



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

Dissertação de mestrado

Caracterização microbiológica e avaliação do papel do PPAR γ na colonização e sobrevivência de isolados hipermucoides de *Klebsiella pneumoniae* em células epiteliais da linhagem HEp-2

Candidata: Laura Fernandes Gonçalves

Orientadora: Profa. Dra. Kelly Grace Magalhães

Brasília, Março de 2018

Laura Fernandes Gonçalves

Caracterização microbiológica e avaliação do papel do PPAR γ na colonização e sobrevivência de isolados hipermucoides de *Klebsiella pneumoniae* em células epiteliais da linhagem HEP-2

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre pelo programa de Pós-graduação em Biologia Molecular do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília.

Orientadora: Dra. Kelly Grace Magalhães

Brasília - DF

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Caracterização e avaliação do papel do PPAR γ na colonização e sobrevivência de isolados hipermucoides de *Klebsiella pneumoniae* em células epiteliais da linhagem HEp-2

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre pelo programa de Pós-graduação em Biologia Molecular do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília.

Laura Fernandes Gonçalves

Dissertação aprovada em:

Comissão examinadora:

1º Membro (Presidente):

Prof. Dra. Kelly Grace Magalhães (UnB)

2º Membro:

Prof.a Dra. Lívia Pimentel de Sant'Ana Dourado (UNIEURO)

3º Membro:

Prof. Dra. Izabela Marques Bastos Dourado Charneau (UnB)

4º Membro (Suplente):

Prof. Dra. Tatiana Amabile de Campos (UnB)

Dedicatória

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.

Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.” Madre Teresa de Calcutá

Dedico aos meus pais Cássia e Walter, aos meus irmãos Vinícius e Guilherme e a minha irmã Júlia. Pelo amor e apoio sem o qual nada do que sou ou do que faço seriam possíveis. Aos amigos e todos que me incentivam e caminham comigo nessa jornada.

Agradecimentos

A Deus, por sua infinita bondade e generosidade comigo em todos os momentos, pelas Graças concedidas, por me conduzir e me amparar diante de todas as dificuldades e permitir que eu chegasse até este momento. Por que nada é por acaso, é sempre obra Tua.

Aos meus pais Walter e Cássia, pelo apoio e amor incondicionais e por serem os melhores pais que eu poderia ter. Por estarem sempre ao meu lado me apoiando em todas as minhas decisões e por desde sempre me incentivarem nos estudos. Essa conquista eu dedico a vocês que nunca medem esforços por mim, pelos sacrifícios que fizeram e fazem para que eu tivesse todas as ferramentas para chegar até aqui. Eu não conseguiria sem vocês. Sem a certeza de que estão ao meu lado para me apoiar, nada disso seria possível. Obrigada por tudo. Aos meus irmãos Vinícius e Guilherme e a minha irmã Júlia, por serem minha alegria e por fazerem parte da minha vida tornando essa jornada bem mais fácil por saber que tenho vocês comigo. A minha tia Luda, pelo amor e por me acompanhar desde sempre torcendo pelo meu sucesso.

A minha orientadora Tatiana, por ter me recebido tão gentilmente no laboratório. Por ter me ensinado tanto durante esses quatro anos e cinco meses. Aprendi lições importantes como profissional e como pessoa e levarei todas elas por toda a minha vida. Muito obrigada por confiar em mim, por me apoiar, por dizer sempre as palavras certas que eu precisava ouvir para me encher de forças e seguir com entusiasmo nesse trabalho. Obrigada por sua positividade e por acreditar em mim em todos os momentos. Mais que uma orientadora, você foi uma pessoa incrível e maravilhosa que eu tive a oportunidade de trabalhar. Muito obrigada a minha orientadora Kelly, por todo o apoio e confiança para executar esse trabalho. Ao Prof. Vicente por todo o auxílio e suporte durante tanto tempo. Por ter me recebido no laboratório tão bem desde o primeiro dia.

