$) seguido de manose ($g=3,022$). Comparando com o valor de g em glicose é possível observar diferenças significativas no cultivo em frutose ($p\ 0,0409$), lactose ($p\ 0,0349$), manose ($p<0,0001$) e LB ($p<0,0001$). A linhagem M93 (I) apresenta menor tempo (g) em sacarose ($g=2,732$), LB ($g=2,803$) e manose ($g=2,919$). As diferenças significativas se apresentam em relação a frutose ($p\ 0,0030$), manose ($p<0,0001$), sacarose ($p<0,0001$), LB ($p<0,0001$) e M9 ($p<0,0001$).

No geral, podemos observar que o crescimento bacteriano das linhagens utilizadas apresentou um melhor desempenho em cultivo em LB, glicose, manose e sacarose.

A capacidade de metabolizar fontes de carbono alternativas à glicose é um mecanismo que permitiu que bactérias entéricas superassem a resistência à colonização do trato intestinal (KHAN *et al.*, 2021). Assim, podemos observar a capacidade de *K. pneumoniae* de crescer em uma diversidade de fontes de carbono (Figura 20). Além disso, há estudos que também mostram o crescimento de *K. pneumoniae* em vários açúcares, como fucose, glicose (HUDSON *et al.*, 2022), frutose, maltose (LIN *et al.*, 2018).

Bactérias patogênicas presentes no intestino são capazes de utilizar moléculas de fucose, galactose, ácido siálico, N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina e manose que estão presentes em grandes quantidades neste local para promover seu crescimento (RAKOFF-NAHOUM - *et al.*, 2014). Estudos com *K. quasipneumoniae* mostrando o crescimento bacteriano em diversos carboidratos como arabinose, manose, ribose, fucose, glicose, galactose entre outros, mostraram melhor desempenho de crescimento em glicose e a manose ficou como o quarto carboidrato em que houve maior crescimento entre as 14 fontes testadas (MIKI *et al.*, 2024). Em estudos com *K. pneumoniae*, entre glicose, frutose e maltose, o melhor crescimento ocorreu em maltose (LIN *et al.*, 2018). Lendenmann em 1996 também mostrou o crescimento de *E. coli* em vários açúcares como glicose, galactose, maltose, ribose, arabinose e frutose e a capacidade deste microrganismo de crescer usando simultaneamente as seis fontes de carbono testadas.

No entanto, embora as bactérias tenham a capacidade de utilizar simultaneamente diferentes fontes de carbono para o seu crescimento, estudos mostram que existe uma preferência na ordem de utilização de cada fonte de carbono disponível e esta ordem de preferência varia dependendo da cepa bacteriana (FABICH *et al.*, 2008). Um estudo clássico mostrou que *E. coli* presente na microbiota intestinal utilizava preferencialmente glicose quando glicose e lactose estavam disponíveis (LOOMIS *et al.*, 1967). Isso porque para utilizar um açúcar diferente da glicose, o microrganismo precisaria gastar mais energia para mobilizar proteínas e transportadores para transformar essas moléculas em glicose ou outros derivados para serem utilizados no processo de glicólise. Contudo, isto não significa que a glicose seja sempre a fonte de carbono na qual as bactérias apresentam maior desempenho no seu crescimento. *Streptococcus thermophilus*, por exemplo, apresenta maiores taxas de crescimento ao utilizar a lactose e não glicose (VAN DEN BOGAARD *et al.*, 2000) indicando que a adaptação a cada nicho pode resultar na escolha de qualquer carboidrato como substrato preferido. Portanto, é possível verificar a diferença de crescimento em cada fonte de carbono e entre cada uma das cepas do nosso estudo.

Além disso, cada microambiente do corpo humano possui disponibilidade nutricional específica para cada microrganismo. Por exemplo, a nasofaringe possui um ambiente rico em mucinas que contêm galactose, N-acetilglucosamina e manose, enquanto a corrente sanguínea é rica em glicose (APRIANTO *et al.*, 2018) (HOBBS *et al.*, 2018). Com base nesses ambientes, com base no tipo de fontes de carbono disponíveis, observa-se, por meio de análises transcriptômicas, uma regulação positiva de certos genes importantes para a captação e metabolismo desses açúcares disponíveis (WERREN *et al.*, 2023).

Outro fator de grande relevância relatado na literatura é que o metabolismo do carbono e a regulação da virulência bacteriana estão interligados e devem ser considerados em conjunto no processo de infecção bacteriana do hospedeiro (POKORZYNSKI *et al.*, 2023). Estudos mostram que em bactérias Gram-negativas a regulação da utilização da fonte de carbono está associada à divisão celular, produção de toxinas, adesão celular, evasão do sistema imunológico, colonização e

mobilidade intestinal e tudo isso impacta significativamente o processo de infecção do patógeno (SLOAN *et al.*, 2022). Portanto, a disponibilidade de carbono para a multiplicação bacteriana não é o único fator a ser considerado no processo de patogênese, e o crescimento acelerado muitas vezes não é a melhor estratégia de sobrevivência no interior do hospedeiro. *Salmonella* crescem lentamente no interior de células eucarióticas, pois para garantir sua sobrevivência dentro dessas células é necessária a coordenação entre o uso de nutrientes, a expressão de fatores de virulência e a evasão dos sistemas microbicidas do hospedeiro (TIERREZ *et al.*, 2005).

A fonte de carbono também desempenha um papel importante na ativação de mecanismos de resposta ao estresse. Estudos com *Listeria monocytogenes* mostraram que o crescimento desta bactéria na lactose a tornou mais resistente ao calor e ao estresse ácido e também aumentou sua capacidade de invadir células eucarióticas (TAPIA *et al.*, 2020).

Dessa forma, conforme os estudos do presente trabalho e o descrito na literatura, podemos observar que não existe uma uniformidade para o crescimento bacteriano nas diferentes fontes de carbono testadas. Ocorrem variações no crescimento a depender da espécie, da cepa bacteriana, do local de isolamento e de outros fatores. Entre as linhagens usadas nesse trabalho, observamos desempenhos diferentes entre elas a depender da fonte de carbono utilizada.

6.2 Quantificação da produção de biofilme em 24 horas

O seguinte experimento foi realizado para continuar a caracterização inicial dos isolados em diferentes meios e fontes de carbono. Os resultados da quantificação de biofilme de 24 horas são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1: Média aritmética e desvio padrão (DP) da DO (570 nm) na formação de biofilme das linhagens de *Klebsiella pneumoniae* Kp 31, Kp 34 e M93 em 24 horas. Os meios de cultura utilizados foram LB e meio M9 mais 2% das seguintes fontes de carbono, glicose, frutose, galactose, lactose, maltose, sacarose, manose e sorbitol.

Meio de cultura	Kp 31 (Média ± DP)	Kp 34 (Média ± DP)	M93 (Média ± DP)
M9 + 2% Glicose	0,189 ± 0,049	0,142 ± 0,022	0,176 ± 0,056
M9 + 2% Frutose	0,420 ± 0,107	0,174 ± 0,054	0,205 ± 0,045
M9 + 2% Galactose	0,175 ± 0,013	0,111 ± 0,031	0,185 ± 0,016
M9 + 2% Lactose	0,503 ± 0,129	0,618 ± 0,096	0,701 ± 0,072
M9 + 2% Maltose	0,520 ± 0,045	0,221 ± 0,039	0,279 ± 0,022
M9 + 2% Sacarose	0,488 ± 0,008	0,162 ± 0,044	0,417 ± 0,078
M9 + 2% Manose	0,856 ± 0,050	0,498 ± 0,066	0,736 ± 0,033
M9 + 2% Sorbitol	0,727 ± 0,025	0,274 ± 0,099	0,592 ± 0,037
LB	0,682 ± 0,044	0,603 ± 0,063	0,701 ± 0,042

Em relação a esse experimento, observamos que as três linhagens são capazes de produzir biofilme nas condições testadas. Também observamos que a produção de biofilme foi maior em meio LB. Contudo, observamos que em todas as condições testadas Kp 31 e M93 produziram mais biofilme do que Kp 34, exceto em meio M9 suplementado com lactose, em que Kp 34 apresentou uma quantidade maior de biofilme do que Kp 31 (Tabela 1).

Em uma análise individual, observa-se que Kp 31 apresentou maior produção de biofilme em manose e sorbitol. Para Kp 34 isso ocorreu com lactose e manose e para M93 as fontes foram manose e lactose. Vemos que a manose para os três isolados foi protagonista na produção de biofilme em 24

horas. A lactose foi um denominador comum para Kp 34 e M93 e o sorbitol um protagonista para Kp 31, embora também tenha sido uma fonte de carbono com expressiva produção para Kp 34 e M93, ficando após os principais, lactose e manose.

Dessa forma, após a análise dos experimentos de curva de crescimento e biofilme de 24 horas, optamos por continuar as próximas etapas com as fontes de carbono: glicose, sorbitol, lactose e manose.

Estudos já estabeleceram uma relação entre o fenótipo de hiper mucoviscosidade e biofilme. Estabeleceu-se que não há correlação entre hiper mucoviscosidade e aumento da produção de biofilme (ZHENG *et al.*, 2018) (SOTO *et al.*, 2017), o que podemos observar em nossos resultados já que as cepas que possuem maior produção de biofilme são Kp 31 e M93 que não apresentam o fenótipo hiper mucóide. A única fonte de carbono em que Kp 34 apresentou maior produção de biofilme do que uma linhagem não hiper mucóide foi em lactose. Nas demais fontes, Kp 34, que possui hiper mucoviscosidade, apresentou menores níveis de produção de biofilme. O que se observa na literatura é que a quantidade de cápsula produzida pelo fenótipo hiper mucóide pode impedir a formação de biofilme, pois cobriria as fímbrias prejudicando suas propriedades de adesão e evitando assim o estabelecimento de biofilme (BUFFET *et al.*, 2021).

As diferenças de fontes de carbono utilizadas podem produzir diferenças na composições, na biomassa do biofilme bem como na sua arquitetura (RAJEWSKA *et al.*, 2024). Estudos relatam o efeito das concentrações de glicose na inibição ou aumento da expressão do gene *mrkA* em isolados clínicos de *K. pneumoniae* levando a maior ou menor produção de biofilme na presença deste açúcar (LIN *et al.*, 2016; HORNG *et al.*, 2023). Horng identificou que, em alguns de seus isolados, em LB adicionado de 2% de glicose houve redução drástica na produção de biofilme quando comparado ao LB sem adição de glicose. Porém, nos demais isolados ocorreu comportamento inverso. Portanto, o aumento ou diminuição da produção de biofilme neste açúcar variou dependendo do isolado.

Em nosso trabalho, observamos que para todas as nossas linhagens houve de fato menor produção de biofilme na presença de glicose em relação à produção em LB. Essa diminuição do

biofilme na presença de glicose diverge do mecanismo descrito na literatura de que esse açúcar reprime a função do CRP-cAMP que dessa forma permite aumento da quantidade intracelular de c-di-GMP e a consequente expressão de MrkH e MrkI, resultando em alta expressão de fímbrias tipo 3 e maior formação de biofilme (HORNG *et al.*, 2023). Esse mesmo mecanismo que afeta os níveis intracelulares de c-di-GMP e a formação de biofilme é observado em *Salmonella enterica serovar Typhimurium* só que o açúcar que realiza essa modulação é a L-arabinose (VASICEK *et al.*, 2021). Para *Vibrio parahaemolyticus* também ocorre a modulação da produção de biofilme por esse açúcar além de alterações também da taxa de crescimento, da produção de CPS, da motilidade e da produção de c-di-GMP. Os dados de RNA-seq revelaram alterações significativas nos níveis de expressão de 752 genes na presença de L-arabinose (ZHANG *et al.*, 2023). Dessa forma, a produção de biofilme em diversas fontes de carbono podem ser reguladas por diversos mecanismos e alterar uma variedade de aspectos fisiológicos do microrganismo .

Estudos com *Escherichia coli* também mostraram o efeito de alguns compostos na formação do biofilme. O biofilme de *E. coli* foi tratado com xilitol, lactose e glúten e verificou-se que essas moléculas são capazes de causar a inibição da formação de biofilme. A lactose para *K. pneumoniae* parece favorecer a produção de biofilme já que é uma das fontes em que obtivemos os maiores valores (KWIECINSKA-PIRÓG *et al.*, 2024).

