



Universidade de Brasília

Faculdade de Saúde - Campus Darcy Ribeiro

Ciências Farmacêuticas

QUANTIFICAÇÃO DE SIDERÓFOROS EM *Klebsiella pneumoniae* e *Klebsiella variicola* NA PRESENÇA DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO.

DANIELA DE FREITAS MACHADO

Prof.^a ANA FLÁVIA PARENTE

Brasília

2025

Daniela de Freitas Machado

QUANTIFICAÇÃO DE SIDERÓFOROS EM *Klebsiella pneumoniae* e *Klebsiella variicola* NA PRESENÇA DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO.

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito para obtenção
do título de Bacharel em Farmácia, pela
Universidade de Brasília.

Orientador(a): Prof.^a Ana Flávia Alves
Parente.

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Professora: Ana Flávia Alves Parente- – IB/UnB - Orientadora

Professora: Tanise Vendruscolo Dalmolin– FS/UnB – Examinadora interna

Dedico esse trabalho à Daniela criança, que sempre temeu o futuro.

E aos meus pais, Clesio e Eliete, por tudo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, ao universo, ao destino, a sorte e a qualquer força que me acompanha nos meus dias e que sempre acaba me colocando no exato lugar e exato momento que devo estar.

Meus pais nunca devem estar em nenhum lugar menos que o topo. Além da admiração que tenho por eles, levo comigo o orgulho de crescer e perceber cada vez mais características deles que herdei em mim, desde a aparência até seus valores e princípios mais honráveis que darei meu melhor para me dignificar a eles: A humildade, a parceria e a doação aos outros. Obrigada por sempre me apoiarem e comorarem meus feitos, mesmo que não soubessem o que significavam, apenas ficavam feliz por minha felicidade. Sei que se pudessem ter lido meus livros, feito meus trabalhos e realizados meus estágios, para tirar um pouco do peso da rotina que carreguei por 6 anos. Mas, apenas saber dessa vontade já foi o bastante. Amo vocês.

Gostaria de agradecer também às minhas meninas, que compartilharam comigo toda a ansiedade e emoção de ser uma UnBsistária e uma jovem ansiosa por viver. Andréa, Maria e Victória obrigaram por serem meu conforto e confidentes. Não preciso traduzir meus pensamentos nem meus sentimentos, vocês *apenas* entendem.

João (representando aqui todos os meus colegas que me acompanharam na graduação) cujo conheci nos primeiros momentos da UnB, obrigada por ser um sopro de alívio e fonte de risada nos meus dias.

Quero também agradecer a minha família. Infelizmente (ou felizmente), vocês são muitos para citar. Mas, em especial, minha vó 'Biu'. Sonho em algum dia ter um coração tão bom quanto o seu.

Por último, mas não menos importante, gostaria de agradecer a Profª Ana Flávia Parente. Em 2021, ainda na pandemia, se dispôs a me acolher e me dar um espaço em seu laboratório e por 3 anos foi uma figura representativa de tudo que eu mais admirei na pesquisa e ciência.

Aqui vai para você também, Daniela. Pode suspirar de alívio! Sei que algum dia você lamentará de saudades dessa época, como a boa melancólica que é.

Não fique presa ao passado e não anseie o futuro, apenas esteja aqui, no agora.

Toda noite eu me deito na cama e as cores mais brilhantes enchem minha cabeça.

Um milhão de sonhos estão me mantendo acordada.

-The Greatest Showman

RESUMO

Bactérias do gênero *Klebsiella* são foco de grande preocupação na saúde global, principalmente por sua associação a infecções graves e alta capacidade de adquirir resistência a antimicrobianos. Dentre as espécies desse gênero, *Klebsiella pneumoniae* e *Klebsiella variicola* se destacam por serem oportunistas e infectarem pacientes internados em Unidades de Tratamento Intensivo. Sua capacidade de promover infecção está relacionada à expressão de diversos fator de virulência, tais como formação de biofilme, fimbrias e produção de sideróforos. Em UTIs, a alimentação é cuidadosamente balanceada para atender às necessidades energéticas do paciente sem sobrecarregar o metabolismo, considerando as condições clínicas específicas, incluindo açúcares, como sorbitol e lactose. Contudo, esses açúcares poderiam ter outro impacto? Alguns estudos anteriores mostram como as fontes de carbono podem não apenas sustentar o crescimento bacteriano, mas também influenciar diretamente a expressão de determinantes de virulência, entre eles a expressão de sideróforos e dada a sua relevância na sobrevivência bacteriana e na colonização de hospedeiros, entender esses mecanismos é crucial para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas. O objetivo dessa pesquisa é relatar uma possível relação entre diferentes fontes de carbono e expressão de sideróforos em cepas bacterianas de *K. pneumoniae* e *K. variicola* obtidas de pacientes com bacteremia do Hospital Universitário de Brasília como maneira de catalogar mecanismos facilitadores de virulência bacteriana em microrganismos patogênicos que são preocupação na saúde global. Como resultado, a partir de análises estatísticas por meio de ANOVA e Teste de Tukey, foi observado que diferentes isolados em diferentes açúcares foram divergentemente quantificados um do outro, mostrando que há uma influência da fonte de carbono nesse fator de virulência específico. Contudo, são necessários estudos adicionais como proteômica e sequenciamento de genes para compreender melhor esse mecanismo, além de realizar um controle de qualidade mais abrangente que garanta que os resultados divergentes estão relacionados a expressão de sideróforos, excluindo outras possibilidades.

Palavras-chave: [sideróforos], [*klebsiella pneumoniae*], [*klebsiella variicola*] [fatores de virulência], [lactose], [glicose], [manose], [sorbitol].

ABSTRACT

Bacteria belonging to the genus *Klebsiella* are in focus due to increasing concern in global health, mainly due to their association with severe infections and their high ability to acquire antimicrobial resistance. Moreover, *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella variicola*, both species, are notably opportunistic pathogens in patients admitted to Intensive Care Units (ICUs) due to biofilm production, which is considered a virulence factor. In ICUs, nutrition is carefully balanced to meet the patient's energy needs without overloading the metabolism, considering specific clinical conditions, including sugars such as sorbitol and lactose. However, could these sugars have other impacts? Previous studies have shown that carbon sources can not only sustain bacterial growth but also directly influence the expression of virulence determinants, including the expression of siderophores. Given their relevance in bacterial survival and host colonization, understanding these mechanisms is crucial for the development of new therapeutic approaches. The aim of this research is to report a possible relationship between different carbon sources and siderophore expression in bacterial strains of *K. pneumoniae* and *K. variicola* obtained from patients with bacteremia at the University Hospital of Brasília, as a means of cataloging mechanisms that help bacterial virulence in pathogenic microorganisms that are a concern in global health. As a result, based on statistical analyses using ANOVA and Tukey's test, it was observed that different isolates in different sugars were divergently quantified from one another, indicating that the carbon source influences this specific virulence factor. However, additional studies, such as proteomics and gene sequencing, are necessary to better understand this mechanism, as well as a more comprehensive quality control to ensure that the divergent results are related to siderophore expression, excluding other possibilities.

Key words: [siderophores], [*klebsiella pneumoniae*], [*klebsiella variicola*] [virulence factors], [lactose], [glucose], [mannose], [sorbitol].

LISTA DE ABREVIATURAS

ITUs: infecções do trato urinário

MDR: multirresistentes

MALDI-TOF MS: ionização/dessorção a laser assistida por matriz acoplada a espectrometria de massa por tempo de voo

UTIs: unidades de terapia intensiva

CRKp: *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenêmicos

CKp: *Klebsiella pneumoniae* clássica

hvKp: *Klebsiella pneumoniae* hipervirulenta

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	1
JUSTIFICATIVA	8
OBJETIVOS.....	9
METODOLOGIA.....	10
DESENVOLVIMENTO	Erro! Indicador não definido.
CONCLUSÃO.....	21
REFERÊNCIAS	23

INTRODUÇÃO

1.1 O GENÊRO *KLEBSIELLA*

As bactérias do gênero *Klebsiella*, que pertencem à família *Enterobacterales*, são Gram-negativas, apresentam forma de bastonete e são imóveis, caracterizando-se por uma cápsula polissacarídica proeminente. Normalmente são encontradas na microbiota intestinal de humanos, mas podem provocar infecções em diversas partes do corpo, resultando em síndromes clínicas variadas, como pneumonia adquirida na comunidade, infecções do trato urinário (ITU), infecções hospitalares, bacteremia e sepse (PODSCHUN, R *et al.*, 1998). A principal espécie desse gênero responsável por infecções em humanos é a *Klebsiella pneumoniae* e sua importância como patógeno se deve a sua capacidade de expressar vários fatores de virulência (TEIXEIRA, D.A *et al.*, 2020).

K. pneumoniae foi descrita pela primeira vez por Carl Friedlander em 1882 como uma bactéria isolada dos pulmões de pacientes que morreram de pneumonia, daí vem seu nome. Hoje é a espécie de *Klebsiella* mais importante clinicamente e em habitats naturais, é onipresente no solo, fontes de água de superfície, plantas e no trato gastrointestinal de mamíferos (NDLOVU, T *et al.*, 2023). No âmbito clínico, são conhecidos por serem patógenos oportunistas, ocasionando vários tipos de infecções em humanos, em sua parte em pacientes já hospitalizados e imunodeprimidos, causando surtos nosocomiais, (MARTIM, RM *et al.*, 2018), embora nem todos os portadores de *K. pneumoniae* desenvolvam o estado da doença (NDLOVU, T *et al.*, 2023). Outras cepas de *K. pneumoniae* são hipervirulentas, hvKp, sendo capazes de infectar pessoas saudáveis em ambientes hospitalares e causando infecções graves como meningite, possuindo vários fatores de virulência codificados por plasmídeos exclusivos de hvKp como resistência a metais pesados e cápsula mucoide (SANIKHANI, R *et al.*, 2021).

Esse alto nível de contaminação, tanto de cKp (*Klebsiella pneumoniae* clássica) quanto de hvKp, ocorre devido à sua capacidade de se espalhar rapidamente no ambiente hospitalar, através do toque do pessoal, contato de superfícies e equipamentos contaminados e fato de ser um ambiente fechado. Por isso, uma série de medidas são necessárias para prevenir essa disseminação, como cuidados rigorosos com cateteres urinários, traqueostomias intravenosas, manutenção e cuidado de equipamentos e boas práticas de higiene como a lavagem correta das mãos. Além disso, uma medida para controlar infecções por *Klebsiella* é a regulamentação do uso de antibióticos no hospital para prevenir o uso indevido e excessivo de antibióticos, visto que é principal e quase única forma de tratamento (PODSCHUN, R *et al.*, 1998).