Aos amigos do LAMP minha gratidão por absolutamente todos os momentos compartilhados dentro e fora do laboratório. Em especial ao Luís por todo o apoio e amizade e por me ensinar sobre as “cenouras”. A Leticia e Nayara pela parceria e risadas. A Rafa que me ajudou muito em diversos momentos de dificuldade sempre com palavras sábias e amigas. A Isa e a minha

melhor amiga de toda a vida e de todos os momentos Ana Paula, pela amizade, carinho, suporte, risadas, incentivo, amor, minha gratidão de todo o coração por ficarem ao meu lado e trilharem esse caminho comigo. Todos vocês foram muito importantes para que eu chegasse até aqui e levarei vocês e tudo o que eu aprendi com cada um por toda a minha vida.

Ao Dr. André Pitondo pela parceria e colaboração ao longo de todo esse trabalho. Aos alunos do LIMI por todo o suporte e em especial ao Gabriel Pasquarelli que me ajudou tão bondosamente em diversos momentos. Ao Agnelo por ter me ensinado praticamente tudo que sei sobre cultura de células e também pela amizade e carinho. Aos amigos de graduação por toda a força e entusiasmo sempre.

A todos os professores, alunos, técnicos, amigos de outros laboratórios e a todos que passaram por meu caminho e contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho e para o meu crescimento pessoal, muito obrigada.

As agências de fomento FAPDF, CNPq, FAHUB pelo auxílio financeiro bem como ao programa de pós graduação em Biologia Molecular pelo suporte para a execução desse projeto.

Resumo

Klebsiella pneumoniae é considerada um dos patógenos mais importantes causadores de infecções entre indivíduos imunocomprometidos. Os problemas clínicos causados pelo bacilo podem levar a graves complicações, incluindo infecções do trato urinário, septicemia, pneumonia e morte. Apesar de estarem primariamente associadas às infecções oportunistas, existem linhagens de *K. pneumoniae* hipervirulentas (hvKp) que possuem uma grande quantidade de fatores de virulência que atuam estrategicamente as capacitando de se multiplicar, proteger do sistema imune do hospedeiro e causar patogenias em hospedeiros sem imunocomprometimento. Os fatores de transcrição denominados receptores ativados por proliferadores de peroxissoma γ (PPAR- γ) tem sido amplamente estudados por seu papel na imunoregulação e estabelecimento de infecções bacterianas já que esses receptores são expressos por uma grande quantidade de células do sistema imune e apresentam um papel duplo promovendo a inibição de moléculas pró-inflamatórias e auxiliando no *clearence* bacteriano, mas também desencadeando apoptose em diversas células do sistema imune, diminuindo a migração e adesão de neutrófilos. Portanto, nesse trabalho, tivemos por objetivo avaliar o papel do PPAR- γ na capacidade de colonização de células epiteliais da linhagem HEp-2 por três isolados hipervirulentos de *K. pneumoniae* (HvKp) obtidos de um paciente com bacteremia no Hospital Universitário de Brasília. Caracterizamos os três isolados como geneticamente idênticos, multirresistentes, KPC e pertencentes ao clone ST11. Os isolados também apresentaram produção forte de biofilme em superfícies abióticas bem como a capacidade de sobreviver em sangue e em soro por 30 minutos. As células infectadas com os isolados hipermucoides apresentaram expressão de PPAR- γ 24 e 48 horas após a infecção. Os isolados mostraram-se capazes de sobreviver no interior de células Hep-2 3,6 e 24 horas após a infecção. Também apresentaram maior capacidade de sobrevivência nas células quando PPAR- γ estava presente do que quando este foi inibido por GW9662. Foi observado também que os isolados são citotóxicos para as células diminuindo a viabilidade celular nos tempos de 3 e 6 horas após a infecção e recuperação da viabilidade 24 horas após a infecção. Também, observou-se a produção de óxido nítrico após a infecção e constatou-se que esta ocorre mais acentuadamente 24 e 48 horas pós-infecção e que ocorre um aumento na produção de NO quando PPAR- γ encontra-se inibido. Dessa forma, os isolados mostraram-se resistentes aos efeitos microbicidas da célula.