A capacidade de maior ou menor produção de biofilme a depender da fonte de carbono presente pode ser devido a mudanças na composição do exopolissacarídeo (EPS), foi o que determinou um estudo com *Tetragenococcus halophilus*. Na presença de sacarose ocorria uma melhora na capacidade de produção de biofilme e isso ocorria por conta da alteração da composição de monossacarídeos do EPS aumentando a proporção de glicose e galactose na composição. E em condições de estresse por sal ocorria, com a adição de sacarose, mudanças na proporção de ramnose, galactose e arabinose na composição monossacarídica do EPS e regulação negativa da proporção de glicose e manose (YAO *et al.*, 2024). Com isso, observamos a plasticidade da composição de EPS na presença de algumas substâncias e como isso é capaz de afetar na produção de biofilme.

Outro fator a se considerar é a relação entre a multirresistência antimicrobiana e a capacidade de formar biofilme fraco, moderado ou forte. Os dados da literatura divergem, indicando casos de uma relação positiva de maior capacidade de produzir biofilme forte para isolados que são MDR (YANG *et al.*, 2008; SUBRAMANIAN *et al.*, 2012; SANCHEZ *et al.*, 2013; BOCANEGRA-IBARIAS *et al.*, 2017) assim como casos de correlação negativa em que isolados MDR portadores de KPC apresentaram alta prevalência de fraca produção de biofilme (CUSUMANO *et al.*, 2019).

As linhagens utilizadas em nosso trabalho são XDR e produtoras de KPC. Houve variação na capacidade de produzir biofilme forte dependendo da fonte de carbono. Para Kp 31, Kp 34 e M93 usando os critérios de STEPANOVIC *et al.*, 2004 para classificar o biofilme formado, houve variação entre produção de biofilme fraco, moderado e forte, a depender da cepa e do açúcar utilizado. Isso nos mostra que a resistência antimicrobiana de forma isolada não é capaz de determinar a capacidade de produção de biofilme em nossos isolados.

Além disso, estudos com *Enterococcus* e *Lactococcus* mostram uma capacidade crescente de produção de biofilme com o aumento das concentrações de glicose e lactose utilizadas mostrando também a influência da fonte de carbono nesse fator de virulência (AKOGLU *et al.*, 2020). Outros estudos também mostram que outros açúcares como a fucose, por exemplo, são capazes de modular positivamente vários fatores como a hiper mucoviscosidade, a produção de biofilme e a autoagregação de *K. pneumoniae* (HUDSON *et al.*, 2022).

Dessa forma, podemos observar que existem variações da produção de biofilme a depender da fonte de carbono utilizada, mostrando que o metabolismo de açúcares é capaz de modular a virulência bacteriana.

6.3 Quantificação da formação de biofilme em 5 dias

Após a triagem inicial, foram selecionados 4 fontes de carbono nas quais as linhagens apresentaram menor e maior produção de biofilme: glicose, sorbitol, lactose e manose.

Assim, o teste de produção de biofilme foi novamente realizado em novas condições: 5 dias sob temperatura diferente (25 °C). Os resultados são mostrados na Figura 21.

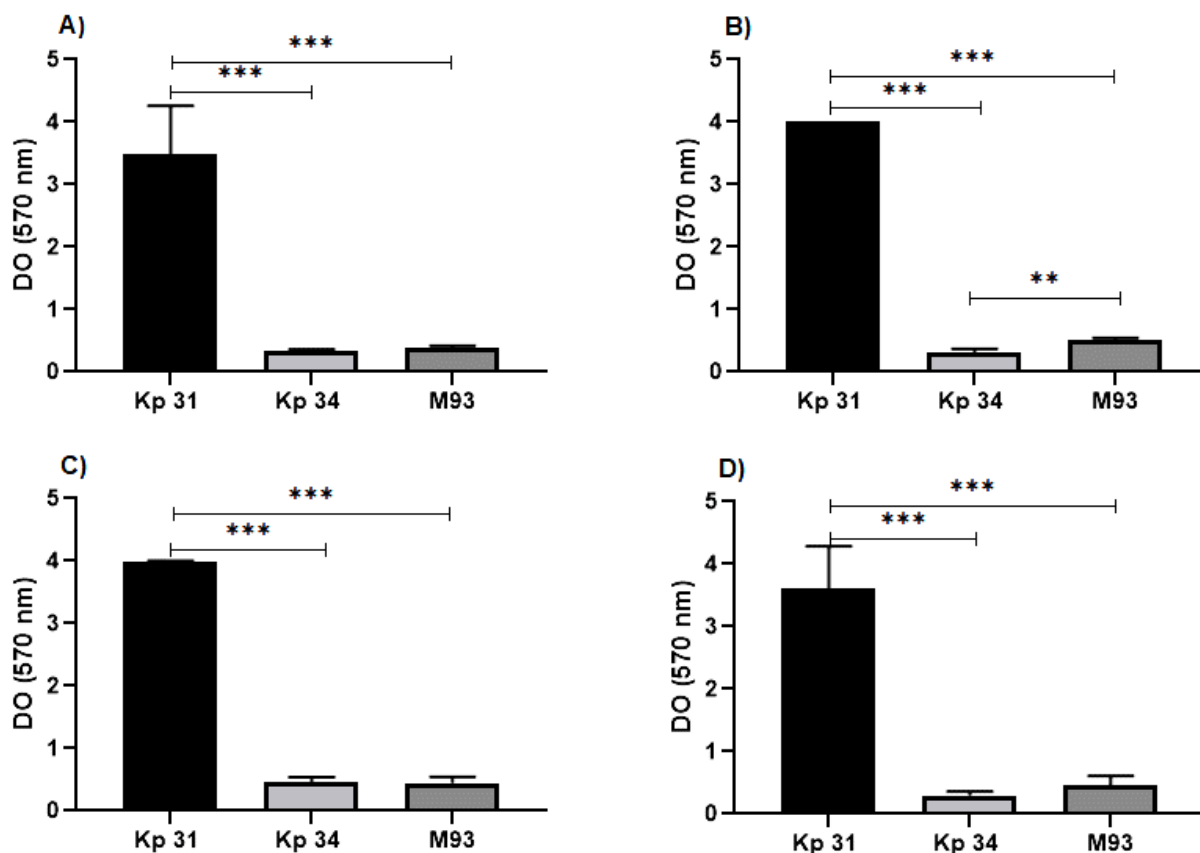


Figura 21: Formação de biofilme de 5 dias em temperatura de 25 °C das linhagens Kp 31, Kp 34 e M93 em meio M9 suplementado com as seguintes fontes de carbono: glicose (A), sorbitol (B), lactose (C) e manose (D).

Avaliando a capacidade de produção de biofilme durante 5 dias em temperatura de 25 °C observamos que a Kp 31 apresenta intensa produção de biofilme em glicose (A), sorbitol (B), lactose (C) e manose (D). Essa produção mostra-se muito superior à produção de Kp 34 e M93 que apresentam uma produção bem mais baixa e semelhante entre esses dois isolados. Em incubação nas quatro fontes de carbono testadas observam-se diferenças significativas ($p < 0,05$) na produção entre Kp 31 e Kp 34 e também entre Kp 31 e M93. Kp 34 e M93 apresentam resultados de produção mais próximos dos resultados obtidos no biofilme de 24 horas, com os valores de DO 600 variando entre 0,2 e 0,5. Contudo, os valores encontrados para Kp 31 mostram-se muito superiores aos encontrados em biofilme de 24 horas, mostrando valores entre 3,4 e 4,0. Dessa forma, podemos observar que Kp

31 possui grande capacidade de formação de biofilme a longo prazo e em temperaturas inferiores a 30 °C.

As bactérias respondem a mudanças no seu ambiente externo, como a temperatura, alterando a transcrição dos seus genes. Usando técnicas de RNA-seq para estudar a resposta transcricional a uma mudança de 37 °C para 15 °C em *E. coli*, *Salmonella enterica*, *Citrobacter rodentium*, *Enterobacter cloacae*, *K. pneumoniae* e *Serratia marcescens*, Hoang descobriu que essas espécies alteram a transcrição entre 626 e 1057 genes em resposta à mudança de temperatura. Contudo, havia apenas 16 genes cuja expressão foi alterada em comum entre as seis espécies, mostrando que a modulação gênica não acontece da mesma maneira em resposta à mesma mudança ambiental (HONG *et al.*, 2024).

Já se tem descrita a relação entre temperatura e tempo de formação do biofilme. Esses estudos mostram que a temperatura e o tempo desempenham um papel importante na formação desta estrutura, indicando que biofilmes significativamente mais densos foram quantificados a 37 °C quando comparados àqueles a 25 °C. Além disso, vemos que biofilmes de maior biomassa foram detectados 5 dias após a inoculação quando comparado àqueles quantificados 1 dia pós-inoculação, indicando que para maior produção de biofilme a temperatura ideal é de 37 °C e o tempo de 5 dias para formação de biofilme (SOTO *et al.*, 2017; GUAL-DE-TORRELLA *et al.*, 2022). Nossos resultados estão de acordo parcialmente com os dados da literatura já que o biofilme formado em 5 dias, embora em temperatura menor de 25 °C, apresentou maior biomassa para Kp 31 em todas as fontes de carbono testadas (glicose, sorbitol, lactose e manose). Para Kp 34 e M93 isso ocorreu em glicose e sorbitol, mas o biofilme formado em lactose e manose dessas linhagens foi maior no biofilme de 24 horas.

Quando comparamos o comportamento das 3 linhagens, vemos que no biofilme de 5 dias em todas as fontes de carbono testadas, Kp 31 teve uma capacidade muito superior em comparação a Kp 34 e M93 para formação de biofilme.

Um estudo realizado com *E. coli* mostrou que o impacto da L-ramnose varia com a temperatura e as condições do meio. Em meio rico a 37 °C, a L-ramnose reduz a formação de biofilme

e diminui a concentração de carboidratos EPS quando comparado a temperatura de 28 °C. Essas alterações são acompanhadas pelo aumento da expressão de genes envolvidos no transporte e metabolismo da ramnose e pela redução da expressão de genes relacionados à adesão e formação de biofilme (HANTUS *et al.*, 2024).

Outro estudo para verificar a formação de biofilme com *E. coli* patogênica para aves (APEC) verificou que dentre as condições testadas que incluíam diferenças de temperatura (37 °C e 25 °C) e diferenças nutricionais (meio LB ou meio M9 com diferentes carboidratos), a habilidade de formação de biofilme foi maior a 25 °C em meio LB, contudo a formação de biofilme mais forte foi em M9 suplementado com glicose a 37 °C (HU *et al.*, 2022). Isso mostra que fatores nutricionais e ambientais possuem grande relevância nesse fator de virulência bacteriano.

Um trabalho realizado com *Vibrio vulnificus* comparou a formação de biofilme e crescimento em linhagens clínicas e em linhagens ambientais desse patógeno em diferentes condições. Nessa comparação observou-se que em diferentes temperaturas (24, 30, e 37 °C) e em diferentes pH (5.5, 7.5, e 8.5) as linhagens clínicas obtinham mais êxito no crescimento e na formação de biofilme do que linhagens ambientais mostrando que a maior produção de biofilme em condições adversas parece ser uma característica de linhagens clínicas e pode ser considerada um determinante de virulência em *V. vulnificus* (ÇAM *et al.*, 2020). Dessa forma, linhagens clínicas estariam mais aptas a sobreviver e expressar seus fatores de virulência em condições mais desafiadoras do que linhagens ambientais.

A temperatura de formação de biofilme indica o maior sucesso de formação a 25 °C para clones de alto risco, cepas que não sejam clones de alto risco teriam baixa probabilidade de formação de biofilme nesta temperatura (GUAL-DE-TORRELLA *et al.*, 2022). As linhagens testadas em nosso estudo pertencem ao clone ST11, considerado um clone internacional de alto risco de disseminação (DAMJANOVA *et al.*, 2008; ANDRADE *et al.*, 2014), explicando a capacidade dos isolados de formarem biofilme nesta temperatura.

Por fim, ainda existem estudos que correlacionam a produção de hiper mucoviscosidade e a produção de biofilme com a temperatura. Nesses estudos foi notado um aumento da virulência

bacteriana em temperaturas elevadas de 40 °C e 42 °C em comparação com temperaturas mais baixas de 28 °C e 37 °C. Isso porque nas temperaturas mais elevadas (40 °C e 42 °C) a linhagem de *K. pneumoniae* usada passou de um fenótipo de cápsula habitual para um fenótipo hipermucoide e aumentou a sua capacidade de formação de biofilme em superfície abiótica, mostrando que temperaturas bem acima dos 37 °C do hospedeiro podem influenciar em aspectos que aumentam a virulência do patógeno (MULLER *et al.*, 2024).