Como resultado desse uso errôneo de antibióticos, surgiu-se um novo grupo de *K. pneumoniae*, que codifica carbapenemases (CRPK). Resultante de inúmeras mutações ocasionados pela pressão seletiva em ambientes hospitalares que tornaram essa espécie naturalmente resistente a essa classe de medicamentos, tais como penicilinas, e carregam resistência adquirida a múltiplos antimicrobianos, sendo mais difíceis de tratar (WYRES, KL *et al.*, 2020). Em 2024, a OMS atualizou a lista de patógenos bacterianos prioritários, categorizando a *K. pneumoniae* resistente a carbapenêmicos (CRKP) entre o grupo crítico ficando em 1º lugar, diferentemente de 2017, quando estava na posição nº5, o que já representa um número alto (OMS, 2024).

Evidências sugerem que a resistência de antibióticos aumentou durante a pandemia do COVID-19, e apesar do tratamento da COVID-19 com essa classe de medicamentos seja ineficaz, essa prescrição é realizada pois os pacientes podem apresentar sintomas semelhantes aos de pneumonias bacterianas ou suspeitas de coinfeções. Em um estudo de meta análise realizada para saber a prevalência de resistência a antibióticos de pacientes, dados mostraram que 62% dos pacientes contaminados por *K. pneumoniae*, ou seja 169, possuíam resistência a antibióticos (KARIYAWASAM, RM *et al.*, 2022).

A prevalência crescente de *K. pneumoniae* multirresistente a antibióticos deixa os profissionais de saúde com menos opções de tratamento. Devido a isso, esforços são necessárias para o desenvolvimento de métodos alternativos que complementam a terapia com antibióticos e ajudam a combater o desenvolvimento e a disseminação da resistência no futuro (MARTIM, RM *et al.*, 2018).

Já outra espécie que vem se tornando emergente como patógeno em humanos é a *Klebsiella variicola*, que corresponde a uma expansão taxonômica do complexo *K. pneumoniae*, e assim como tal, é um patógeno oportunista responsável por diversas infecções como: infecções da corrente sanguínea (ICS), infecções do trato respiratório e infecções do trato urinário (ITUs) (MEDINA, RODRIGUEZ *et al.*, 2019). Em 2004, estudos utilizando isolados clínicos e ambientais, até aquele momento classificados como *K. pneumoniae*, demonstraram significativas diferenças genéticas e bioquímicas que sustentaram sua classificação em uma nova espécie, denominada *K. variicola* (ROSENBLUETH, M *et al.*, 2004). Os membros desse complexo podem ser corretamente identificados e distinguidos de *K. pneumoniae*, com base no sequenciamento do genoma completo (WGS), pelo sequenciamento de genes marcadores taxonômicos ou por espectrometria de massas. No entanto, esses métodos nem sempre estão disponíveis na rede de saúde e por esse motivo são identificados erroneamente usando métodos

laboratoriais padrão, o que mascara sua importância epidemiológica (RODRIGUES, C et al., 2019).

Um exemplo, seria o primeiro relato de caso clínico de meningite causado por *K. variicola*, após uma neurocirurgia, no Japão. A bactéria foi identificada erroneamente como *K. pneumoniae* pelo sistema automatizado VITEK2 no exame de laboratório clínico. Posteriormente, foi isolada do sangue e do líquido cefalorraquidiano, e a identificação correta da espécie bacteriana foi realizada usando espectrometria de massas utilizando ionização a laser assistida por matriz e tempo de voo (MALDI-TOF MS), além de sequenciamento do genoma completo (AKINE, D8 et al., 2019).

O primeiro relato de infecções causadas por *K. variicola* em um ambiente clínico, ocorreu nos anos 90 que diz respeito a surto hospitalar pediátrico ocorrido durante os períodos 1990-1992 e 1996-1998 nos hospitais do México, onde quatorze isolados clínicos de *Enterobacteriaceae* foram selecionados. Das espécies incluídas, duas eram de *K. variicola* (GARZA-RAMOS U et al., 2007). O nome da espécie 'variicola' é derivado do adjetivo latino 'varius' que significa diferente e do verbo latino 'colere', habitar, já que *K. variicola* é recuperado, além de humanos, de plantas, encontrada em uma ampla diversidade de nichos naturais (BRISSE, S et al., 2006). *K. variicola* tem a capacidade de fixar nitrogênio na rizosfera e no solo; produz ácido indol acético, acetoina e amônia; e dissolve fósforo e potássio, que desempenham um papel importante na promoção do crescimento e nutrição das plantas e sua relação mutualística entre colônias de formigas cortadeiras e fungos foi o primeiro exemplo registrado (DURAN-BEDOLLA et al., 2021) (MEDINA, RODRIGUEZ et al., 2019). Atualmente, é considerada uma espécie bacteriana que pode infectar humanos como um patógeno e colonizar plantas como um endófito e, em alguns casos, como patógeno.

Essa espécie está se tornando uma preocupação de saúde pública não apenas pelas infecções que pode causar, mas também devido ao seu potencial de adquirir genes antimicrobianos e de virulência, complicando o manejo clínico das infecções produzidas por essa espécie (MEDINA, RODRIGUEZ et al., 2019). Farzana et al. (2019) descreveu um surto de sepse neonatal causado por *K. variicola* multirresistente (MDR) em Bangladesh entre 2016 e 2017 e encontraram uma mortalidade significativa atribuível a *K. variicola*. (FARZANA et al., 2019).

A importância das infecções humanas por *K. pneumoniae* é conhecida; no entanto, existe uma escassez de conhecimento relacionado a *K. variicola*. Apesar de sua crescente importância

clínica, análises abrangentes da estrutura populacional de *K. variicola* e investigações funcionais de fatores de virulência e genes de resistência a antibióticos ainda não foram realizadas (POTTER, RF *et al.*, 2018).

1.2 FATORES DE VIRULÊNCIA

Fatores de virulência são um tópico importante quando se fala da patogenicidade. Virulência refere-se à capacidade do microrganismo de sobreviver e causar infecção no hospedeiro. Ainda, o termo ‘virulência’ pode se referir à gravidade e intensidade dos processos infecciosos. Simplificando, quanto maior o repertório e eficácia dos fatores de virulência um microrganismo, maior será sua capacidade de causar doenças. Os fatores de virulência incluem estruturas (como flagelos e cápsulas), produtos químicos (como enzimas e toxinas) e estratégias (como parasitismo) que ajudam os microrganismos a invadirem, espalhar-se, causar danos aos tecidos e escapar das respostas imunológicas do hospedeiro (PARIJA, S.C *et al.*, 2012).

As espécies do gênero *Klebsiella* possuem muitos fatores de virulência, como uma cápsula que impede a fagocitose por granulócitos polimorfonucleares e múltiplas adesinas que promovem a adesão às células hospedeiras (TEIXEIRA, D.A *et al.*, 2020). Além destes mecanismos, *Klebsiella pneumoniae* também possui a capacidade de competir por nutrientes dentro das células hospedeiras. Um dos micronutrientes competidos é o ferro (Fe), essencial para a replicação e crescimento de bactérias. Para isso, produzem sideróforos, que são agentes quelantes que fazem parte de um sistema de aquisição de Fe altamente eficiente usado para remover Fe do ambiente (KURTH C *et al.*, 2016) (SIMON C. ANDREWS *et al.*, 2003).

Diante do cenário de negligência na identificação de *K. variicola*, a relação dos fatores de virulência expressos por essa espécie com a mortalidade não é amplamente investigada. Um estudo de Maatallah M e colaboradores, registrou resultados que indicaram uma maior mortalidade entre pacientes infectados com isolados pertencentes a essa espécie. O estudo foi realizado com o objetivo de determinar uma associação entre filogrupos, fatores de virulência e mortalidade após infecção da corrente sanguínea (ICS) causada por *Klebsiella pneumoniae* na Suécia. Além de *K. pneumoniae*, foram identificados *K. quasipneumoniae* e *K. variicola*. Por fim, a mortalidade em 30 dias foi mais comumente associada a cepas infectantes pertencentes a *K. variicola*. Contudo, o aumento da mortalidade não pôde ser relacionado a nenhum fator de virulência conhecido. (MAATALLAH, M *et al.*, 2014).

Um estudo realizado em Brasília, feito por De Campos, TA e colaboradores, corrobora com a hipótese de *K. variicola* ter viruloma distinto das demais espécies do gênero, já apresentada por Rodriguez-Medina e colaboradores apesar de terem identificado que as cepas de *K. variicola* abrigavam fatores de virulência clássicos de *K. pneumoniae*, entre outros, a produção do sideróforo fenolato enterobactina. De acordo com seu relatório examinando cinco cepas de *K. variicola* (Kv15, Kv35, Kv57, Kv97 e Kv104), que foram identificadas pela primeira vez como *K. pneumoniae*, as características moleculares e genômicas das cepas abrigam diferentes fatores de virulência pertencentes a novos clones. Todas essas cepas foram submetidas à caracterização genômica para determinar seus tipos de sequência (STs), virulência, genes de resistência antimicrobiana, além de ensaios para avaliar seu potencial patogênico. Os resultados destacam que as cepas estudadas exibem genes e fenótipos relacionados à virulência, espelhando fatores considerados clássicos em *K. pneumoniae*. Uma observação notável foi que, embora o fenótipo hipermucoide tenha sido verificado, os seus genes reguladores transcricionais não foram encontrados nas cepas de *K. variicola* analisadas. Esses genes são considerados essenciais para o fenótipo hipervirulento em *K. pneumoniae* e não foram encontrados nas cepas de *K. variicola* analisadas, sugerindo que essa espécie utilize genes e promotores distintos para expressão do fenótipo hipermucoide. (DE CAMPOS, TA *et al.*, 2021)

1.3 SIDERÓFOROS

Enterobactina, assim como aerobactina, são exemplos de sideróforos bacterianos, quelantes naturais. Quelante é uma substância com a capacidade de fixar íons metálicos, formando um complexo (quelato), solúvel e não tóxico (PORTO EDITORA DICIONÁRIOS, 2024). Na patogenicidade, facilitam a absorção de íons Fe para crescimento bacteriano.

O Fe é necessário para muitos processos necessários à vida, incluindo replicação de DNA, transferência de elétrons e fosforilação oxidativa. No entanto, a disponibilidade desses íons é limitada, uma vez que, o ferro ferroso (Fe^{2+}) é altamente tóxico em sua forma livre enquanto o ferro férrico (Fe^{3+}) é insolúvel em pH fisiológico e não é facilmente biodisponível (SCHWYN B, NEILANDS JB, 1987). Em mamíferos, a maior parte do Fe no corpo humano é ligada por proteínas de armazenamento, transporte e metabólicas. Dessa forma, durante a infecção, os patógenos se deparam com um ambiente extremamente pobre em Fe e sua capacidade de captá-lo torna-se essencial para sua sobrevivência e colonização do hospedeiro.

Caso o patógeno não tenha estratégias eficientes de captura de Fe, diversos processos podem ser prejudicados (KURTH C *et al.*, 2016) (SIMON C. ANDREWS *et al.*, 2003.).

De acordo com o estudo publicado em 2003 (SIMON C. ANDREWS *et al.*, 2003.) sobre a homeostase bacteriana do Fe, as bactérias o requerem para replicação durante a infecção. Nesse sentido, os patógenos devem competir para adquirir Fe, que é rigidamente regulado pelo hospedeiro, que em caso de mamíferos, pode ser exemplificado pelo emprego de proteínas de ligação ao Fe (transferrina, lactoferrina), que reduzem os níveis de Fe extracelular livre para níveis insuficientes, impedindo o crescimento bacteriano (SIMON C. ANDREWS *et al.*, 2003). Para superar essa ligação rígida do Fe por moléculas do hospedeiro, bactérias e alguns fungos secretam as, já mencionadas, pequenas moléculas sequestradoras de Fe chamadas sideróforos (KURTH, C *et al.*, 2016) (SIMON C. ANDREWS *et al.*, 2003).

O termo sideróforo significa: Sideros, Fe e pheros, portador. (PARIJA, S.C *et al.*, 2012). São sintetizados e secretados por muitos microrganismos em resposta à falta de Fe, podendo ser classificada com base no tipo de ligantes aos quais o Fe se liga: catecolatos, hidroxamatos e α -hidroxicarboxilatos (GOMES, ANA *et al.*, 2024). Esses compostos solubilizam e ligam o Fe e o transportam para a célula microbiana, geralmente através de receptores de membrana específicos (KUMAR, A *et al.*, 2024). Cepas capazes de produzir com eficiência sideróforos são consideradas hipervirulentas, enquanto cepas incapazes de produzir ou secretar sideróforos têm virulência e aptidão diminuídas durante a infecção e colonização (KURTH, C *et al.*, 2016).

Klebsiella pneumoniae produz variavelmente quatro sideróforos: enterobactina, enterobactina glicosilada (também denominada salmochelina), aerobactina e yersiniabactina, que promovem a colonização em diferentes tecidos dos hospedeiros (KUMAR, A *et al.*, 2024). Em resposta a produção desses sideróforos, como enterobactina, as superfícies mucosas das células do hospedeiro secretam lipocalina 2 (Lcn2), que é uma proteína com alta afinidade para se ligar à enterobactina e interromper sua função de aquisição do Fe e promover inflamação aguda durante a colonização (BACHMAN MALENIO, S *et al.*, 2012.) (KURTH, C *et al.*, 2016).

Além de competir pelo Fe, estudos demonstram que sideróforos podem aumentar a patogenicidade por outros mecanismos. Um deles é a partir do ataque as principais células do sistema imunológico responsáveis pela resposta inflamatória e pelo combate a infecções microbianas, os neutrófilos. No estudo de Piu Saha e colaboradores, observou-se que a Enterobactina prejudicou as armadilhas extracelulares e a degranulação dos neutrófilos, além

de inibir a fagocitose e a atividade bactericida, sem afetar a migração e a quimiotaxia (SAHA, PIU *et al.*, 2017). Já no estudo de Wenyuan Wang *et al.*, pela primeira vez, se investigou os impactos dos Sideróforos de *K. pneumoniae* em plaquetas. O estudo foi realizado em plaquetas humanas e os resultados mostraram que os sideróforos induziram apoptose e mitofagia nesses tipos celulares. No entanto, o mecanismo através do qual os quelantes de Fe induzem apoptose, ainda não está claro até o momento (WANG, W *et al.*, 2020).

Embora a relação entre a fonte de carbono disponível para o patógeno e a produção de sideróforos não tenha sido elucidada, podemos entender que, para o metabolismo de carboidratos, o patógeno pode utilizar vias mais ou menos dependentes de íons Fe. Dessa forma, microrganismos com maior repertório de estratégias de captação de Fe teriam vantagem na utilização de vias que utilizam íons Fe como cofator de suas enzimas. Ainda, há um número crescente de estudos tem correlacionado transporte e o metabolismo de vários carboidratos e a virulência em enterobactérias (BOUGUÉNEC, C *et al.*, 2011).

1.4 FITNESS BACTERIANO E FONTES DE CARBONO

As bactérias são frequentemente expostas a grandes mudanças nas condições de crescimento e essa resposta à disponibilidade de fontes de carbono parece ser de especial importância para sobreviver a essas alterações, pois muitas bactérias dispõem de mais de um mecanismo para se adaptar às mudanças na composição de carboidratos. Esses mecanismos incluem a indução de um sistema específico de transporte e utilização de carboidratos pela presença da fonte correspondente de carbono e sua repressão quando um carboidrato mais eficientemente utilizável está presente, esse fenômeno é chamado de repressão por catabólico de carbono (CCR).

Em Enterobactérias, a regulação da virulência por açúcares é mediada pelo sistema fosfotransferase de carboidratos (PTS), que captura e fosforila açúcares. A disponibilidade de carboidratos afeta a virulência de patógenos humanos, utilizando mecanismos semelhantes aos da regulação do catabolismo. A presença de açúcares influencia a produção de toxinas, adesão celular e evasão do sistema imunológico (PONCET S *et al.*, 2009).

Além disso, não só a presença de açúcar e fontes de carbono parecem modular fatores de virulência, como também o tipo de açúcar pode ser um fator determinante para o estabelecimento da infecção. No caso de *Streptococcus pyogenes*, a presença de glicose,

sacarose ou trealose induz a produção da proteína M, essencial para a adesão aos tecidos do hospedeiro. Em *Listeria monocytogenes*, a expressão do gene *prfA*, que regula a virulência, é inibida por açúcares como glicose e frutose. Essa regulação envolve o PTS, onde a desfosforilação dos componentes inibe PrfA (PONCET S *et al.* 2009).

Portanto, a relação entre a disponibilidade de açúcares e a virulência bacteriana não é apenas uma questão de metabolismo energético, mas envolve mecanismos de regulação que afetam diretamente a expressão de genes críticos para a patogenicidade, mostrando como as bactérias adaptam sua virulência em resposta às condições do ambiente (PONCET S *et al.* 2009).

O estudo de Hudson, A e colaboradores em 2022 é um excelente exemplo de como diferentes fontes de carbono podem modular a virulência bacteriana, similarmente ao que foi observado em outros patógenos, como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*. No caso de *K. pneumoniae*, a pesquisa focou em entender como o metabolismo de fontes alternativas de carbono, como a fucose, impacta a sua virulência, especialmente no ambiente intestinal, onde essa fonte é abundante. Os resultados mostram que, embora *K. pneumoniae* possa metabolizar a fucose como sua única fonte de carbono, esse processo é menos eficiente em termos energéticos comparado à glicose, refletido pelo crescimento mais lento da bactéria sob condições aeróbicas. No entanto, em condições anaeróbicas, comuns no intestino, a fucose proporciona uma cinética de crescimento mais favorável do que o glicerol, sugerindo uma adaptação metabólica. Mais interessante ainda é o impacto da fucose nos fenótipos de virulência. O crescimento de *K. pneumoniae* na fucose aumentou significativamente a capacidade de autoagregação e formação de biofilme, ambos fatores cruciais para a virulência de muitas bactérias, incluindo *K. pneumoniae* (HUDSON, AW *et al.*, 2022).

Esses estudos corroboram achados anteriores que mostram como as fontes de carbono podem não apenas sustentar o crescimento bacteriano, mas também influenciar diretamente a expressão de determinantes de virulência (HUDSON, AW *et al.*, 2022).

JUSTIFICATIVA

De acordo com o apresentado, é possível identificar a necessidade crescente de combater bactérias patogênicas e suas cepas resistentes no contexto de saúde pública e para isso é preciso entender os fatores que beneficiam sua virulência. Nesse sentido, um estudo sobre o crescimento bacteriano e a expressão de sideróforos em diferentes fontes de carbono se torna

relevante, pois essas moléculas desempenham um papel crítico na captação de Fe e está presente nas cepas hiper virulentas do gênero *Klebsiella*, proporcionando sua maior sobrevivência.

Essa abordagem tem o potencial de trazer a luz novas estratégias para o manejo de paciente, como por exemplo na formulação de dietas para pacientes em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs). Nesse sentido, é importante relacionar as fontes de carboidratos fornecidas a pacientes críticos e como podem impactar a microbiota do organismo, favorecendo ou inibindo a virulência de patógenos oportunistas. Também, compreender essas interações é fundamental para o desenvolvimento de medicamentos inovadores que inibam a produção ou o funcionamento de sideróforos, oferecendo um complemento ao uso de antibióticos convencionais, cuja utilização está sendo cada vez mais impactada pela disseminação de mecanismos de resistência. Ainda no âmbito industrial farmacêutico, os resultados podem levar a um novo olhar sobre o uso de diluentes, fluidos irrigantes, soros, dentre outros insumos a base de carboidratos, como lactose monoidratada, sorbitol, glicose, considerando seu papel na expressão de mecanismos de virulência.

Portanto, ao investigar o crescimento bacteriano e a expressão de sideróforos em diferentes condições de fonte de carbono, este estudo busca contribuir para o enfrentamento de desafios cruciais na saúde pública, trazendo novas discussões sobre um aspecto pouco estudado durante a patogênese das infecções bacterianas e dessa forma contribuir para avanços tanto na prevenção quanto no tratamento de infecções bacterianas em diversos contextos, hospitalar e industrial.

OBJETIVOS

GERAL

Estudo experimental, exploratório, qualitativo e quantitativo usando isolados bacterianos de *Klebsiella pneumoniae* e *Klebsiella variicola* cedidas pelo Hospital Universitário de Brasília com o objetivo de avaliar a expressão de sideróforos utilizando como fonte única de carbono os diferentes açúcares presentes na dieta diária humana (glicose, galactose, lactose, manose, maltose e sorbitol). A perspectiva é que os resultados possibilitem entender mais profundamente sobre um dos principais fatores de virulência desse gênero bacteriano, a aquisição de Fe do meio, e modular futuros mecanismos de controle de sobrevivência de um dos patógenos mais críticos da atualidade na saúde pública.