Dessa forma, podemos observar que o tempo de formação, a temperatura, a fonte de carbono afetam a produção de biofilme e que existem outros fatores, talvez relacionados a fatores intrínsecos da própria linhagem, que também podem influenciar nesse processo.

6.4 Quantificação da produção de sideróforos

A quantificação da produção de sideróforos foi realizada de acordo com (PAYNE *et al.* 1994) usando a quantificação pelo método Cromo Azurol S. O experimento foi realizado em meio M9 suplementado com cada uma das quatro fontes de carbono. Os resultados obtidos estão na Figura 22.

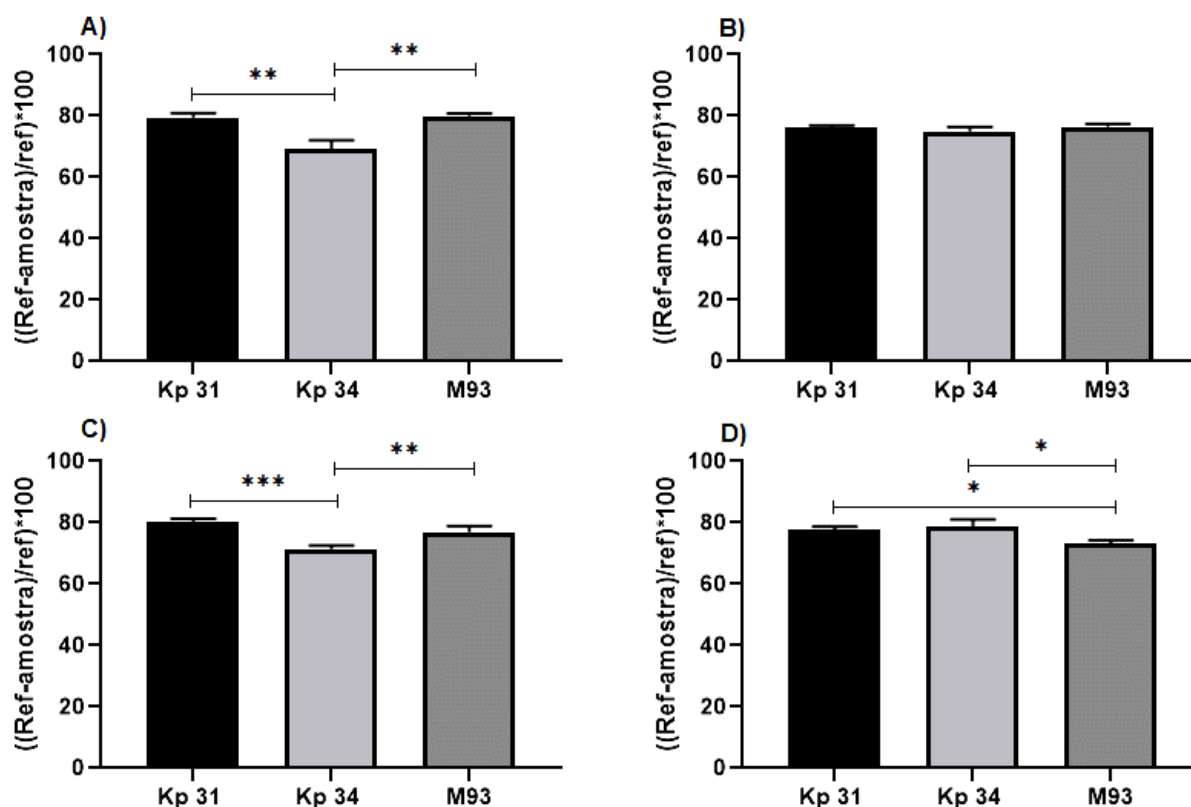


Figura 22: Quantificação da produção de sideróforos pelas linhagens bacterianas Kp 31, Kp 34 e M93. A produção foi quantificada em M9 suplementado com glicose (A), sorbitol (B), lactose (C) e manose (D). A quantificação foi utilizada usando a fórmula $((\text{Ref-amostra})/\text{ref}) \cdot 100$ com Ref sendo a absorção da referência e amostra sendo a absorção da amostra testada.

Analisando os resultados obtidos verifica-se que ocorre a produção de sideróforos para todas as linhagens em todas as fontes de carbono testadas. Em glicose (A) podemos observar maior produção de sideróforos de Kp 31 e M93 mostrando diferenças significativas em relação à produção de Kp 31 e Kp 34 ($p = 0,0015$) e entre Kp 34 e M93 ($p = 0,0012$). Em sorbitol (B) vemos uma produção uniforme de sideróforos entre os isolados sem diferenças significativas entre eles. Utilizando a fonte de carbono lactose (C) vemos novamente uma produção maior de Kp 31 e M93 mostrando uma diferença significativa entre Kp 31 e Kp 34 ($p = 0,0007$) e diferenças significativas também entre Kp 34 e M93 ($p = 0,0078$). Analisando a produção em manose (D) ocorre uma inversão em que Kp 34 passa a produzir mais sideróforos do que os outros isolados, dessa forma observam-se diferenças significativas entre Kp 31 e M93 ($p = 0,0299$) e entre Kp 34 e M93 ($p = 0,0122$).

De forma geral, verifica-se produção de sideróforos em elevada quantidade nas três linhagens bacterianas cultivadas em todas as fontes de carbono testadas.

Além da importância da aquisição de ferro para a multiplicação bacteriana, estudos mostram que essas moléculas possuem outras funções que são de grande importância para a virulência bacteriana. Zhang mostrou que o sideróforo de *K. pneumoniae* induz resistência bacteriana à ciprofloxacina, reduzindo o nível de estresse oxidativo. Outro estudo também mostrou que a enterobactina de *E. coli* tem efeito protetor contra o estresse oxidativo, sugerindo que existe uma correlação entre sideróforos e estresse oxidativo (PERALTA *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2017).

Os sideróforos são um fator de virulência bacteriana muito importante, estudos mostram que este é um importante marcador de hipervirulência bacteriana, uma vez que as cepas hvKp secretam maiores quantidades de sideróforos do que as cepas clássicas de *K. pneumoniae* (cKp) (RUSSO *et al.*, 2011). Além disso, estudos também descobriram que níveis elevados de produção de sideróforos estão associados a doenças graves ou morte em modelos de sepse murina (RUSSO *et al.*, 2018). Outro fator de virulência afetado pela produção de sideróforos é a produção de biofilme. Estudos indicam que a presença de ferro é necessária para a produção de biofilme (CHEN *et al.*, 2020), assim, observa-se a importância dos sideróforos para a captação de ferro e consequente produção de biofilme.

A multirresistência bacteriana também pode ter essas moléculas como aliadas, Farzand mostrou que o importador de sideróforo reduz a suscetibilidade antimicrobiana de *K. pneumoniae*, sugerindo que além da função de sequestradores de ferro, essas moléculas podem ter uma função secundária exportando antimicrobianos. Em nossos isolados temos produção de grandes quantidades de sideróforos associadas à multirresistência (FARZAND *et al.*, 2021).

6.5 Sobrevivência em soro humano

A capacidade de sobrevivência dos isolados em soro foi avaliada como descrito por (DELEO *et al.*, 2017) com base na contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) e na porcentagem de sobrevivência após diferentes tempos de incubação em soro humano. As linhagens bacterianas antes

da incubação em soro foram cultivadas por 18 horas em meio M9 suplementado com as fontes de carbono selecionadas. Os resultados obtidos estão mostrados na Figura 23.

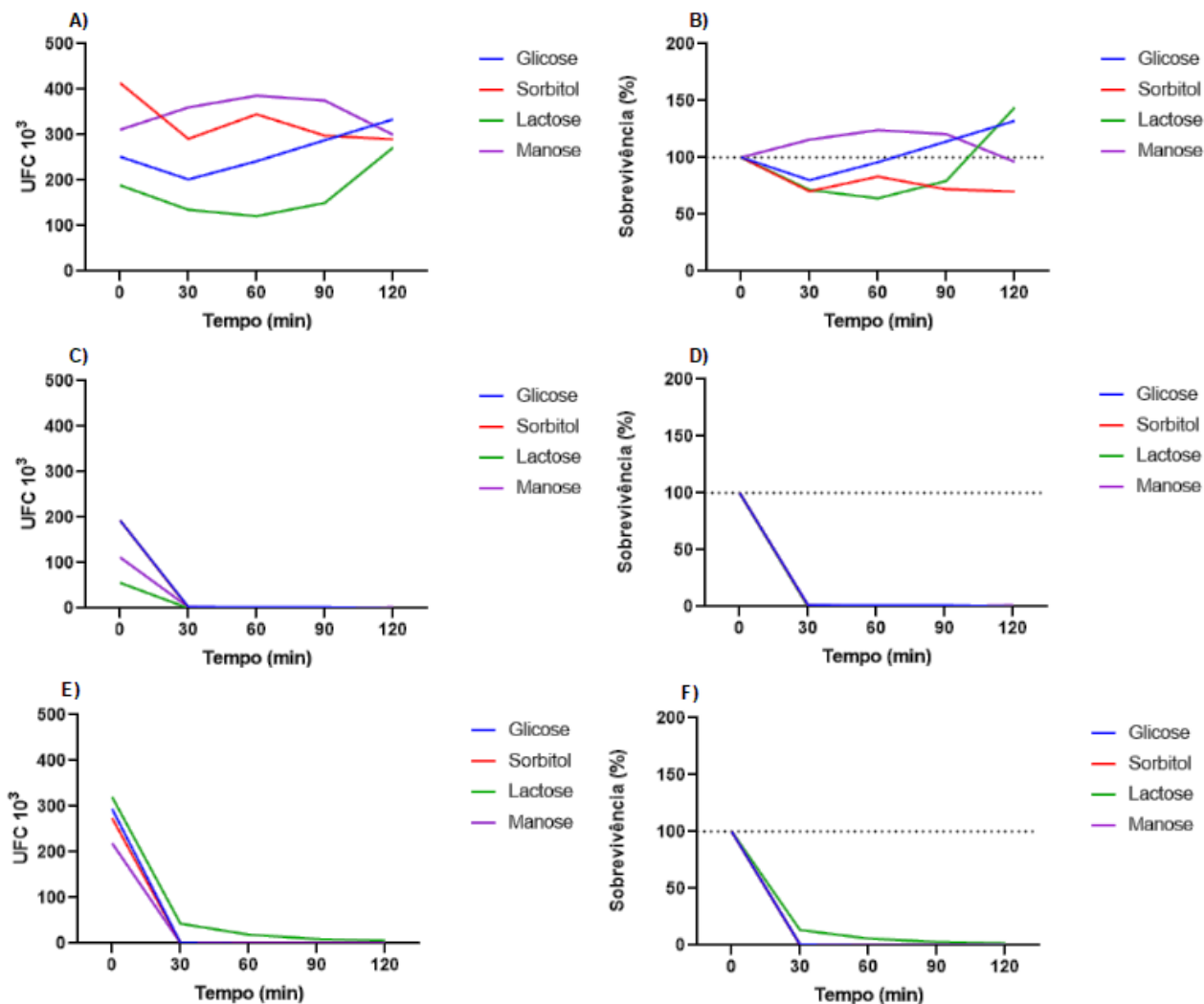


Figura 23: Sobrevivência dos isolados de Kp 31, Kp 34 e M93 em incubação em soro humano por 120 minutos. Os isolados foram previamente cultivados em M9 suplementado com glicose, sorbitol, lactose e manose. O resultado da quantidade de UFC recuperadas após o período de incubação de Kp 31 está em (A) enquanto a porcentagem de sobrevivência desse isolado no soro está em (B). Da mesma forma, a quantidade de UFC de Kp 34 em (C) e a porcentagem de sobrevivência em (D). Para M93 a quantidade de UFC está em (E) e a porcentagem em (F).

Em relação a capacidade de sobrevivência dos isolados em soro humano durante um período de 120 minutos, podemos observar que Kp 31 consegue sobreviver durante esse período em soro.