ESPECÍFICOS

- **Avaliar a influência da fonte de carbono na expressão de sideróforos** por diferentes isolados, utilizando diferentes tipos de açúcares como substrato.
- Qualificar **a produção de sideróforos** em cada condição experimental por meio da reação com Cromo Azurol S.
- Quantificar **a produção de sideróforos** usando espectrofotômetro, onda de 630nm.
- Realizar **análises estatísticas** (ANOVA e Teste de Tukey) para identificar diferenças significativas na produção de sideróforos entre os isolados e diferentes fontes de carbono.
- Investigar **a relação entre a expressão de sideróforos e a virulência** dos isolados, considerando sua adaptação metabólica às diferentes condições.
- Propor **estudos direcionados** para evolução do trabalho com o objetivo de contribuir para futuras bases de dados que necessitem.

METODOLOGIA

Isolados bacterianos: Foram usados isolados bacterianos de *K. pneumoniae*, Kp 31 e Kp 34, obtidos de um paciente com bacteremia do Hospital Universitário de Brasília (HUB). A linhagem Kp 31 foi isolada de cultura de hemocultura e a Kp 34 foi isolada de cultura de swab retal. O isolado bacteriano M93 foi obtido a partir da mutagênese da linhagem Kp 34. Esse mutante foi identificado em trabalho anterior do laboratório, tendo inativado o gene da fucose isomerase. Já os isolados de *K. variicola*, denominadas Kv15, Kv35, Kv57, também foram cedidas pelo Hospital Universitário de Brasília, entre setembro de 2013 e dezembro de 2017, sendo isolados de urina, hemocultura e cateter, respectivamente. Após isolamento, estas cepas foram cultivadas por 18h em meio LB (Sigma) líquido a 37 °C e, em seguida, armazenada em freezer -80 °C em meio LB com glicerol (50%). 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 44867915.1.0000.5).

Os experimentos foram executados no Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas e no Laboratório de Análises Moleculares de Patógenos, ambos localizados no Departamento de Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília.

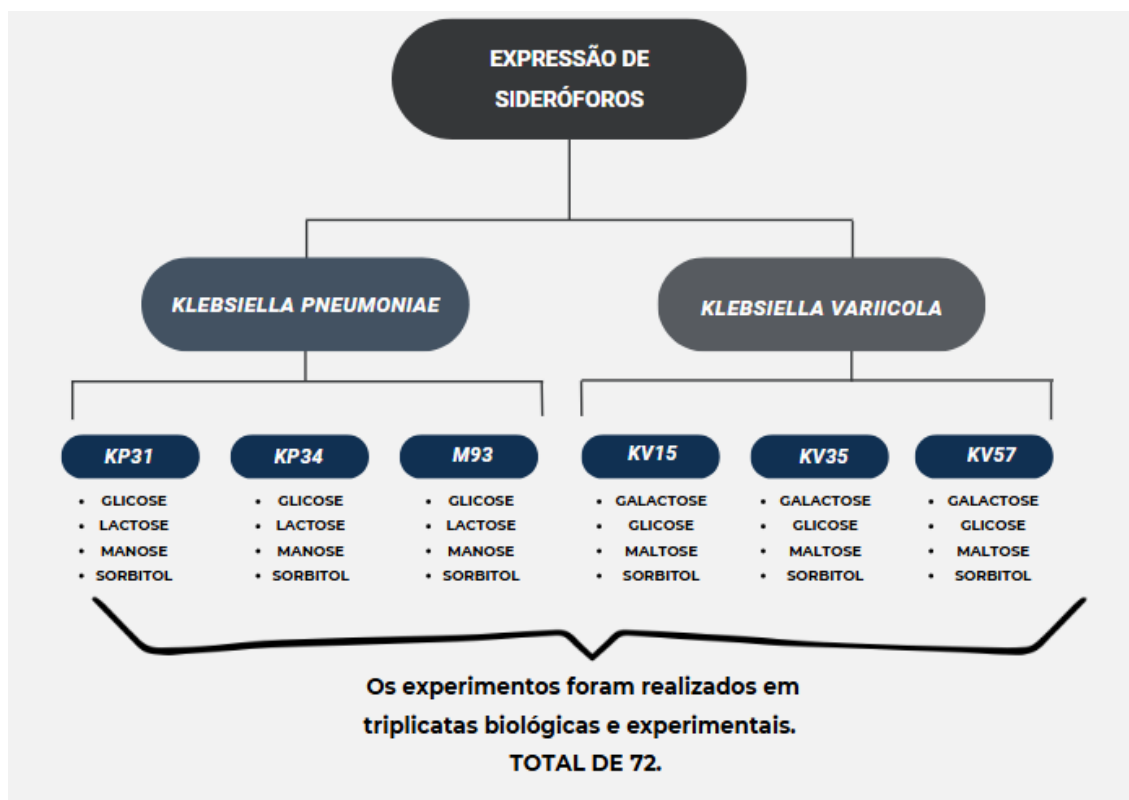


Figura 1: Esquema metodológico da qualificação e quantificação de expressão de sideróforos em ambas as espécies de *Klebsiella*.

Meios de cultura: Foram usados dois meios de cultura, Caldo Muller Hinton (Kasvi), um meio não seletivo e não diferencial usado para permitir o crescimento de uma ampla variedade de bactérias, composto por Peptona Ácida de Caseína (H) 17,50 g/L, Infusão de Carne 2,0, Amido de Milho 1,50 g/L.

O outro, foi meio de detecção de sideróforos estafilocócicos (SSD), pobre em fosfatos e citrato, responsável por criar um ambiente onde apenas microrganismos capazes de produzir sideróforos para captar Fe sobrevivem ou prosperam. Preparado contendo o seguinte: 2 mM de KH_2PO_4 , 7,9 mM de NaCl, 17,2 mM de NH_4Cl , 2% (vol/vol) de solução de Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8), 20 mM de glicose, 6 g de Casaminoácidos (Difco) por litro, 39 μM de triptofano, 32 μM de ácido nicotínico e 6 μM de tiamina-HCl. O pH final do meio foi ajustado para 8,2.

Cultivo dos isolados: Primeiramente, foi realizado um pré-inóculo, para recuperar os isolados, feito em um tubo de experimento estéril contendo 5 mL de meio Muller-Hinton acrescido de 100 μL do isolado mantida *overnight* à 37 °C sem agitação. No dia seguinte, o inóculo foi centrifugado a 10.000 rpm por 5 min, ressuspensão em meio de cultura SSD e centrifugado

novamente. Foi utilizado o meio SSD, considerado "mínimo" porque contém apenas os nutrientes essenciais para o crescimento bacteriano, sem aditivos complexos e sem adição de ferro para favorecer a produção de sideróforo, ou seja, em privação de Fe. Na hora do cultivo, temperatura e o tempo são cruciais para determinar um melhor crescimento, pois a produção tende a diminuir com o aumento da temperatura e as culturas devem ser mantidas até a fase estacionária, já que a produção máxima de sideróforos frequentemente ocorre no final da fase logarítmica e no início da fase estacionária. No caso, o cultivo dos inóculos foi realizado em SSD adicionado dos açúcares a serem testados (glicose, lactose, sorbitol, manose, maltose e galactose), na concentração de 2%, ajustados para DO 0,05 e mantidos à 37 °C sem agitação por 24h.

Deteção de sideróforos em sobrenadante de cultura: A metodologia escolhida para o presente estudo se baseia nas revisões de métodos de Neilands, no ensaio universal do cromo azurol S (CAS) que foi exemplificada por Payne SM (PAYNE, SM.,1994). A leitura espectrofotométrica foi realizada no equipamento CLARIOStar Plus Microplate Reader (BMG Labtech) em comprimento de onda de 630 nm.

O ensaio cromo azurol S (CAS) é o ensaio mais universal desenvolvido até agora para sideróforos e utiliza um complexo Fe-corante que muda de cor com a perda de Fe. Os sideróforos, que têm maior afinidade pelo Fe do que o corante, podem remover o Fe, resultando na mudança da cor do corante de azul para laranja, podendo ser incorporado em meio ágar ou em um ensaio líquido (SCHWYN B, NEILANDS JB, 1987).

Uma vez concluído o cultivo, os sideróforos são encontrados no sobrenadante da cultura, que foi obtido após centrifugação (a cultura foi centrifugada a 10000 rpm x 10 min), que remove células e detritos, e o sobrenadante, que contém os sideróforos, foi liofilizado. Para isso, o sobrenadante é congelado rapidamente e, em seguida, a pressão é reduzida, permitindo que a água sublime diretamente do estado sólido para vapor, resultando em um pó seco que contém os sideróforos.

Após a liofilização, o pó foi reconstituído com água Milli-Q e uma alíquota de 100 uL dessa solução foi transferida para placas de 96 poços e adicionado 1uL da solução CAS (cromo azurol S), composto por:

- 2mM solução estoque CAS: 0,121g CAS em 100mL de água;
- 1mM de solução estoque de Fe: 1mM FeCl₃. 6H₂O em 10mMHCl

- Tampão piperazina: Dissolver 0,0219g de HDTMA em 50mL de água

A preparação é realizada misturando 1,5_mL de solução estoque de Fe com 7,5 mL da solução estoque de CAS e depois adicionando ao HDTMA. Depois, adiciona-se a solução de piperazina e complete 100mL de água.

O CAS ensaio líquido é um corante que forma um complexo azul intenso com o Fe. Os isolados que converteram a cor azul do CAS para amarelo, dentro de 15 min, foram considerados positivos para a produção de sideróforos. Essa presença de sideróforos é constatada, pois resulta na formação de um complexo colorido, cuja intensidade está diretamente relacionada à quantidade de sideróforo presente. A absorbância da solução é então medida em um espectrofotômetro em comprimento de onda de 630 nm da solução com CAS e o sobrenadante concentrado. Os experimentos foram realizados em triplicatas biológicas e experimentais. O conteúdo de sideróforo é então calculado de acordo com a equação:

$$\% \text{ sideróforo em unidades} = \frac{Ar - Ae}{Ar} \times 100$$

Onde Ar é a absorbância de referência e Ae é a absorbância da amostra.