Contudo, Kp 34 e M93 não conseguem sobreviver e apresentam um declínio populacional bacteriano já nos primeiros 30 minutos de incubação em soro.

A linhagem bacteriana Kp 31 apresentou em (A) a quantidade de UFCs recuperadas ao longo dos 5 pontos de coleta nos tempos de 0, 30, 60, 90 e 120 minutos. Podemos observar que, inicialmente, nas fontes de carbono glicose, sorbitol e lactose ocorre uma redução do número de UFCs recuperadas nos primeiros 30 minutos. Contudo, no tempo de 60 minutos há um aumento no número de UFCs. Em 90 minutos continua a haver um aumento de UFCs em incubação em glicose e lactose enquanto em sorbitol percebemos um declínio. No tempo final de 120 minutos, glicose e lactose continuam com aumento da quantidade de UFCs enquanto sorbitol continua apresentando declínio. Em manose o comportamento que observamos é de aumento de UFCs até o tempo de 90 minutos e no ponto final de 120 minutos começa a acontecer uma diminuição de UFCs recuperadas.

Na figura 23 (B) nós conseguimos observar essas flutuações de sobrevivência bacteriana da Kp 31 em porcentagem. Podemos perceber que quando as linhas estão acima do valor de 100% está ocorrendo a sobrevivência e multiplicação bacteriana e abaixo desse valor nota-se morte bacteriana. Podemos concluir então que em glicose e lactose próximo aos 120 minutos de incubação ocorreu a sobrevivência e aumento da população bacteriana no soro. Em manose, apesar de ao final dos 120 minutos começar a ocorrer uma diminuição da quantidade bacteriana, ainda não havia ocorrido declínio populacional para valores inferiores ao inóculo bacteriano inicial. Em incubação em sorbitol ocorreu sobrevivência bacteriana só que sempre abaixo da quantidade da população inicial indicando que houve morte de parte da quantidade de bactérias.

Para Kp 34 (C e D) e M93 (E e F) podemos ver um comportamento bastante similar, ambas as linhagens bacterianas não são capazes de sobreviver em soro humano. Podemos observar que a partir de 30 minutos ocorre um declínio abrupto indicando a morte da população bacteriana. Em M93 podemos ver que uma quantidade bem pequena de bactérias sobrevive em lactose, mas a partir de 90 minutos não se observa mais nenhuma sobrevivência.

Dessa forma, podemos concluir que Kp 31 é capaz de sobreviver em soro pelo tempo de 120 minutos em todas as fontes de carbono testadas. Enquanto que Kp 34 e M93 não sobrevivem em soro humano pelo mesmo período.

A resistência de *Klebsiella* ao soro humano é estudada há muito tempo, em 1991 Podschun realizou um estudo comparando diferentes cepas de *K. pneumoniae* e *K. oxytoca* isoladas de diferentes fontes como hospitais, fezes e ambiente. Nestes estudos, encontrou diferentes capacidades de resistência ao soro dependendo da espécie e do local onde foi isolada, porém, observou-se que os isolados clínicos apresentavam alta capacidade de resistência ao soro. Kp 34 é um dos nossos isolados clínicos que não parece ter resistência ao soro humano. A cepa Kp 31 parece resistir relativamente bem ao período de incubação testado em soro.

O sistema complemento presente no soro humano é o que ajuda a promover a eliminação bacteriana, seja aumentando a atividade das células fagocíticas ou promovendo a lise bacteriana através da formação do complexo de ataque à membrana. *Klebsiella* possui sistemas para escapar do sistema complemento do soro, como a cápsula polissacarídica que funciona como uma barreira física às moléculas presentes no soro (AMAKO *et al.*, 1988) e o LPS que protege as bactérias contra a morte mediada pelo complemento (MERINO *et al.*, 1992).

Um estudo recente de 2021 (BALLÉN *et al.*, 2021) estudou 127 cepas de *K. pneumoniae* isoladas de urina, trato respiratório ou sangue e esses isolados foram caracterizados em relação a diversos fatores de virulência, incluindo resistência ao soro. Neste estudo, observou-se que destes isolados, mais de 50% eram altamente resistentes ao soro. Outros estudos realizados por (GAO *et al.*, 2020) mostram que dos 47 hvKp analisados, quase 50% eram resistentes ao soro. Como resultado, podemos observar uma quantidade significativa de *K. pneumoniae* resistentes ao soro humano.

Considerando a influência da presença de hiper mucoviscosidade e resistência ao soro, visto que se sabe que a cápsula funciona como mecanismo de proteção, Zhou mostrou que seus isolados hiper mucóides sobreviveram ao soro por mais tempo que os isolados não hiper mucóides. Porém, (CAPITANI *et al.*, 2024) mostrou um isolado HMV + (produtor de hiper mucoviscosidade) com alta

suscetibilidade ao soro. Portanto, não sabemos com clareza se a presença de hiper mucoviscosidade pode ou não influenciar a resistência sérica. Nosso isolado Kp 34, que possui fenótipo hiper mucóide, não apresentou resistência ao soro (ZHOU *et al.*, 2023).

Outro fator que parece ter influência na resistência ao soro é a presença de glicose, estudos (TANG *et al.*, 2023) mostram que a pré-incubação de *K. pneumoniae* em níveis elevados de glicose aumentam a proteção contra a morte sérica, promovendo uma explicação para as altas incidências de sepse e infecções invasivas por *K. pneumoniae* em pacientes com diabetes. Em nosso estudo podemos observar que a sobrevivência e multiplicação no soro de Kp 31 após o crescimento em glicose corrobora os resultados apresentados neste estudo. Contudo, os outros dois isolados (Kp 34 e M93) após serem incubados em glicose, ainda sim não foram capazes de resistir ao soro. Provavelmente, Kp 31 por ser isolada a partir de amostra de sangue apresenta mecanismos que a permitam sobreviver neste ambiente. Tais mecanismos não são encontrados em Kp 34, linhagem que foi isolada de *swab* retal.

Outros estudos também mostram que a exposição ao soro causa alterações metabólicas em *K. pneumoniae*. Este estudo mostrou que após exposição ao soro por 1 hora, modificou a produção de piruvato (composto produzido durante a quebra da glicose) o que afetou a virulência, a resistência ao estresse oxidativo, a sobrevivência e a biossíntese da cápsula em diferentes bactérias (MU *et al.*, 2023; GAO *et al.*, 2016; MIKE *et al.*, 2021). Observa-se então que há influência do açúcar na resistência ao soro, mas que essa exposição também influencia o metabolismo do açúcar e os mecanismos de virulência bacteriana.

6.6 Quantificação da expressão gênica de *mrkA* e *fucI* por qRT-PCR

Os resultados obtidos por meio de qRT-PCR dos genes *mrkA* e *fucI* estão representados na Figura 24 e Figura 25, respectivamente. A expressão observada é relativa ao gene basal utilizado, *rrsH*.

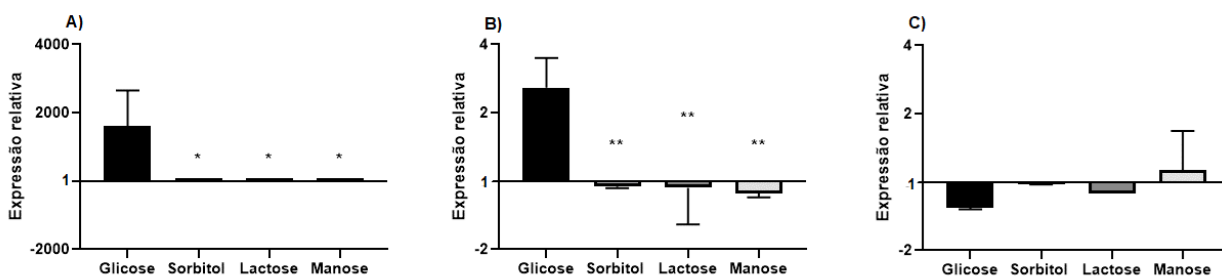


Figura 24: Expressão do gene *mrkA* nos isolados Kp 31 (A), Kp 34 (B) e M93 (C). A expressão foi verificada por meio de qRT-PCR nas linhagens bacterianas em M9 suplementado com glicose, sorbitol, lactose e manose. Em (A) podemos observar diferenças significativas (*) entre os valores encontrados em sorbitol, lactose e manose em relação ao valor encontrado em glicose. Em (B), também observam-se diferenças significativas (**) em sorbitol, lactose e manose em relação à glicose. Em (C) não são observadas diferenças significativas entre as fontes de carbono testadas.

Analisando a expressão gênica de *mrkA* por meio de qRT-PCR podemos verificar uma expressão variada desse gene a depender da linhagem bacteriana e da fonte de carbono.

Para Kp 31 (A) vemos uma expressão bastante elevada desse gene em cultivo em glicose com diferenças significativas ($p = 0,0210$) em relação as outras fontes de carbono.

Na Figura 24 (B) podemos observar a expressão de *mrkA* em Kp 34 que mostra novamente uma expressão maior em glicose e uma expressão menor que a do gene *rrsH* nas demais fontes. Novamente são observadas diferenças significativas entre a glicose e sorbitol ($p = 0,0040$), glicose e lactose ($p = 0,0037$) e glicose e manose ($p = 0,0026$). Embora nos isolados Kp 31 e Kp 34 ocorra uma expressão maior em glicose, a expressão em Kp 31 é 1000 vezes maior do que a expressão em Kp 34.

Para a linhagem M93 (C) observamos uma expressão menor do que *rrsH* em glicose, lactose e sorbitol. Apenas em manose verifica-se esse gene com uma expressão maior do que o gene basal.

Estudos mostram que a fímbria MrkA é o fator de patogenicidade mais predominante entre isolados de *K. pneumoniae*, um estudo com 69 estirpes mostrou que 100% delas carregavam o gene *mrkA* enquanto 78% possuíam o gene *fimA* (ALCÁNTAR-CURIEL *et al.*, 2013). Outro estudo com 457 cepas de *K. pneumoniae* mostrou que 81,81% possuíam o gene *mrkA* (BAKHTIARI *et al.*, 2021). A presença deste gene está constantemente relacionada com a capacidade de produzir biofilme forte

e este mesmo estudo observou que de todos os isolados que possuíam este gene, todos produziram biofilme forte ou moderado, não havendo produção de biofilme fraco e nenhuma cepa que não produzisse biofilme. Porém, quando fazemos essa classificação de biofilme fraco, moderado e forte, em todos os açúcares testados na triagem inicial houve a produção de biofilme fraco em alguns deles.

Além disso, outro ponto relevante deste estudo (BAKHTIARI *et al.*, 2021) é que observaram que o aumento da produção de biofilme parece estar associado ao aparecimento de multirresistência. Em nosso estudo podemos observar que os isolados possuem o gene *mrkA*, possuem capacidade de produzir biofilme e são todos multirresistentes também, corroborando esta correlação.

Um outro estudo que relaciona a expressão do gene *mrkA* a fontes de carbono mostrou que na presença de concentrações crescentes de glicose ocorria um aumento na expressão de fímbrias *mrkA* no entanto, a atividade formadora de biofilme foi reduzida (LIN *et al.*, 2016). Isso é corroborado por um estudo que confirma que a presença de glicose contribui na redução da formação de biofilme (JACKSON *et al.*, 2002). Em nosso estudo, verificamos que na presença de glicose há expressão elevada de fímbrias *mrkA* principalmente para o isolado Kp 31. No entanto, para M93 em glicose, a produção dessas fímbrias foi menor do que a expressão do gene *rrsH*. Em relação à diminuição da atividade formadora de biofilme na presença de glicose, observamos que, para as nossas linhagens, no biofilme de 24 horas, a produção em glicose não foi tão alta. Contudo, no biofilme de 5 dias, para Kp 31, houve uma grande produção de biofilme em glicose.

O efeito da glicose na expressão dessas fímbrias ocorre porque esse açúcar inibe o homodímero CRP-cAMP. Com essa inibição ocorre o aumento da concentração intracelular de c-di-GMP o que resulta em altos níveis de expressão de MrkH e MrkI e, portanto, de fímbrias tipo 3 (LIN *et al.*, 2016).

Outro mecanismo que influencia na expressão dos genes *mrkA* é o operon urease responsável pela reação a estímulos de estresse. O CpxAR (controla a expressão de genes envolvidos nas respostas ao estresse) regula negativamente a expressão das fímbrias do tipo 3, modulando os níveis de ferro celular e ativando a expressão de RyhB (relacionada principalmente com a resposta à disponibilidade

de ferro). O RyhB ativado reprime a expressão de fímbrias do tipo 3 por ligação de pareamento de bases à região 5' do mRNA de *mrkA* (KUO *et al.*, 2023).

Estudos também indicam que o gene *mrkA* nas cepas de *K. pneumoniae* fortemente encapsuladas é expresso em níveis maiores (SCHEMBRI *et al.*, 2005), fazendo uma correlação entre a produção de cápsulas e a expressão de fímbrias. Um dos mecanismos que relacionam a produção de cápsula com a expressão de fímbrias do tipo 3 envolvem EtcABC (um componente do *carbohydrate phosphotransferase systems* – PTS). Esse componente afeta positivamente a atividade transcricional do *galF*, um gene responsável pela produção de cápsula. Dessa forma, é capaz de influenciar na produção de cápsula.

Um outro mecanismo de regulação da expressão de fímbrias *mrkA* envolve o sistema OmpR/EnvZ, formado por dois componentes que detectam sinais osmóticos e controlam a expressão genética. Estudos mostraram que OmpR fosforilada regula a expressão de fímbrias tipo 3 influenciando a formação de biofilme de *K. pneumoniae* via MrkHIJ e modulação dos níveis intracelulares de c-di-GMP. Dessa forma, OmpR fosforilada atua como um fator crítico na regulação da via de sinalização c-di-GMP, expressão de fímbrias tipo 3 e quantidade de biofilme em *K. pneumoniae* em resposta a estresses osmóticos (LIN *et al.*, 2018).

Outro regulador transcricional, IscR, relacionado à expressão de genes envolvidos no sistema de aquisição de ferro e biossíntese de CPS também está envolvido na expressão de fímbrias *mrkA*. O IscR, por meio da via de sinalização c-di-GMP reprime diretamente a transcrição do *mrkHI*, indicando que o MrkHI é necessário para a regulação do IscR na expressão das fímbrias do tipo 3. Além disso, os experimentos realizados também mostraram que a deleção do gene *iscR* atenuou a virulência de *K. pneumoniae* em um modelo de peritonite em camundongos. Dessa forma, percebe-se o papel do *cluster* IscR no controle da expressão de fímbrias tipo 3 e seu efeito na patogênese de *K. pneumoniae* (LIN *et al.*, 2017).

Assim, podemos notar que uma diversidade de mecanismos e vias estão relacionadas e influenciam a expressão de fatores de virulência como as fímbrias tipo 3.

Também podemos observar que mesmo ocorrendo uma produção elevada de biofilme quando realizamos esses experimentos nas fontes de carbono manose, lactose e sorbitol, não houve uma expressão de fímbrias *mrkA* tão acentuada. E na fonte de carbono glicose, embora a produção de biofilme não seja tão acentuada, a expressão de fímbrias *mrkA* foi elevada principalmente para Kp 31 e Kp 34.

A expressão de fucose isomerase está associada à produção de hiper mucoviscosidade e ao potencial metastático de disseminação de *K. pneumoniae*. Por esta razão, a expressão do gene *fucI*, que codifica a fucose isomerase foi quantificada após a incubação das linhagens em meios contendo glicose, sorbitol, lactose e manose (Figura 25).

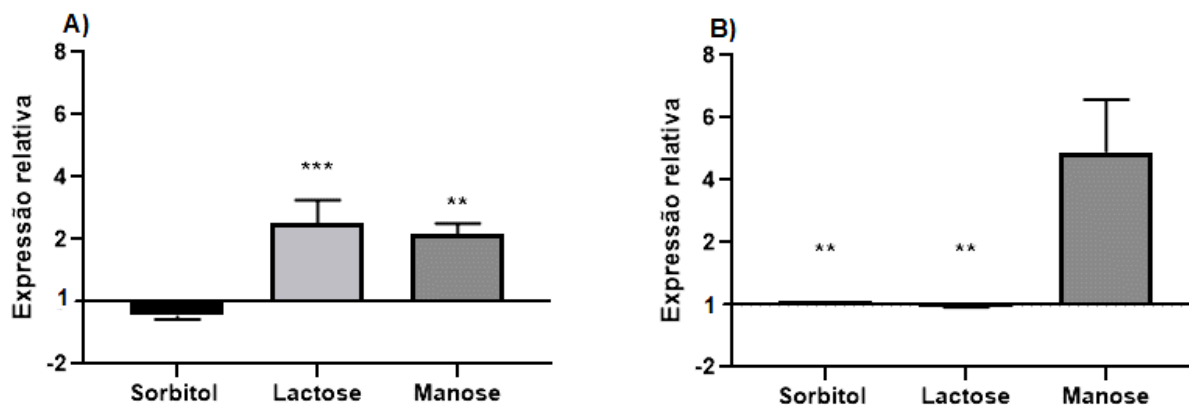


Figura 25: Expressão do gene *fucI* em Kp 34 (A) e M93 (B). A expressão foi analisada por qRT-PCR em M9 suplementado com glicose, sorbitol, lactose e manose. O gene *fucI* não foi expresso pela Kp 31 em nenhuma das fontes de carbono testadas. Também não houve expressão desse gene para Kp 34 e M93 em glicose. Em (A) as diferenças significativas em lactose (***) e manose (**) foram observadas em comparação à expressão encontrada em sorbitol. Em (B) as diferenças significativas (**) em sorbitol e lactose são em relação ao açúcar manose.

A expressão do gene *fucI* variou a depender da fonte de açúcar e da linhagem bacteriana. Em Kp 31 não houve a expressão desse gene em nenhuma das condições avaliadas, em Kp 34 e M93 não houve expressão em glicose.

Para a linhagem Kp 34 (B) houve expressão positiva desse gene em lactose e manose e uma expressão inferior ao gene de controle interno (*rrsH*) em sorbitol. Em relação ao sorbitol houve uma expressão significativa em lactose (p 0,0006) e manose (p 0,0013).

Para M93 (C) vemos uma maior expressão em manose, uma baixa expressão em sorbitol e uma expressão inferior ao gene *rrsH* em lactose. As diferenças significativas em sorbitol (p 0,0021) e lactose (p 0,0020) são em relação à manose.

O genoma de *K. pneumoniae* codifica um operon do metabolismo da fucose (fuc) altamente conservado em várias espécies de *Enterobacteriaceae*, cujo papel em sua patogênese permanece amplamente inexplorado. Contudo, já se identificou vários genes do fuc regulon como críticos para a infecção por *K. pneumoniae* (BRUCHMANN *et al.*, 2021). Além disso, nota-se um papel relevante do metabolismo desse açúcar para o sucesso desse patógeno na colonização do trato gastrointestinal e na modulação dos determinantes de virulência. Esse açúcar possui grande relevância para outros patógenos também, *E. coli* entero-hemorrágica (EHEC) utilizam a fucose exógena como um sinal para regular sua expressão de virulência ao colonizar o intestino e *S. Typhimurium* depende da fucose e ácido siálico para colonizar o trato gastrointestinal murino (FABICH *et al.*, 2008; NG *et al.*, 2013; PACHECO *et al.*, 2012).

Esse operon fuc permite o metabolismo da fucose que foi liberada das proteínas mucina glicosiladas pela microbiota intestinal residente (TAILFORD *et al.*, 2015) e é formado pelos seguintes genes: fucose permease, que importa fucose para a célula; fucose isomerase, uma enzima de catálise entre L-fucose e L-fuculose; e fucose aldolase, uma enzima que cliva a fucose.

Estudos já mostraram que *K. pneumoniae* é capaz de crescer com a fucose como a única fonte de carbono presente, embora o crescimento seja lento, indicando que essa fonte não é energeticamente a mais eficiente (HUDSON *et al.*, 2022). Também verificaram que os genes do operon fuc são altamente expressos quando o crescimento ocorre em fucose comparando com a glicose, indicando uma regulação deste operon pela disponibilidade dessa fonte de carbono. De fato, podemos observar que não houve a expressão do *fucI* em glicose na Kp 34 e M93, contudo houve expressão nas outras

fontes de carbono, em maior ou menor quantidade. E para o isolado Kp 31 não houve expressão desse gene em nenhuma das fontes de carbono testadas.

Já se tem descrito na literatura que as variantes hipervirulentas de *K. pneumoniae* apresentam o açúcar fucose em sua cápsula sendo responsável pela característica hipermucoviscosa (LIN *et al.*, 2018) e que a fucose é obtida a partir da conversão de manose realizada pelos genes *gmd* e *wcaG* (PAN *et al.*, 2011). Além disso, estudos realmente mostram que o crescimento em fucose aumenta consideravelmente a hipermucoviscosidade de *K. pneumoniae* (HUDSON *et al.*, 2022).

Dessa forma, ainda não se tem muitos estudos acerca desse gene e do metabolismo da fucose, mas já se tem descrito a sua influência em alguns fatores de virulência bacterianos, principalmente associados a hipermucoviscosidade e a hipervirulência.

O que observamos em nosso estudo é que uma das nossas linhagens não expressou esse gene e essa era a que não possuía o fenótipo hipermucoide. A linhagem Kp 34 que possui hipermucoviscosidade expressou o gene nas fontes de carbono utilizadas exceto a glicose. A linhagem M93 perdeu o fenótipo hipermucoide com a interrupção do gene da fucose isomerase mas continuou expressando o gene e de forma bem semelhante ao encontrada em Kp 34, não houve expressão em glicose. De forma geral, observamos que o comportamento de Kp 34 e M93 nos experimentos realizados foi similar entre essas duas linhagens, de forma que a mutação da fucose isomerase não parece ter impactado ou afetado drasticamente o desempenho da linhagem M93 em relação a Kp 34 nos experimentos realizados nesse trabalho.

7. Conclusões

Em uma análise conjunta dos três isolados podemos verificar que a manose foi uma fonte de carbono comum para as três linhagens na etapa inicial de seleção das fontes de carbono. Kp 31 apresentou uma capacidade muito elevada de produção de biofilme de 5 dias em comparação com Kp 31 e Kp 34. Os três isolados apresentaram alta produção de sideróforos, mas apenas Kp 31 é capaz de sobreviver ao soro humano. A expressão de fímbrias *mrkA* foi maior quando cultivada em glicose para os isolados Kp 31 e Kp 34 e para a linhagem M93 nessa fonte ocorreu a menor expressão desse

gene. Em relação ao gene *fucI* apenas as linhagens Kp 34 e M93 foram capazes de expressar esse gene, embora em glicose não tenha ocorrido a expressão.

Dessa forma, podemos verificar que a fonte de carbono influencia nos fatores de virulência bacterianos juntamente com outras características intrínsecas das próprias linhagens bacterianas utilizadas em nosso estudo.

Referências Bibliográficas

- AKOĞLU, Aylin. The effect of some environmental conditions on planktonic growth and biofilm formation by some lactic acid bacteria isolated from a local cheese in Turkey. *Biotechnology letters*, v. 42, p. 481-492, 2020.
- ALAV, Ilyas; SUTTON, J. Mark; RAHMAN, Khondaker Miraz. Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 73, n. 8, p. 2003-2020, 2018.
- ALCÁNTAR-CURIEL, María D. et al. Multi-functional analysis of *Klebsiella pneumoniae* fimbrial types in adherence and biofilm formation. *Virulence*, v. 4, n. 2, p. 129-138, 2013.
- ALLEN, Bradley L.; GERLACH, Gerald-F.; CLEGG, Steven. Nucleotide sequence and functions of mrk determinants necessary for expression of type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of bacteriology*, v. 173, n. 2, p. 916-920, 1991.
- AMAKO, KAZUNOBU; MENO, Y. U. K. O.; TAKADE, AKEMI. Fine structures of the capsules of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* K1. *Journal of bacteriology*, v. 170, n. 10, p. 4960-4962, 1988.
- ANDRADE, Leonardo Neves et al. Expansion and evolution of a virulent, extensively drug-resistant (polymyxin B-resistant), QnrS1-, CTX-M-2-, and KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 international high-risk clone. *Journal of clinical microbiology*, v. 52, n. 7, p. 2530-2535, 2014.
- APRIANTO, Rieza et al. High-resolution analysis of the pneumococcal transcriptome under a wide range of infection-relevant conditions. *Nucleic acids research*, v. 46, n. 19, p. 9990-10006, 2018.
- ASHWATH, Priyanka et al. Biofilm formation and associated gene expression in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolated from clinical specimens. *Current Microbiology*, v. 79, n. 3, p. 73, 2022.
- ATARASHI, Koji et al. Ectopic colonization of oral bacteria in the intestine drives TH1 cell induction and inflammation. *Science*, v. 358, n. 6361, p. 359-365, 2017.
- BÅGA, M. et al. Transcriptional activation of a pap pilus virulence operon from uropathogenic *Escherichia coli*. *The EMBO journal*, v. 4, n. 13B, p. 3887-3893, 1985.