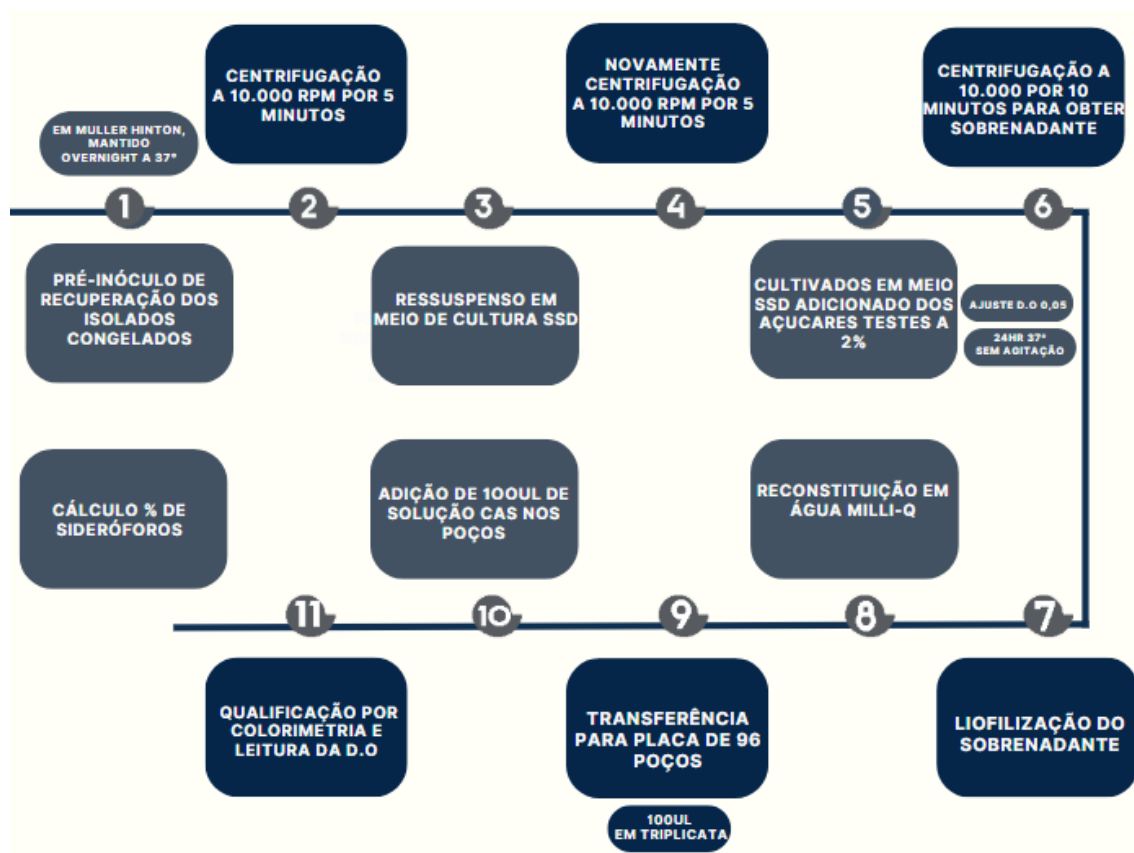


Figura 2: Fluxograma para exemplificação de modo de cultivo e análise das cepas inoculadas para qualificação e quantificação de expressão de sideróforos.

O diferencial nesse estudo foi a inoculação das cepas em diferentes fontes de carbono: glicose, lactose, manose e sorbitol para *K. pneumoniae* e galactose, glicose, maltose e sorbitol para *K. variicola*. Tinha-se como objetivo identificar se diferentes tipos de carboidrato influenciavam na virulência das bactérias, visto que são fontes de energia, e até mesmo, se afetam a expressão de sideróforos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Cada cepa foi cultivada inicialmente em meio mínimo SSD. Para a Kp31, Kp34 e M93 foram feitos 4 meios contendo fontes de carbono diferentes: lactose, glicose, manose e sorbitol. Já para as cepas Kv15, Kv35 e Kv57 foram feitos meios contendo: galactose, glicose, maltose e sorbitol. Ou seja, no total cada isolado foi cultivado em 4 meios diferentes. Após o cultivo, o sobrenadante obtido foi liofilizado e ressuspensão em um volume final de 1 mL de água. Como controle negativo, foi liofilizado o mesmo volume de meio de cultura.

O sobrenadante de cultura e o reagente CAS foram adicionados em placas de 96 poços, assim como o controle negativo, na proporção 1:1 (Figura 1 e 2).

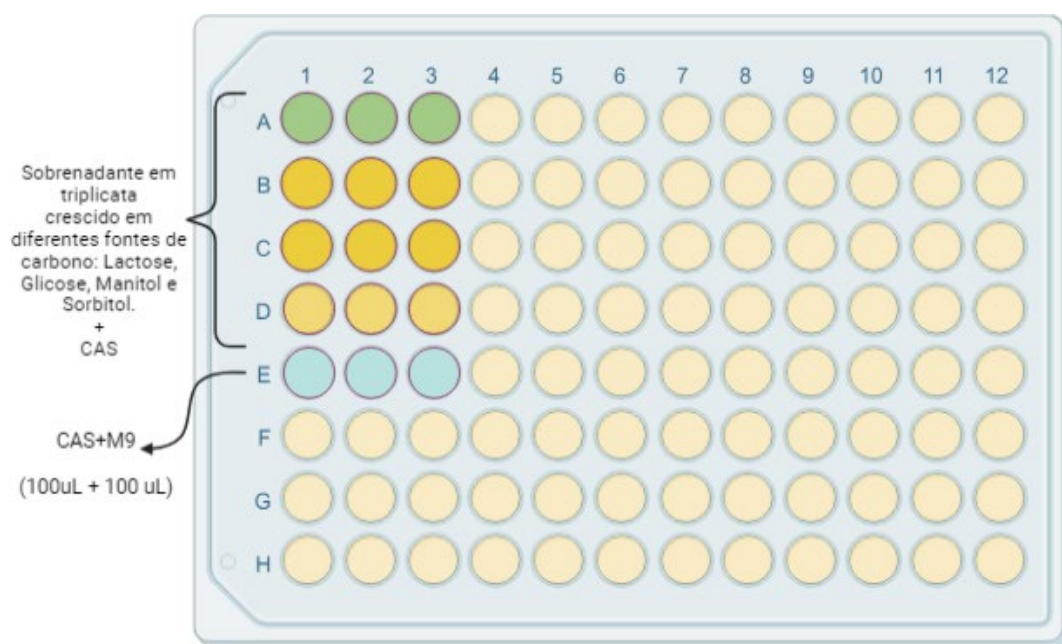


Figura 3. Modelo disposição das cepas escolhidas na placa de 96 poços. Quanto mais amarelo, maior a presença de sideróforos. A cor azul representa a *não* presença.

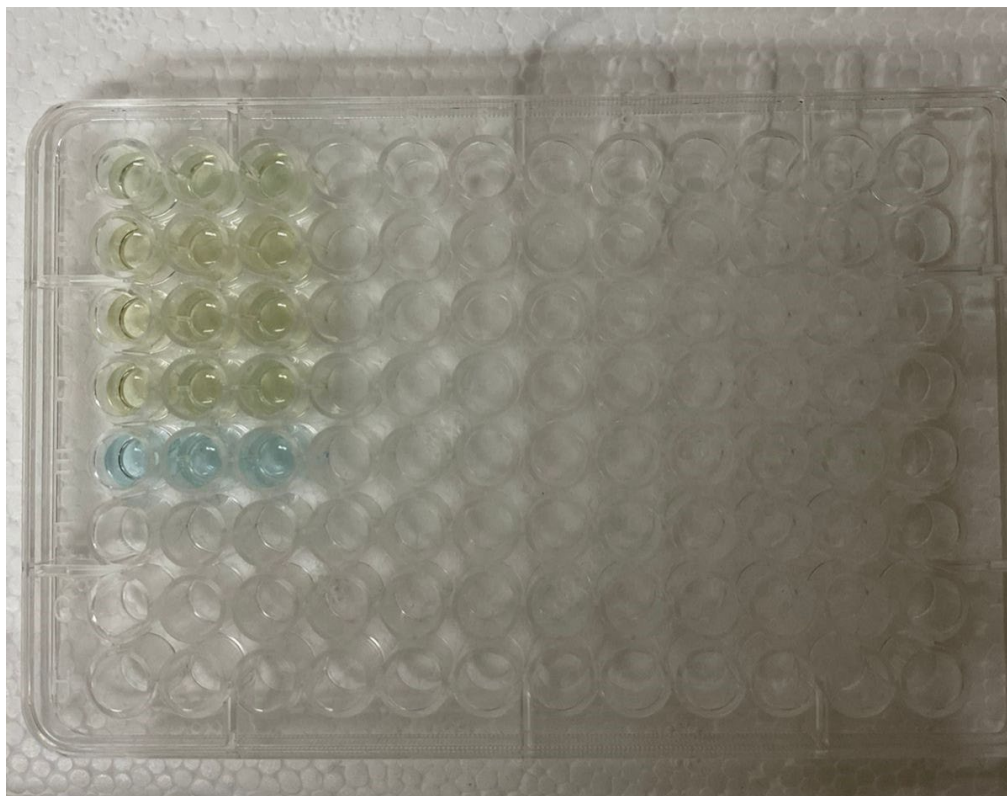


Figura 4. Primeira placa de 96 poços utilizada resultante de um crescimento correto em pH adequado.

Durante a padronização dos experimentos, foram testados diversos protocolos. O fator mais importante foi a escolha do tampão adequado. Foram testados três diferentes tampões: 1) piperazina; 2) PIPES e 3) SSD tamponado. Utilizando o tampão PIPES os resultados foram irregulares. O meio deveria ficar da cor azulada, mas ficou avermelhada (Figura 5), provavelmente por permitir acidificação do meio, causando protonação. Utilizando o meio SSD tamponado não conseguimos estabilizar a ligação dos íons Fe ao CAS, o que tornava a solução instável. Dessa forma, padronizamos as leituras utilizando piperazina em pH 6,8 (Figura 6).