BAKHTIARI, Ronak et al. Association between presence of RmpA, MrkA and MrkD genes and antibiotic resistance in clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates from hospitals in Tehran, Iran. *Iranian journal of public health*, v. 50, n. 5, p. 1009, 2021.

BALESTRINO, Damien et al. Characterization of type 2 quorum sensing in *Klebsiella pneumoniae* and relationship with biofilm formation. *Journal of bacteriology*, v. 187, n. 8, p. 2870-2880, 2005.

BALESTRINO, Damien et al. The characterization of functions involved in the establishment and maturation of *Klebsiella pneumoniae* in vitro biofilm reveals dual roles for surface exopolysaccharides. *Environmental microbiology*, v. 10, n. 3, p. 685-701, 2008.

BALLÉN, Victoria et al. Antibiotic resistance and virulence profiles of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different clinical sources. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 11, p. 738223, 2021.

BERG, Otto G.; VON HIPPEL, Peter H. Selection of DNA binding sites by regulatory proteins: II. The binding specificity of cyclic AMP receptor protein to recognition sites. *Journal of molecular biology*, v. 200, n. 4, p. 709-723, 1988.

BOCANEGRA-IBARIAS, Paola et al. Molecular and microbiological report of a hospital outbreak of NDM-1-carrying Enterobacteriaceae in Mexico. *PloS one*, v. 12, n. 6, p. e0179651, 2017.

BOTSFORD, James L.; HARMAN, James G. Cyclic AMP in prokaryotes. *Microbiological reviews*, v. 56, n. 1, p. 100-122, 1992

BRATU, Simona et al. Detection of KPC carbapenem-hydrolyzing enzymes in *Enterobacter* spp. from Brooklyn, New York. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 49, n. 2, p. 776-778, 2005.

BRISSE, Sylvain et al. wzi Gene sequencing, a rapid method for determination of capsular type for *Klebsiella* strains. *Journal of clinical microbiology*, v. 51, n. 12, p. 4073-4078, 2013.

BRUCHMANN, Sebastian et al. Identifying virulence determinants of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* in *Galleria mellonella*. *Pathogens and disease*, v. 79, n. 3, p. ftab009, 2021.

BUFFET, Amandine; ROCHA, Eduardo PC; RENDUELES, Olaya. Nutrient conditions are primary

drivers of bacterial capsule maintenance in *Klebsiella*. *Proceedings of the Royal Society B*, v. 288, n. 1946, p. 20202876, 2021.

ÇAM, Sedat; BRINKMEYER, Robin. The effects of temperature, pH, and iron on biofilm formation by clinical versus environmental strains of *Vibrio vulnificus*. *Folia Microbiologica*, v. 65, p. 557-566, 2020.

CAPITANI, Valerio et al. In vivo evolution to hypermucoviscosity and ceftazidime/avibactam resistance in a liver abscess caused by *Klebsiella pneumoniae* sequence type 512. *MSphere*, v. 9, n. 9, p. e00423-24, 2024.

CARATTOLI, Alessandra et al. Evolutionary trajectories toward ceftazidime-avibactam resistance in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 65, n. 10, p. 10.1128/aac.00574-21, 2021.

CATALÁN-NÁJERA, Juan Carlos; GARZA-RAMOS, Ulises; BARRIOS-CAMACHO, Humberto. Hypervirulence and hypermucoviscosity: two different but complementary *Klebsiella* spp. phenotypes?. *Virulence*, v. 8, n. 7, p. 1111-1123, 2017.

CHEN, Lijiang et al. Investigation of LuxS-mediated quorum sensing in *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of medical microbiology*, v. 69, n. 3, p. 402-413, 2020.

CHEN, Tao et al. Effects of iron on the growth, biofilm formation and virulence of *Klebsiella pneumoniae* causing liver abscess. *BMC microbiology*, v. 20, p. 1-7, 2020.

CHEN, Ying-Tsong et al. Sequencing and analysis of the large virulence plasmid pLVPK of *Klebsiella pneumoniae* CG43. *Gene*, v. 337, p. 189-198, 2004.

CHENG, H. Y. et al. RmpA regulation of capsular polysaccharide biosynthesis in *Klebsiella pneumoniae* CG43. *Journal of bacteriology*, v. 192, n. 12, p. 3144-3158, 2010.

CHIU, Cheng-Tang; LIN, Deng-Yn; LIAW, Yun-Fan. Metastatic septic endophthalmitis in pyogenic liver abscess. *Journal of clinical gastroenterology*, v. 10, n. 5, p. 524-527, 1988

CHOBY, J. E.; HOWARD-ANDERSON, J.; WEISS, D. S. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*—clinical and molecular perspectives. *Journal of internal medicine*, v. 287, n. 3, p. 283-300, 2020.

- CLEGG, Steven; MURPHY, Caitlin N. Epidemiology and virulence of *Klebsiella pneumoniae*. *Urinary Tract Infections: Molecular Pathogenesis and Clinical Management*, p. 435-457, 2017.
- CUSUMANO, Jaclyn A. et al. Weak biofilm formation among carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, v. 95, n. 4, p. 114877, 2019.
- DAI P., Hu D. The making of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *J. Clin. Lab. Anal.* 2022;36:e24743. doi: 10.1002/jcla.24743
- DAMJANOVA, Ivelina et al. Expansion and countrywide dissemination of ST11, ST15 and ST147 ciprofloxacin-resistant CTX-M-15-type β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* epidemic clones in Hungary in 2005—the new ‘MRSA’s’?. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 62, n. 5, p. 978-985, 2008.
- DAS, D. K.; NESTER, E. W. *TnphoA* and its use in transposon mutagenesis. *Advances in Microbiology*, v. 2014, 2014.
- DE KRAKER, Marlieke EA; STEWARDSON, Andrew J.; HARBARTH, Stephan. Will 10 million people die a year due to antimicrobial resistance by 2050?. *PLoS medicine*, v. 13, n. 11, p. e1002184, 2016.
- DE OLIVEIRA, David MP et al. Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *Clinical microbiology reviews*, v. 33, n. 3, p. 10.1128/cmr.00181-19, 2020.
- DELEO, Frank R. et al. Survival of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* sequence type 258 in human blood. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 61, n. 4, p. e02533-16, 2017
- DEUTSCHER, Josef et al. The bacterial phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system: regulation by protein phosphorylation and phosphorylation-dependent protein-protein interactions. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 78, n. 2, p. 231-256, 2014.
- DEUTSCHER, Josef; FRANCKE, Christof; POSTMA, Pieter W. How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbiology and molecular biology Reviews*, v. 70, n. 4, p. 939-1031, 2006.

DEUTSCHER, Josef. The mechanisms of carbon catabolite repression in bacteria. *Current opinion in microbiology*, v. 11, n. 2, p. 87-93, 2008.

DEVANGA RAGUPATHI, Naveen Kumar et al. The influence of biofilms on carbapenem susceptibility and patient outcome in device associated *K. pneumoniae* infections: insights into phenotype vs genome-wide analysis and correlation. *Frontiers in microbiology*, v. 11, p. 591679, 2020.

DI MARTINO, Patrick et al. *Klebsiella pneumoniae* type 3 pili facilitate adherence and biofilm formation on abiotic surfaces. *Research in microbiology*, v. 154, n. 1, p. 9-16, 2003.

EL FERTAS-AISSANI Irtas-Aissani, R. et al. Virulence profiles and antibiotic susceptibility patterns of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different clinical specimens. *Pathologie Biologie*, v. 61, n. 5, p. 209-216, 2013

FABICH, Andrew J. et al. Comparison of carbon nutrition for pathogenic and commensal *Escherichia coli* strains in the mouse intestine. *Infection and immunity*, v. 76, n. 3, p. 1143-1152, 2008.

FAN, Ting-Jia et al. *Enterococcus faecalis* gluconate phosphotransferase system accelerates experimental colitis and bacterial killing by macrophages. *Infection and Immunity*, v. 87, n. 7, p. 10.1128/iai.00080-19, 2019.

FANG, Chi-Tai et al. A novel virulence gene in *Klebsiella pneumoniae* strains causing primary liver abscess and septic metastatic complications. *The Journal of experimental medicine*, v. 199, n. 5, p. 697-705, 2004.

FARZAND, Robeena et al. A virulence associated siderophore importer reduces antimicrobial susceptibility of *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in microbiology*, v. 12, p. 607512, 2021.

FENG, Yu et al. Carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* of sequence type 36. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 62, n. 7, p. e02644-17, 2018.

FU, Li et al. Co-location of the blaKPC-2, blaCTX-M-65, rmtB and virulence relevant factors in an IncFII plasmid from a hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* isolate. *Microbial pathogenesis*, v. 124, p. 301-304, 2018.

FUNG, C. P. et al. A global emerging disease of *Klebsiella pneumoniae* liver abscess: is serotype K1 an important factor for complicated endophthalmitis?. *Gut*, v. 50, n. 3, p. 420-424, 2002.

FUX, Christoph A. et al. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends in microbiology*, v. 13, n. 1, p. 34-40, 2005.

GAO, Jianpeng et al. Pyruvate kinase is necessary for *Brucella abortus* full virulence in BALB/c mouse. *Veterinary research*, v. 47, p. 1-11, 2016.

GAO, Qianqian et al. Antimicrobial resistance and pathogenicity determination of community-acquired hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Microbial Drug Resistance*, v. 26, n. 10, p. 1195-1200, 2020.

GOMES, Ana Érika Inácio et al. Functional insights from KpfR, a new transcriptional regulator of fimbrial expression that is crucial for *Klebsiella pneumoniae* pathogenicity. *Frontiers in Microbiology*, v. 11, p. 601921, 2021.

GOSSET, Guillermo et al. Transcriptome analysis of Crp-dependent catabolite control of gene expression in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, v. 186, n. 11, p. 3516-3524, 2004.

GREENBLUM, Sharon; TURNBAUGH, Peter J.; BORENSTEIN, Elhanan. Metagenomic systems biology of the human gut microbiome reveals topological shifts associated with obesity and inflammatory bowel disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 109, n. 2, p. 594-599, 2012.

GU, Danxia et al. A fatal outbreak of ST11 carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese hospital: a molecular epidemiological study. *The Lancet infectious diseases*, v. 18, n. 1, p. 37-46, 2018.

GUAL-DE-TORRELLA, Ana et al. Prevalence of the fimbrial operon mrkABCD, mrkA expression, biofilm formation and effect of biocides on biofilm formation in carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates belonging or not belonging to high-risk clones. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 60, n. 4, p. 106663, 2022.

GUERRA, Maria Eduarda Souza et al. *Klebsiella pneumoniae* biofilms and their role in disease pathogenesis. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, v. 12, p. 877995, 2022.

HAN, Yu-Ling et al. Epidemiological characteristics and molecular evolution mechanisms of carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in microbiology*, v. 13, p. 1003783, 2022.

HANTUS, Charlotte E. et al. L-rhamnose globally changes the transcriptome of planktonic and biofilm *Escherichia coli* cells and modulates biofilm growth. *Microorganisms*, v. 12, n. 9, p. 1911, 2024.

HOANG, Johnson; STOEIBEL, Daniel M. The transcriptional response to low temperature is weakly conserved across the Enterobacteriaceae. *Msystems*, v. 9, n. 12, p. e00785-24, 2024.

HOBBS, Joanne K.; PLUVINAGE, Benjamin; BORASTON, Alisdair B. Glycan-metabolizing enzymes in microbe–host interactions: the *Streptococcus pneumoniae* paradigm. *FEBS letters*, v. 592, n. 23, p. 3865-3897, 2018.

HØIBY, Niels et al. The clinical impact of bacterial biofilms. *International journal of oral science*, v. 3, n. 2, p. 55, 2011.

HOLT, Kathryn E. et al. Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 112, n. 27, p. E3574-E3581, 2015.