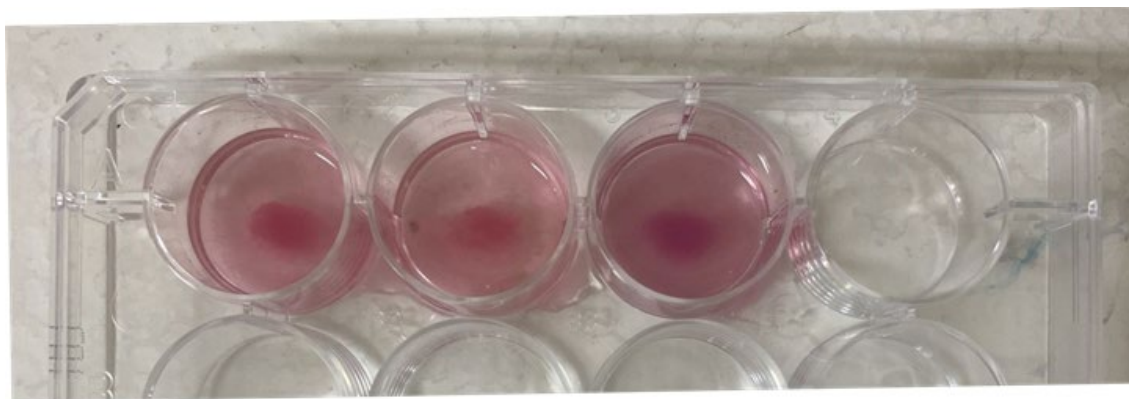


Figura 5. Teste de crescimento com tampão PIPES. Cor avermelhada é consequência da acidificação do meio.

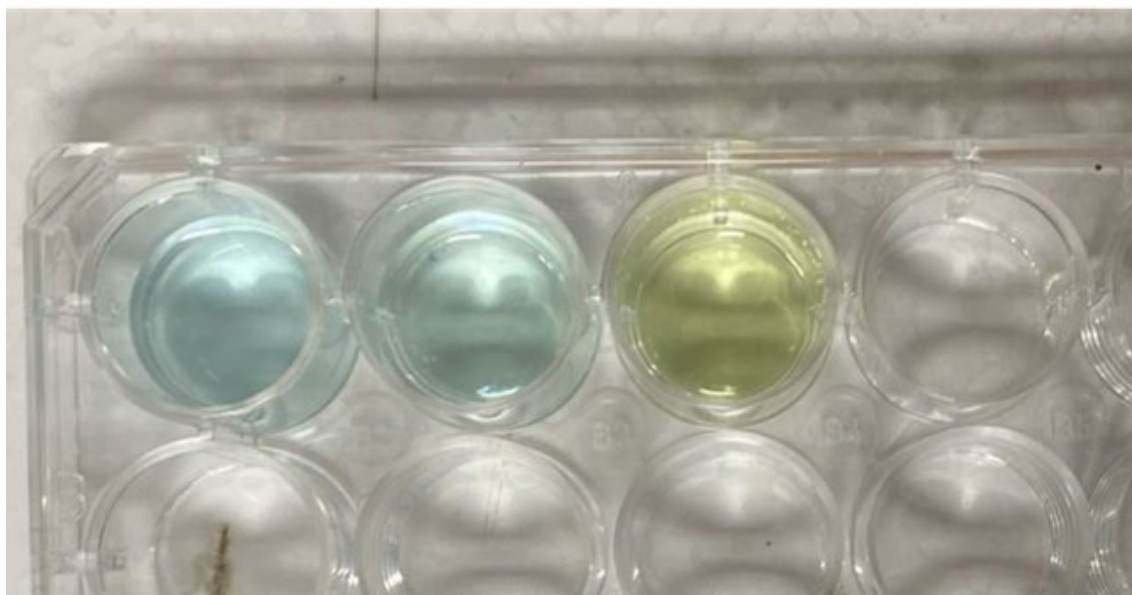


Figura 6. Crescimento com tampão Piperazina. Foi realizado o teste com controle negativo (apenas meio mínimo) e cepas de *Escherichia coli*.

Com a leitura espectrofotométrica foi possível calcular a porcentagem de sideróforos com base na alteração da absorbância, que está relacionada à presença de sideróforos que sequestram íons de Fe. Quanto maior a concentração de sideróforos na amostra, maior será a diferença entre a absorbância do controle (sem sideróforos) e a absorbância da amostra (com sideróforos). Essa diferença maior resulta em um valor mais alto para a porcentagem de sideróforos na equação. Portanto: Maior produção de sideróforos → Maior redução na absorbância da amostra → Maior porcentagem calculada.

Tabela 1. Leituras de absorbância do sobrenadante de cultura de *K. pneumoniae* utilizando diferentes fontes de carbono e percentual de produção de sideróforos calculadas.

	LAC* 1 (DO600)	LAC*2 (DO600)	LAC*3 (DO600)	MÉDIA	% produção de sideróforos

Kp34	0,202	0,021	0,21	0,211	71,43501805
Kp31	0,146	0,143	0,147	0,1453333333	80,32490975
M93	0,177	0,168	0,164	0,1696667	77,030686
	GLI **1	GLI ** 2	GLI ** 3	MÉDIA	% produção de sideróforos
Kp34	0,231	0,237	0,212	0,2266666667	69,31407942
Kp31	0,156	0,149	0,149	0,1513333333	79,51263538
M93	0,148	0,148	0,149	0,1483333	79,918773
	MAN*** 1	MAN*** 2	MAN*** 3	MÉDIA	% produção de sideróforos
Kp34	0,168	0,15	0,152	0,1566666667	78,79061372
Kp31	0,164	0,159	0,171	0,1646666667	77,70758123
M93	0,196	0,198	0,2	0,198	73,194946
	SOR****1	SOR **** 2	SOR **** 3	MÉDIA	% produção de sideróforos**
Kp34	0,187	0,182	0,185	0,1846666667	75
Kp31	0,174	0,174	0,182	0,1766666667	76,08303249
M93	0,172	0,177	0,173	0,174	76,444043
REF	0,701	0,747	0,768	0,7386666667	

*LAC- lactose; **GLI- glicose; ***MAN- manose; ****SOR- sorbitol; % de produção de sideróforos- obtido pela fórmula $Ar - Ae / Ar \times 100$.

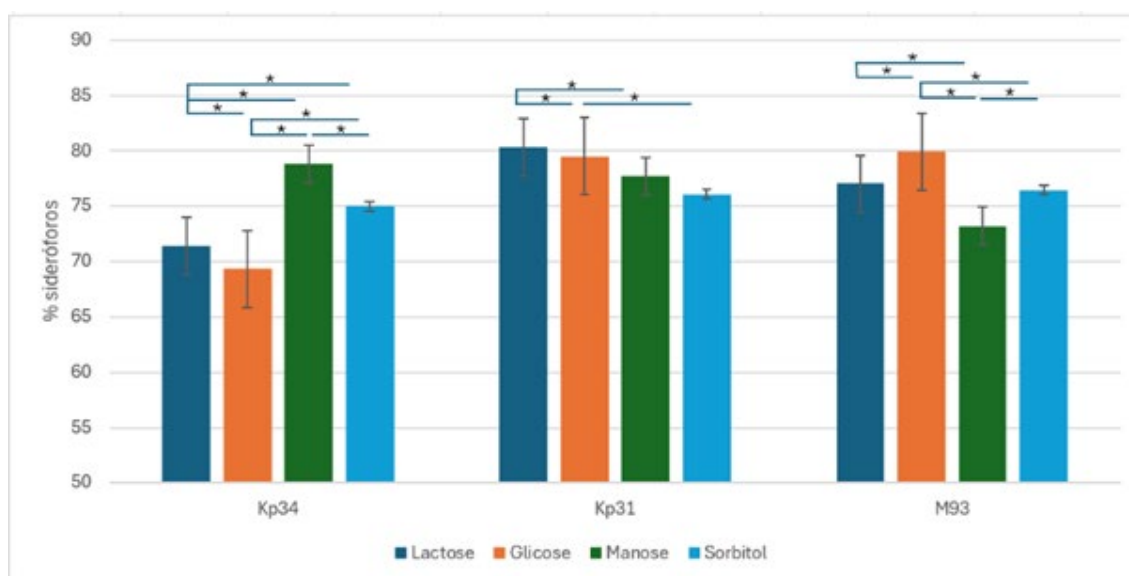


Figura 7. Produção de sideróforo em sobrenadante de cultura de *K. pneumoniae* utilizando diferentes fontes de carbono. * diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) entre os grupos indicados pela barra.

Tabela 2. Leituras de absorbância do sobrenadante de cultura de *K. variicola* utilizando diferentes fontes de carbono e percentual de produção de sideróforos calculadas.

	GAL* 1 (DO600)	GAL*2 (DO600)	GAL*3 (DO600)	MÉDIA	% produção de sideróforos
Kv35	0,169	0,173	0,168	0,17	79,98555957
Kv57	0,157	0,172	0,168	0,1645666666	77,57220217
Kv15	0,169	0,169	0,162	0,1646666666	77,70758123
	GLI **1	GLI ** 2	GLI ** 3	MÉDIA	% produção de sideróforos
Kv35	0,14	0,145	0,145	0,1433333333	80,59566787
Kv57	0,154	0,147	0,146	0,149	79,82851986
Kv15	0,157	0,155	0,153	0,155	79,01624549

	<i>MAL*** 1</i>	<i>MAL *** 2</i>	<i>MAL*** 3</i>	<i>MÉDIA</i>	% produção de sideróforos
<i>Kv35</i>	0,15	0,153	0,151	0,1513333333	79,51263538
<i>Kv57</i>	0,154	0,157	0,15	0,1536666666	79,1967509
<i>Kv15</i>	0,161	0,157	0,164	0,1606666666	78,24909747
	<i>SOR****1</i>	<i>SOR **** 2</i>	<i>SOR **** 3</i>	<i>MÉDIA</i>	% produção de sideróforos**
<i>KP35</i>	0,167	0,167	0,172	0,1686666666	77,16606498
<i>Kv57</i>	0,188	0,187	0,183	0,186	74,81949458
<i>Kv15</i>	0,158	0,16	0,154	0,1573333333	78,70036101
<i>REF</i>	<i>0,701</i>	<i>0,747</i>	<i>0,768</i>	<i>0,7386666667</i>	

*GAL- galactose; **GLI- glicose; ***MAL- maltose; ****SOR- sorbitol; % de produção de sideróforos- obtido pela fórmula $Ar-Ae/Ar \times 100$.