HORNG, Yu-Tze et al. The role of EII complex in the bacterial responses to the glucose-survey in clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Plos one*, v. 18, n. 8, p. e0289759, 2023.

HOUOT, Laetitia et al. *Vibrio cholerae* phosphoenolpyruvate phosphotransferase system control of carbohydrate transport, biofilm formation, and colonization of the germfree mouse intestine. *Infection and immunity*, v. 78, n. 4, p. 1482-1494, 2010.

HSIEH, Pei-Fang et al. Serum-induced iron-acquisition systems and TonB contribute to virulence in *Klebsiella pneumoniae* causing primary pyogenic liver abscess. *Journal of Infectious Diseases*, v. 197, n. 12, p. 1717-1727, 2008.

HU, Jiangang et al. Effect of nutritional and environmental conditions on biofilm formation of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Applied Microbiology*, v. 132, n. 6, p. 4236-4251, 2022.

HUANG, Xueting et al. Capsule type defines the capability of *Klebsiella pneumoniae* in evading Kupffer cell capture in the liver. *PLoS Pathogens*, v. 18, n. 8, p. e1010693, 2022.

HUDSON, Andrew W. et al. *Klebsiella pneumoniae* l-fucose metabolism promotes gastrointestinal colonization and modulates its virulence determinants. *Infection and immunity*, v. 90, n. 10, p. e00206-22, 2022.

ISLAM, Salim T.; LAM, Joseph S. Synthesis of bacterial polysaccharides via the Wzx/Wzy-dependent pathway. *Canadian journal of microbiology*, v. 60, n. 11, p. 697-716, 2014.

JACKSON, Debra W.; SIMECKA, Jerry W.; ROMEO, Tony. Catabolite repression of *Escherichia coli* biofilm formation. *Journal of bacteriology*, v. 184, n. 12, p. 3406-3410, 2002.

JOHNSON, Jeremiah G. et al. Type 3 fimbriae and biofilm formation are regulated by the transcriptional regulators MrkHI in *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of bacteriology*, v. 193, n. 14, p. 3453-3460, 2011.

KARAMPATAKIS, Theodoros; TSENGOULI, Katerina; BEHZADI, Payam. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: virulence factors, molecular epidemiology and latest updates in treatment options. *Antibiotics*, v. 12, n. 2, p. 234, 2023.

KHAN, Israr et al. Mechanism of the gut microbiota colonization resistance and enteric pathogen infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 11, p. 716299, 2021.

KUO, Chih-Hao et al. Role of the stress-responsive two-component system CpxAR in regulating fimbriae expression in *Klebsiella pneumoniae* CG43. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, v. 56, n. 3, p. 464-476, 2023.

KWIECIŃSKA-PIRÓG, Joanna et al. How xylitol, gluten, and lactose change human gut microbiota *Escherichia coli* and *Lactobacillus rhamnosus* GG biofilm. *Nutrition*, v. 124, p. 112446, 2024.

LAM, Margaret MC et al. Population genomics of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* clonal-group 23 reveals early emergence and rapid global dissemination. *Nature communications*, v. 9, n. 1, p. 2703, 2018.

LEE, Chang-Ro et al. Strategies to minimize antibiotic resistance. *International journal of environmental research and public health*, v. 10, n. 9, p. 4274-4305, 2013.

LEE, Chen-Hsiang et al. The surface protein fructose-1, 6 bisphosphate aldolase of *Klebsiella pneumoniae* Serotype K1: role of interaction with neutrophils. *Pathogens*, v. 9, n. 12, p. 1009, 2020.

LENDENMANN, U. R. S.; SNOZZI, Mario; EGLI, Thomas. Kinetics of the simultaneous utilization of sugar mixtures by *Escherichia coli* in continuous culture. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 62, n. 5, p. 1493-1499, 1996.

LEWIS, Kim. Recover the lost art of drug discovery. *Nature*, v. 485, n. 7399, p. 439-440, 2012.

Li B., Zhao Y., Liu C., Chen Z., Zhou D. Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. *Future Microbiol.* 2014;9:1071–1081. doi: 10.2217/fmb.14.48.

LI, Bei et al. Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. *Future microbiology*, v. 9, n. 9, p. 1071-1081, 2014

LI, Cuidan et al. Genomic epidemiology of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in China. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, v. 20, n. 6, p. 1154-1167, 2022.

LIN, Ching-Ting et al. CRP-cyclic AMP regulates the expression of type 3 fimbriae via cyclic di-GMP in *Klebsiella pneumoniae*. *PLoS One*, v. 11, n. 9, p. e0162884, 2016.

LIN, Disi et al. The fructose-specific phosphotransferase system of *Klebsiella pneumoniae* is regulated by global regulator CRP and linked to virulence and growth. *Infection and Immunity*, v. 86, n. 8, p. 10.1128/iai.00340-18, 2018.

LIN, Tien-Huang et al. IscR regulation of type 3 fimbriae expression in *Klebsiella pneumoniae* CG43. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, p. 1984, 2017.

LIN, Tien-Huang et al. Phosphorylated OmpR is required for type 3 fimbriae expression in *Klebsiella pneumoniae* under hypertonic conditions. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, p. 2405, 2018.

LIU, Yung-Ching; Cheng, Deh-Lin; Lin, Chia-Lee. *Klebsiella pneumoniae* liver abscess associated with septic endophthalmitis. *Archives of internal medicine*, v. 146, n. 10, p. 1913-1916, 1986.

LV, Jingnan et al. The role of the two-component QseBC signaling system in biofilm formation and virulence of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* ATCC43816. *Frontiers in microbiology*, v. 13, p. 817494, 2022. .

MAGIORAKOS, A.-P. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical microbiology and infection*, v. 18, n. 3, p. 268-281, 2012.

MARTINEZ-ANTONIO, Agustino; COLLADO-VIDES, Julio. Identifying global regulators in transcriptional regulatory networks in bacteria. *Current opinion in microbiology*, v. 6, n. 5, p. 482-489, 2003. .

MCDONOUGH, Kathleen A.; RODRIGUEZ, Ana. The myriad roles of cyclic AMP in microbial pathogens: from signal to sword. *Nature Reviews Microbiology*, v. 10, n. 1, p. 27-38, 2012.

MERINO, S. et al. Mechanisms of *Klebsiella pneumoniae* resistance to complement-mediated killing. *Infection and immunity*, v. 60, n. 6, p. 2529-2535, 1992.

MIETHKE, Marcus; MARAHIEL, Mohamed A. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiology and molecular biology reviews*, v. 71, n. 3, p. 413-451, 2007.

MIKE, Laura A. et al. A systematic analysis of hypermucoviscosity and capsule reveals distinct and overlapping genes that impact *Klebsiella pneumoniae* fitness. *PLoS pathogens*, v. 17, n. 3, p. e1009376, 2021.

MIKI, Suguru et al. The *Klebsiella* mannose phosphotransferase system promotes proliferation and the production of extracellular polymeric substances from mannose, facilitating adaptation to the host environment. *Journal of Oral Biosciences*, v. 66, n. 1, p. 119-125, 2024.

MOELLERING JR, Robert C. NDM-1—a cause for worldwide concern. *New England Journal of Medicine*, v. 363, n. 25, p. 2377-2379, 2010.

MU, Andre et al. Integrative omics identifies conserved and pathogen-specific responses of sepsis-causing bacteria. *Nature communications*, v. 14, n. 1, p. 1530, 2023.

MÜLLER, Justus U. et al. Temperatures above 37° C increase virulence of a convergent *Klebsiella*

pneumoniae sequence type 307 strain. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 14, p. 1411286, 2024.

MURDOCH, Caitlin C.; SKAAR, Eric P. Nutritional immunity: the battle for nutrient metals at the host–pathogen interface. *Nature Reviews Microbiology*, v. 20, n. 11, p. 657-670, 2022.

MURPHY, Caitlin N.; CLEGG, Steven. *Klebsiella pneumoniae* and type 3 fimbriae: nosocomial infection, regulation and biofilm formation. *Future microbiology*, v. 7, n. 8, p. 991-1002, 2012.

NADEEM, Syeda Fatima et al. Antimicrobial resistance: more than 70 years of war between humans and bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, v. 46, n. 5, p. 578-599, 2020.

NASSRF, X. et al. Positive control of colanic acid synthesis in *Escherichia coli* by *rmpA* and *rmpB*, two virulence-plasmid genes of *Klebsiella pneumoniae*. *Molecular microbiology*, v. 3, n. 10, p. 1349-1359, 1989.

NG, Katharine M. et al. Microbiota-liberated host sugars facilitate post-antibiotic expansion of enteric pathogens. *Nature*, v. 502, n. 7469, p. 96-99, 2013.

NONNE, Francesca et al. Development and Application of a High-Throughput Method for the Purification and Analysis of Surface Carbohydrates from *Klebsiella pneumoniae*. *Biology*, v. 13, n. 4, p. 256, 2024.

PACHECO, Alline R. et al. Fucose sensing regulates bacterial intestinal colonization. *Nature*, v. 492, n. 7427, p. 113-117, 2012.

PACZOSA, Michelle K.; MECSAS, Joan. *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense. *Microbiology and molecular biology reviews*, v. 80, n. 3, p. 629-661, 2016.

PAN Y.-J., Lin T.-L., Chen C.-T., Chen Y.-Y., Hsieh P.-F., Hsu C.-R., Wu M.-C., Wang J.-T. Genetic analysis of capsular polysaccharide synthesis gene clusters in 79 capsular types of *Klebsiella* spp. *Sci. Rep.* 2015;5:15573. doi: 10.1038/srep15573.

PAN, Po-Chang et al. Mutation in fucose synthesis gene of *Klebsiella pneumoniae* affects capsule composition and virulence in mice. *Experimental biology and medicine*, v. 236, n. 2, p. 219-226, 2011.

PAN, Yi-Jiun et al. Capsular types of *Klebsiella pneumoniae* revisited by *wzc* sequencing. *PloS one*, v. 8, n. 12, p. e80670, 2013.

PANJAITAN, Novaria Sari Dewi et al. The PTS components in *Klebsiella pneumoniae* affect bacterial capsular polysaccharide production and macrophage phagocytosis resistance. *Microorganisms*, v. 9, n. 2, p. 335, 2021.

PATRO, L. Ponoop Prasad; SUDHAKAR, Karpagam Uma; RATHINAVELAN, Thenmalarchelvi. K-PAM: a unified platform to distinguish *Klebsiella* species K-and O-antigen types, model antigen structures and identify hypervirulent strains. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, p. 16732, 2020.

PAYNE, Shelley M. [25] Detection, isolation, and characterization of siderophores. *Methods in enzymology*, v. 235, p. 329-344, 1994.

PERALTA, Daiana R. et al. Enterobactin as part of the oxidative stress response repertoire. *PloS one*, v. 11, n. 6, p. e0157799, 2016.

PETERKOFISKY, Alan; GAZDAR, Celia. Glucose and the metabolism of adenosine 3': 5'-cyclic monophosphate in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 68, n. 11, p. 2794-2798, 1971.

PODSCHUN, R.; TESKE, E.; ULLMANN, U. Serum resistance properties of *Klebsiella pneumoniae* and *K. oxytoca* isolated from different sources. *Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin= International Journal of Hygiene and Environmental Medicine*, v. 192, n. 3, p. 279-285, 1991.

POKORZYNSKI, Nick D.; GROISMAN, Eduardo A. How bacterial pathogens coordinate appetite with virulence. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 87, n. 3, p. e00198-22, 2023.

POMAKOVA, D. K. et al. Clinical and phenotypic differences between classic and hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: an emerging and under-recognized pathogenic variant. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, v. 31, n. 6, p. 981-989, 2012.

POSTMA, Pieter W.; LENGELER, Joseph W.; JACOBSON, GR372926. Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiological reviews*, v. 57, n. 3, p. 543-594, 1993.

PU, Danni et al. “Superbugs” with hypervirulence and carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae*: the rise of such emerging nosocomial pathogens in China. *Science Bulletin*, 2023.

PULINGAM, Thiruchelvi et al. Antimicrobial resistance: Prevalence, economic burden, mechanisms of resistance and strategies to overcome. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 170, p. 106103, 2022.

PULINGAM, Thiruchelvi et al. Synergistic antibacterial actions of graphene oxide and antibiotics towards bacteria and the toxicological effects of graphene oxide on human epidermal keratinocytes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 142, p. 105087, 2020.