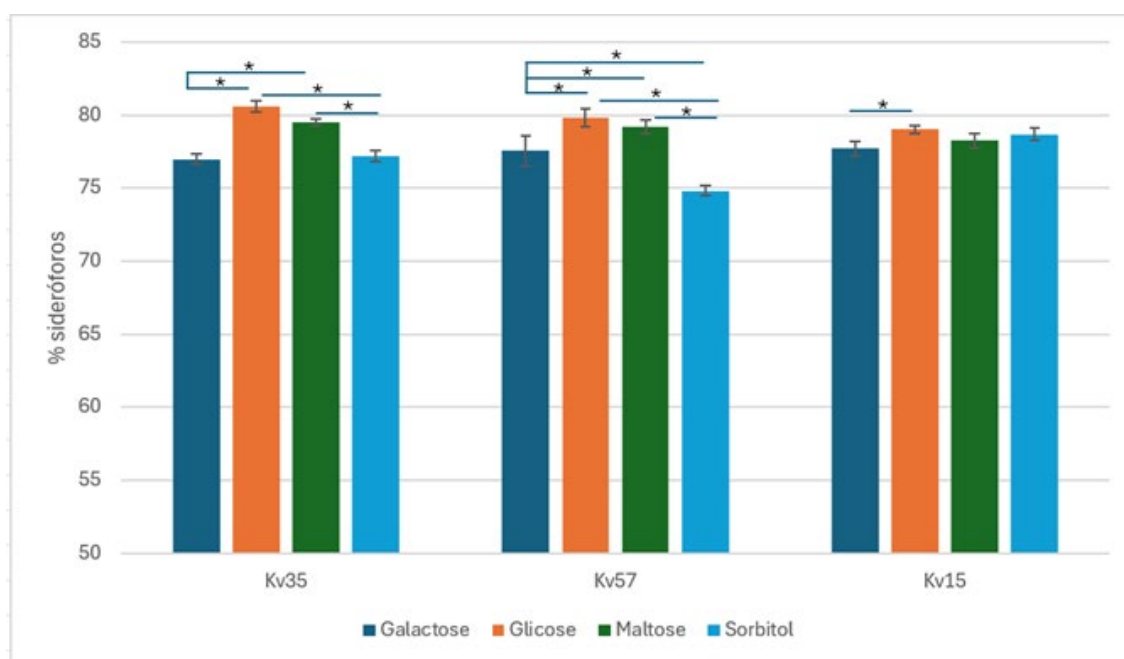


Figura 8. Produção de sideróforo em sobrenadante de cultura de *K. variicola* utilizando

diferentes fontes de carbono. * diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) entre os grupos indicados pela barra.

De acordo com as tabelas apresentadas é possível perceber que a cepa Kp31, possuiu uma maior expressão de sideróforos (Fig.7). O isolado Kp34 demonstrou um aumento significativo estatisticamente na produção de sideróforos na presença de manose, quando comparado ao cultivo na presença de lactose. Por outro lado, o cultivo na presença de glicose promoveu uma diminuição na expressão de sideróforos quando comparado à lactose. O isolado Kp31 demonstrou menor produção de sideróforos na presença de sorbitol como fonte de carbono quando comparado à lactose. A média de expressão foi em torno dos 70% de unidades de sideróforos, o que é um valor alto ligado a virulência bacteriana (Fig. 7).

Já em relação as cepas de *K. variicola*, de acordo com a tabela 2, identificamos que os dados estão mais aproximados e estáveis entre as replicatas e entre os açúcares. As cepas cultivadas em glicose como fonte de carbono tiveram uma maior expressão de sideróforos, diferentemente das cepas de *K. pneumoniae*, onde as cultivadas em lactose tiveram maior expressão (Figs. 7 e 8). Entre as cepas, a Kv35 houve maior porcentagem de expressão, com exceção do crescimento em sorbitol, onde a Kv15 é levemente maior (Fig. 8).

Para avaliação estatística foram usados o Teste ANOVA e o Teste de Tukey. O ANOVA é o teste realizado para uma análise de variância, percepção de diferença significativa entre três ou mais grupos. Nela se o resultado for significativo (valor de $p < \text{nível de significância}$, geralmente 0,05), rejeitamos a hipótese nula e concluímos que pelo menos um grupo é diferente dos outros. Já o teste de Tukey é realizado após o ANOVA, usado para identificar quais pares de grupos têm diferenças significativas nas médias. Por exemplo, se foi comparado 3 grupos (A, B e C) com ANOVA e encontrou diferenças significativas, o teste de Tukey pode mostrar que há diferença significativa ou sem diferença significativa.

Os resultados dos testes realizados para *K.p* e *K.v* foram:

Conjunto	Comparação	Valor 1	Valor 2	Diferença	Status
KP34	LACXGLI	0.211	0.2266666667	0.01566666667	OK
KP34	LACXMAN	0.211	0.1566666667	0.05433333333	OK
KP34	LACXSOR	0.211	0.1846666667	0.02633333333	OK
KP34	GLIXMAN	0.2266666667	0.1566666667	0.07	OK
KP34	GLIXSOR	0.2266666667	0.1846666667	0.042	OK
KP34	MANXSOR	0.1566666667	0.1846666667	0.028	OK
KP31	LACXGLI	0.1453333333	0.1513333333	0.006	NAO
KP31	LACXMAN	0.1453333333	0.1646666667	0.01933333333	OK
KP31	LACXSOR	0.1453333333	0.1766666667	0.03133333333	OK
KP31	GLIXMAN	0.1513333333	0.1646666667	0.01333333333	NAO
KP31	GLIXSOR	0.1513333333	0.1766666667	0.02533333333	OK
KP31	MANXSOR	0.1646666667	0.1766666667	0.012	NAO
M93	LACXGLI	0.1696666667	0.1483333333	0.02133333333	OK
M93	LACXMAN	0.1696666667	0.198	0.02833333333	OK
M93	LACXSOR	0.1696666667	0.174	0.004333333333	NAO
M93	GLIXMAN	0.1483333333	0.198	0.04966666667	OK
M93	GLIXSOR	0.1483333333	0.174	0.02566666667	OK
M93	MANXSOR	0.198	0.174	0.024	OK

Figura 9. Teste de Tukey *Klebsiella pneumoniae*. ‘Ok’ representa que há diferença significativa e ‘não’ que *não* há diferença significativa.

Conjunto	Comparação	Valor 1	Valor 2	Diferença	Status
Kv35	GALxGLI	76.98555957	80.59566787	3.610108303	OK
Kv35	GALxMAL	76.98555957	79.51263538	2.527075812	OK
Kv35	GALXSOR	76.98555957	77.16606498	0.1805054152	OK
Kv35	GLIXMAL	80.59566787	79.51263538	1.083032491	NAO
Kv35	GLIXSOR	80.59566787	77.16606498	3.429602888	OK
Kv35	MALXSOR	79.51263538	77.16606498	2.346570397	OK
KV57	GALxGLI	77.57220217	79.82851986	2.25631769	OK
KV57	GALxMAL	77.57220217	79.1967509	1.624548736	NAO
KV57	GALXSOR	77.57220217	74.81949458	2.752707581	OK
KV57	GLIXMAL	79.82851986	79.1967509	0.6317689531	NAO
KV57	GLIXSOR	79.82851986	74.81949458	5.009025271	OK
KV57	MALXSOR	79.1967509	74.81949458	4.377256318	OK
KV15	GALxGLI	77.70758123	79.01624549	1.30866426	NAO
KV15	GALxMAL	77.70758123	78.24909747	0.5415162455	NAO
KV15	GALXSOR	77.70758123	78.70036101	0.9927797834	NAO
KV15	GLIXMAL	79.01624549	78.24909747	0.7671480144	NAO
KV15	GLIXSOR	79.01624549	78.70036101	0.3158844765	NAO
KV15	MALXSOR	78.24909747	78.70036101	0.4512635379	NAO

Figura 9. Teste de Tukey *Klebsiella variicola*. ‘Ok’ representa que há diferença significativa e ‘não’ que *não* há diferença significativa.

Lactose, glicose, galactose, manose, maltose e sorbitol foram escolhidos, pois são açúcares altamente presentes na dieta humana, logo as bactérias têm uma maior probabilidade de as usarem como meio de energia. Em caso de comprovação de influência dos açúcares, dietas para pacientes poderiam ser baseadas em açúcares que não aumentam a expressão desse fator de virulência.

CONCLUSÃO

Este estudo tinha como intenção investigar se o crescimento de bactérias em diferentes fontes de carbono afetaria a expressão dos sideróforos de duas espécies de *Klebsiella* (*K.*

pneumoniae e *K. variicola*), afetando, assim, o potencial de virulência das bactérias usadas no estudo.

Os resultados deste estudo demonstram que a fonte de carbono influencia diretamente a expressão de sideróforos nos isolados analisados, como evidenciado pela quantificação divergente observada entre diferentes açúcares. A análise estatística, por meio de ANOVA e Teste de Tukey, confirmou diferenças significativas na produção de sideróforos entre os grupos testados, reforçando a importância do metabolismo de carbono na regulação desse fator de virulência, embora mecanismos específicos ainda precisem ser melhor elucidados. Para isso, técnicas complementares, como proteômica e sequenciamento de genes, são necessárias para uma compreensão mais profunda dos reguladores envolvidos nesse processo.

Existem várias maneiras de continuar este projeto e complementar os resultados obtidos: análise da expressão do gene de sideróforo utilizando RT-qPCR ou RNA-Seq para quantificar a expressão desse gene; Realização de ensaios de virulência em modelos animais, permitindo avaliar se as bactérias cultivadas em diferentes condições de carbono realmente apresentam um comportamento mais virulento em organismos vivo; Um estudo de análise proteômica poderia identificar e quantificar as proteínas envolvidas na produção de sideróforos, fornecendo uma visão mais profunda dos mecanismos moleculares que unem a resposta da bactéria às várias fontes de carbono.

As diferentes leituras que encontramos na espectrofotometria, além de explicar divergência nas expressões de sideróforos, podem ser ter sido causadas por vários problemas técnicos, como probabilidade de erros na preparação do meio, variação na produção de bactérias em cultura, variação na concentração dos meios de carbono e eventual falha na calibragem do espectrofotômetro. Tais eventos, provavelmente podem ter afetado as leituras de D.O. e, posteriormente, a interpretação das variações no crescimento dos microrganismos escolhidos.

Estudos futuros, com controle mais rigoroso dessas variáveis experimentais serão necessários para confirmar qualquer relação entre as fontes de carbono e a expressão de sideróforos e para compreender o impacto real disso na virulência bacteriana.

REFERÊNCIAS

1. Podschun R, Ullmann U. **Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors.** Clin Microbiol Rev. 1998 Oct;11(4):589-603. doi: 10.1128/CMR.11.4.589. PMID: 9767057; PMCID: PMC88898.
2. TEIXEIRA, D.A. **Microbiologia Básica.** Teófilo Otoni, 2020
3. Ndlovu T, Kgosietsile L, Motshwarakgole P, Ndlovu SI. **Evaluation of Potential Factors Influencing the Dissemination of Multidrug-Resistant Klebsiella pneumoniae and Alternative Treatment Strategies.** Trop Med Infect Dis. 2023 Jul 26;8(8):381. doi: 10.3390/tropicalmed8080381. PMID: 37624319; PMCID: PMC10459473.
4. Martin RM, Bachman MA. **Colonization, Infection, and the Accessory Genome of Klebsiella pneumoniae.** Front Cell Infect Microbiol. 2018 Jan 22;8:4. doi: 10.3389/fcimb.2018.00004. PMID: 29404282; PMCID: PMC5786545.
5. Sanikhani R, Moeinirad M, Shahcheraghi F, Lari A, Fereshteh S, Sepehr A, Salimi A, Badmasti F. **Molecular epidemiology of hypervirulent Klebsiella pneumoniae: a systematic review and meta-analysis.** Iran J Microbiol. 2021 Jun;13(3):257-265. doi: 10.18502/ijm.v13i3.6384. PMID: 34540163; PMCID: PMC8416590.
6. OMS, **Bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance (2024).** WHO Bacterial Priority Pathogens List, 2024.
7. Wyres KL, Lam MMC, Holt KE. **Population genomics of Klebsiella pneumoniae.** Nat Rev Microbiol. 2020 Jun;18(6):344-359. doi: 10.1038/s41579-019-0315-1. Epub 2020 Feb 13. PMID: 32055025.
8. Kariyawasam RM, Julien DA, Jelinski DC, Larose SL, Rennert-May E, Conly JM, Dingle TC, Chen JZ, Tyrrell GJ, Ronksley PE, Barkema HW. **Antimicrobial resistance (AMR) in COVID-19 patients: a systematic review and meta-analysis** (November 2019-June 2021). Antimicrob Resist Infect Control. 2022 Mar 7;11(1):45. doi: 10.1186/s13756-022-01085-z. PMID: 35255988; PMCID: PMC8899460.
9. Rodríguez-Medina N, Barrios-Camacho H, Duran-Bedolla J, Garza-Ramos U. **Klebsiella variicola: an emerging pathogen in humans.** Emerg Microbes Infect.

- 2019;8(1):973-988. doi: 10.1080/22221751.2019.1634981. PMID: 31259664; PMCID: PMC6609320.
10. Rosenblueth M, Martínez L, Silva J, Martínez-Romero E. **Klebsiella variicola, a novel species with clinical and plant-associated isolates.** Syst Appl Microbiol. 2004 Feb;27(1):27-35. doi: 10.1078/0723-2020-00261. PMID: 15053318.7
 11. Rodrigues C, Passet V, Rakotondrasoa A, Diallo TA, Criscuolo A, Brisse S. **Description of Klebsiella africanensis sp. nov., Klebsiella variicola subsp. tropicalensis subsp. nov. and Klebsiella variicola subsp. variicola subsp. nov.** Res Microbiol. 2019 Apr-May;170(3):165-170. doi: 10.1016/j.resmic.2019.02.003. Epub 2019 Feb 25. Erratum in: Res Microbiol. 2019 Sep - Oct;170(6-7):300. doi: 10.1016/j.resmic.2019.09.001. PMID: 30817987.
 12. Akine D, Sasahara T, Watanabe S, Ishishita Y, Yamaguchi T, Cui L, Morisawa Y. **Post-surgical meningitis caused by Klebsiella variicola.** IDCases. 2019 Aug 16;18:e00622. doi: 10.1016/j.idcr.2019.e00622. PMID: 31516827; PMCID: PMC6727102.
 13. Garza-Ramos U, Martínez-Romero E, Silva-Sánchez J. **SHV-type extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) are encoded in related plasmids from enterobacteria clinical isolates from Mexico.** Salud Publica Mex. 2007 Nov-Dec;49(6):415-21. doi: 10.1590/s0036-36342007000600008. PMID: 18176701.
 14. Brisse S, Grimont F, Grimont PAD. O gênero Klebsiella. Em Dworkin M , Falkow S , Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E. **Os procariontes: Volume 6: Proteobactérias:** Subclasse gama Nova York, NY: Springer New York; 2006 pp 159–196
 15. Duran-Bedolla J, Garza-Ramos U, Rodríguez-Medina N, Aguilar Vera A, Barrios-Camacho H. **Exploring the environmental traits and applications of Klebsiella variicola.** Braz J Microbiol. 2021 Dec;52(4):2233-2245. doi: 10.1007/s42770-021-00630-z. Epub 2021 Oct 9. PMID: 34626346; PMCID: PMC8578232.
 16. Farzana R, Jones LS, Rahman MA, Andrey DO, Sands K, Portal E, Watkins WJ, Pervin M, Banerjee M, Walsh TR. **Outbreak of Hypervirulent Multidrug-resistant Klebsiella variicola Causing High Mortality in Neonates in Bangladesh.** Clin Infect Dis. 2019 Mar 19;68(7):1225-1227. doi: 10.1093/cid/ciy778. PMID: 30204843.

17. Potter RF, Lainhart W, Twentyman J, Wallace MA, Wang B, Burnham CA, Rosen DA, Dantas G. **Population Structure, Antibiotic Resistance, and Uropathogenicity of *Klebsiella variicola***. *mBio*. 2018 Dec 18;9(6):e02481-18. doi: 10.1128/mBio.02481-18. PMID: 30563902; PMCID: PMC6299229.
18. PARIJA, S.C. **Textbook of Microbiology and Immunology**, 2^o edition. 2012 Elsevier.
19. Kurth C, Kage H, Nett M. **Siderophores as molecular tools in medical and environmental applications**. *Org Biomol Chem*. 2016 Sep 21;14(35):8212-27. doi: 10.1039/c6ob01400c. Epub 2016 Aug 5. PMID: 27492756.
20. Andrews SC, Robinson AK, Rodríguez-Quñones F. **Bacterial iron homeostasis**. *FEMS Microbiol Rev*. 2003 Jun;27(2-3):215-37. doi: 10.1016/S0168-6445(03)00055-X. PMID: 12829269.
21. Maatallah M, Vading M, Kabir MH, Bakhrouf A, Kalin M, Naclér P, Brisse S, Giske CG. ***Klebsiella variicola* is a frequent cause of bloodstream infection in the stockholm area, and associated with higher mortality compared to *K. pneumoniae***. *PLoS One*. 2014 Nov 26;9(11):e113539. doi: 10.1371/journal.pone.0113539. PMID: 25426853; PMCID: PMC4245126.
22. de Campos TA, de Almeida FM, de Almeida APC, Nakamura-Silva R, Oliveira-Silva M, de Sousa IFA, Cerdeira L, Lincopan N, Pappas GJ Jr, Pitondo-Silva A. **Multidrug-Resistant (MDR) *Klebsiella variicola* Strains Isolated in a Brazilian Hospital Belong to New Clones**. *Front Microbiol*. 2021 Apr 16; 12:604031. doi: 10.3389/fmicb.2021.604031. PMID: 33935984; PMCID: PMC8085564
23. Schwyn B, Neilands JB. **Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores**. *Anal Biochem*. 1987 Jan;160(1):47-56. doi: 10.1016/0003-2697(87)90612-9. PMID: 2952030.
24. Gomes AFR, Sousa E, Resende DISP. **A Practical Toolkit for the Detection, Isolation, Quantification, and Characterization of Siderophores and Metallophores in Microorganisms**. *ACS Omega*. 2024 Jun 11;9(25):26863-26877. doi: 10.1021/acsomega.4c03042. PMID: 38947835; PMCID: PMC11209696.
25. Kumar A, Chakravorty S, Yang T, Russo TA, Newton SM, Klebba PE. **Siderophore-mediated iron acquisition by *Klebsiella pneumoniae***. *J Bacteriol*. 2024 May

- 23;206(5):e0002424. doi: 10.1128/jb.00024-24. Epub 2024 Apr 9. PMID: 38591913; PMCID: PMC11112993.
26. Bachman MA, Lenio S, Schmidt L, Oyler JE, Weiser JN. **Interaction of lipocalin 2, transferrin, and siderophores determines the replicative niche of *Klebsiella pneumoniae* during pneumonia.** *mBio*. 2012 Nov 20;3(6):e00224-11. doi: 10.1128/mBio.00224-11. PMID: 23169997; PMCID: PMC3509427.
 27. Saha P, Yeoh BS, Olvera RA, Xiao X, Singh V, Awasthi D, Subramanian BC, Chen Q, Dikshit M, Wang Y, Parent CA, Vijay-Kumar M. **Bacterial Siderophores Hijack Neutrophil Functions.** *J Immunol*. 2017 Jun 1;198(11):4293-4303. doi: 10.4049/jimmunol.1700261. Epub 2017 Apr 21. PMID: 28432145; PMCID: PMC5470626.
 28. Wang W, Lu Y, Wang Y, Zhang Y, Xia B, Cao J. **Siderophores induce mitophagy-dependent apoptosis in platelets.** *Ann Transl Med*. 2020 Jul;8(14):879. doi: 10.21037/atm-20-4861. PMID: 32793723; PMCID: PMC7396754.
 29. Le Bouguénec C, Schouler C. **Sugar metabolism, an additional virulence factor in enterobacteria.** *Int J Med Microbiol*. 2011 Jan;301(1):1-6. doi: 10.1016/j.ijmm.2010.04.021. Epub 2010 Aug 11. PMID: 20705507; PMCID: PMC7129668.
 30. Poncet S, Milohanic E, Mazé A, Abdallah JN, Aké F, Larribe M, Deghmane AE, Taha MK, Dozot M, De Bolle X, Letesson JJ, Deutscher J. **Correlations between carbon metabolism and virulence in bacteria.** *Contrib Microbiol*. 2009;16:88-102. doi: 10.1159/000219374. Epub 2009 Jun 2. PMID: 19494580.
 31. Hudson AW, Barnes AJ, Bray AS, Ornelles DA, Zafar MA. ***Klebsiella pneumoniae* l-Fucose Metabolism Promotes Gastrointestinal Colonization and Modulates Its Virulence Determinants.** *Infect Immun*. 2022 Oct 20;90(10):e0020622. doi: 10.1128/iai.00206-22. Epub 2022 Sep 21. PMID: 36129299; PMCID: PMC9584338
 32. Payne SM. **Detection, isolation, and characterization of siderophores.** *Methods Enzymol*. 1994;235:329-44. doi: 10.1016/0076-6879(94)35151-1. PMID: 8057905