RAJEWSKA, Magdalena et al. Carbon Source and Substrate Surface Affect Biofilm Formation by the Plant-Associated Bacterium *Pseudomonas donghuensis* P482. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 25, n. 15, p. 8351, 2024.

RAKOFF-NAHOUM, Seth; COYNE, Michael J.; COMSTOCK, Laurie E. An ecological network of polysaccharide utilization among human intestinal symbionts. *Current Biology*, v. 24, n. 1, p. 40-49, 2014.

RIBEIRO, Suzana Meira et al. Understanding, preventing and eradicating *Klebsiella pneumoniae* biofilms. *Future Microbiology*, v. 11, n. 4, p. 527-538, 2016.

RIBEIRO, Suzana Meira et al. Understanding, preventing and eradicating *Klebsiella pneumoniae* biofilms. *Future Microbiology*, v. 11, n. 4, p. 527-538, 2016.

ROCHA, Marcos Fábio Gadelha et al. One health implications of antimicrobial resistance in bacteria from amazon river dolphins. *EcoHealth*, v. 18, p. 383-396, 2021.

RODRIGUES, Carla et al. Identification of *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella quasipneumoniae*, *Klebsiella variicola* and related phylogroups by MALDI-TOF mass spectrometry. *Frontiers in microbiology*, v. 9, p. 3000, 2018.

ROZEN, Steve; SKALETSKY, Helen. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Bioinformatics methods and protocols*, p. 365-386, 1999.

RUSSO, Thomas A. et al. Deciphering the relative importance of genetic elements in hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* to guide countermeasure development. *EBioMedicine*, v. 107, 2024.

RUSSO, Thomas A. et al. Hypervirulent *K. pneumoniae* secretes more and more active iron-acquisition molecules than “classical” *K. pneumoniae* thereby enhancing its virulence. *PLoS One*, v. 6, n. 10, p. e26734, 2011.

RUSSO, Thomas A. et al. Identification of biomarkers for differentiation of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* from classical *K. pneumoniae*. *Journal of clinical microbiology*, v. 56, n. 9, p. e00776-18, 2018.

RUSSO, Thomas A.; MARR, Candace M. Hypervirulent *klebsiella pneumoniae*. *Clinical microbiology reviews*, v. 32, n. 3, p. 10.1128/cmr.00001-19, 2019.

SAIER JR, Milton H. Cyclic AMP-independent catabolite repression in bacteria. *FEMS microbiology letters*, v. 138, n. 2-3, p. 97-103, 1996.

SANCHEZ, Carlos J. et al. Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. *BMC infectious diseases*, v. 13, p. 1-12, 2013.

SCHEMBRI, Mark A. et al. Capsule and fimbria interaction in *Klebsiella pneumoniae*. *Infection and immunity*, v. 73, n. 8, p. 4626-4633, 2005.

SCHROLL, Casper et al. Role of type 1 and type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation. *BMC microbiology*, v. 10, p. 1-10, 2010.

SEZONOV, Guennadi; JOSELEAU-PETIT, Danièle; D'ARI, Richard. *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *Journal of bacteriology*, v. 189, n. 23, p. 8746-8749, 2007.

SHU, Hung-Yu et al. Genetic diversity of capsular polysaccharide biosynthesis in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. *Microbiology*, v. 155, n. 12, p. 4170-4183, 2009.

SINGER, Andrew C.; KIRCHHELLE, Claas; ROBERTS, Adam P. (Inter) nationalising the antibiotic research and development pipeline. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 20, n. 2, p. e54-e62, 2020.

SINGH, Anirudh et al. Recent advances of engineered and artificial drug delivery system towards solid tumor based on immune cells. *Biomedical Materials*, v. 17, n. 2, p. 022003, 2022.

SINGH, Ashish Kumar et al. Classification of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* based on their in vitro biofilm forming capabilities and elucidation of the biofilm matrix chemistry with special reference to the protein content. *Frontiers in Microbiology*, v. 10, p. 669, 2019.

SIU, L. Kristopher et al. *Klebsiella pneumoniae* liver abscess: a new invasive syndrome. *The Lancet infectious diseases*, v. 12, n. 11, p. 881-887, 2012.

SOTO, Esteban et al. Biofilm formation of hypermucoviscous and non-hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* recovered from clinically affected African green monkey (*Chlorocebus aethiops sabaeus*). *Microbial pathogenesis*, v. 107, p. 198-201, 2017.

STAHLHUT, Steen G. et al. Biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae* on urethral catheters requires either type 1 or type 3 fimbriae. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, v. 65, n. 2, p. 350-359, 2012.

STANTON, Thomas D.; WYRES, Kelly L. What defines hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*?. *EBioMedicine*, v. 108, 2024.

STEPANOVIĆ, S. et al. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Letters in applied microbiology*, v. 38, n. 5, p. 428-432, 2004.

STRUVE, Carsten; BOJER, Martin; KROGFELT, Karen Angeliki. Characterization of *Klebsiella pneumoniae* type 1 fimbriae by detection of phase variation during colonization and infection and impact on virulence. *Infection and immunity*, v. 76, n. 9, p. 4055-4065, 2008.

SUBRAMANIAN, Pramodhini et al. Antibiotic resistance pattern of biofilm-forming uropathogens isolated from catheterised patients in Pondicherry, India. *The Australasian medical journal*, v. 5, n. 7, p. 344, 2012.

SUNDAR, Ganesh S. et al. A PTS EII mutant library in Group A *Streptococcus* identifies a promiscuous man-family PTS transporter influencing SLS-mediated hemolysis. *Molecular microbiology*, v. 103, n. 3, p. 518-533, 2017.

TAILFORD, Louise E. et al. Mucin glycan foraging in the human gut microbiome. *Frontiers in genetics*, v. 6, p. 81, 2015.

TAN, Jason WH et al. Positive autoregulation of mrkHI by the cyclic di-GMP-dependent MrkH protein in the biofilm regulatory circuit of *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of bacteriology*, v. 197, n. 9, p. 1659-1667, 2015.

TAN, Yi Han et al. Cell envelope defects of different capsule-null mutants in K1 hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* can affect bacterial pathogenesis. *Molecular microbiology*, v. 113, n. 5, p. 889-905, 2020.

TANG, H.-L. et al. Correlation between *Klebsiella pneumoniae* carrying pLVPK-derived loci and abscess formation. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, v. 29, p. 689-698, 2010.

TANG, Ling et al. Epidemiological features and impact of high glucose level on virulence gene expression and serum resistance of *Klebsiella pneumoniae* causing liver abscess in diabetic patients. *Infection and Drug Resistance*, p. 1221-1230, 2023.

TAPIA, Natalia Crespo et al. Different carbon sources result in differential activation of sigma B and stress resistance in *Listeria monocytogenes*. *International journal of food microbiology*, v. 320, p. 108504, 2020.

TAYLOR, Ronald K.; MANOIL, Colin; MEKALANOS, John J. Broad-host-range vectors for delivery of TnpA: use in genetic analysis of secreted virulence determinants of *Vibrio cholerae*. *Journal of Bacteriology*, v. 171, n. 4, p. 1870-1878, 1989.

THORNTON, Margaret M. et al. Multicellularity and antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* grown under bloodstream-mimicking fluid dynamic conditions. *The Journal of infectious diseases*, v. 206, n. 4, p. 588-595, 2012.

TIERREZ, Alberto; GARCÍA-DEL PORTILLO, Francisco. New concepts in *Salmonella* virulence: the importance of reducing the intracellular growth rate in the host. *Cellular microbiology*, v. 7, n. 7, p. 901-909, 2005.

TROXELL, Bryan; HASSAN, Hosni M. Transcriptional regulation by Ferric Uptake Regulator (Fur) in pathogenic bacteria. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, v. 3, p. 59, 2013.

VAN DEN BOGAARD, Patrick TC et al. Control of lactose transport, β -galactosidase activity, and

glycolysis by CcpA in *Streptococcus thermophilus*: evidence for carbon catabolite repression by a non-phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system sugar. *Journal of bacteriology*, v. 182, n. 21, p. 5982-5989, 2000.

VASICEK, Erin M. et al. L-arabinose transport and metabolism in *Salmonella* influences biofilm formation. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 11, p. 698146, 2021.

VUOTTO, C. et al. Biofilm formation and antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* urinary strains. *Journal of applied microbiology*, v. 123, n. 4, p. 1003-1018, 2017.

WANG, Lifeng et al. Resistance of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* to both intracellular and extracellular killing of neutrophils. *PLoS One*, v. 12, n. 3, p. e0173638, 2017.

WEI, Dan-dan et al. Emergence of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* hypervirulent clone of capsular serotype K1 that belongs to sequence type 11 in Mainland China. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, v. 85, n. 2, p. 192-194, 2016.

WERREN, Joel P. et al. Carbon source–dependent capsule thickness regulation in *Streptococcus pneumoniae*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, v. 13, p. 1279119, 2023.

WHITFIELD, Chris; WEAR, Samantha S.; SANDE, Caitlin. Assembly of bacterial capsular polysaccharides and exopolysaccharides. *Annual Review of Microbiology*, v. 74, n. 1, p. 521-543, 2020.

WILKSCH, Jonathan J. et al. MrkH, a novel c-di-GMP-dependent transcriptional activator, controls *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation by regulating type 3 fimbriae expression. *PLoS pathogens*, v. 7, n. 8, p. e1002204, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2022–2020 data. 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION et al. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. World Health Organization, 2014.

WU, Keh-Ming et al. Genome sequencing and comparative analysis of *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044, a strain causing liver abscess and meningitis. *Journal of bacteriology*, v. 191, n. 14, p. 4492-4501, 2009.

WU, Meng-Chuan et al. Isolation of genes involved in biofilm formation of a *Klebsiella pneumoniae* strain causing pyogenic liver abscess. *PloS one*, v. 6, n. 8, p. e23500, 2011.

WYRES, Kelly L. et al. Genomic surveillance for hypervirulence and multi-drug resistance in invasive *Klebsiella pneumoniae* from South and Southeast Asia. *Genome medicine*, v. 12, p. 1-16, 2020.

WYRES, Kelly L.; HOLT, Kathryn E. *Klebsiella pneumoniae* as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria. *Current opinion in microbiology*, v. 45, p. 131-139, 2018.

XU, Li et al. *Klebsiella pneumoniae* capsular polysaccharide: Mechanism in regulation of synthesis, virulence, and pathogenicity. *Virulence*, v. 15, n. 1, p. 2439509, 2024.

YANG, D.; ZHANG, Z. Biofilm-forming *Klebsiella pneumoniae* strains have greater likelihood of producing extended-spectrum β -lactamases. *Journal of Hospital Infection*, v. 68, n. 4, p. 369-371, 2008.

YAO, Shangjie et al. Sucrose contributed to the biofilm formation of *Tetragenococcus halophilus* and changed the biofilm structure. *Food Microbiology*, v. 124, p. 104616, 2024.

YEH, Kuo-Ming et al. Capsular serotype K1 or K2, rather than *magA* and *rmpA*, is a major virulence determinant for *Klebsiella pneumoniae* liver abscess in Singapore and Taiwan. *Journal of clinical microbiology*, v. 45, n. 2, p. 466-471, 2007

ZHANG, Miaomiao et al. L-arabinose affects the growth, biofilm formation, motility, c-di-GMP metabolism, and global gene expression of *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Bacteriology*, v. 205, n. 9, p. e00100-23, 2023.

ZHANG, Rong et al. Emergence of carbapenem-resistant serotype K1 hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* strains in China. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 60, n. 1, p. 709-711, 2016.

ZHANG, Wenli et al. Siderophores in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* promote ciprofloxacin resistance by inhibiting the oxidative stress. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 491, n. 3, p. 855-861, 2017.

ZHENG, Dongling et al. Identification of the CRP regulon using in vitro and in vivo transcriptional profiling. *Nucleic acids research*, v. 32, n. 19, p. 5874-5893, 2004.

ZHENG, Jin-xin et al. Biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae* bacteremia strains was found to be associated with CC23 and the presence of *wcaG*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, v. 8, p. 21, 2018.

ZHOU, Cong et al. Within-host resistance and virulence evolution of a hypervirulent Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* ST11 under antibiotic pressure. *Infection and Drug Resistance*, p. 7255-7270, 2023.

ZHU, J. et al. Virulence factors in hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Front Microbiol* 12: 642484 [em linha]. 2021.