Palavras-chave: *Klebsiella pneumoniae* hipervirulentas, PPAR- γ , sobrevivência em células epiteliais

Abstract

Klebsiella pneumoniae is considered one of the most important pathogens causing infections among immunocompromised individuals. Clinical problems caused by this bacillus can lead to severe complications, including urinary tract infections, septicemia, pneumonia, and death. Although they are primarily associated with opportunistic infections, there are hypervirulent *K. pneumoniae* (hvKp) strains that have a large number of virulence factors that act strategically to enable them to multiply, protect from the host's immune system and cause pathogenesis in hosts without immunocompromising. Transcription factors called peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR- γ) have been extensively studied for their role in immunoregulation and establishment of bacterial infections since these receptors are expressed by a large number of immune system cells and have a double role promoting the inhibition of proinflammatory molecules and assisting in bacterial clearance, but also triggering apoptosis in several cells of the immune system, decreasing neutrophil migration and adhesion. Therefore, the objective of this study was to evaluate the role of PPAR- γ in the ability to colonize epithelial cells of the Hep-2 lineage by three hypermuroid isolates of *K. pneumoniae* (HvKp) obtained from a patient with bacteremia at the Hospital Universitário de Brasília. In this work, we characterize the three isolates as genetically identical, multiresistant, KPC and belonging to clone ST11. The isolates also showed strong biofilm production on abiotic surfaces as well as the ability to survive in blood and serum for 30 minutes. Cells infected with the hypermuroid isolates showed PPAR- γ expression 24 and 48 hours post-infection. Isolates were able to survive within HEp-2 cells 3,6 and 24 hours post-infection. They also showed greater survival ability in the cells when PPAR- γ was present than when it was inhibited by GW9662. It was also observed that the isolates are cytotoxic to the cells reducing cell viability 3 and 6 hours post infection and viability recovery 24 hours post infection. The production of nitric oxide after infection has also been verified and it has been observed that this occurs more markedly 24 and 48 hours post infection and that an increase in NO production occurs when PPAR- γ is inhibited. Thus, the isolates were resistant to the microbicidal effects of the cell.

Key words: hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*, PPAR- γ , survival in epithelial cells

Lista de Figuras

Figura	Página
Figura 1. Epidemiologia da distribuição de hvKp (<i>Klebsiella pneumoniae</i> hipervirulentas) pelo mundo	20
Figura 2. Sideróforos descritos em <i>Klebsiella pneumoniae</i>	30
Figura 3. Cascata de sinalização via Myd88 e TRIF promovendo o influxo de neutrófilos e consequente clearance bacteriano	35
Figura 4. Papel da cápsula como fator de virulência em <i>Klebsiella pneumoniae</i>	38
Figura 5. Papel do LPS como fator de virulência em <i>Klebsiella pneumoniae</i>	40
Figura 6. Papel das fímbrias do tipo 1 e 3 como fator de virulência de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	41
Figura 7. Resumo esquemático dos mecanismos de defesa da célula hospedeira mediante os fatores de virulência de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	42
Figura 8. Ativação do PPAR- γ	43
Figura 9. Eletroforese em gel de agarose 0,7% para análise do perfil plasmidial das três linhagens bacterianas de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	62
Figura 10. Eletroforese em gel de agarose 1,5% mostrando o perfil de amplificação de sequências ERIC (Enterobacterial repetitive intergenic consensus) das linhagens de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	63
Figura 11. Unidades formadoras de colônias de <i>Klebsiella pneumoniae</i> recuperadas após a incubação dos isolados em sangue e em soro humanos nos tempos de 0, 30, 60 e 120 minutos.	64
Figura 12. Unidades formadoras de colônias observadas após a infecção de células epiteliais da linhagem HEp-2 por isolados de <i>Klebsiella pneumoniae</i> nos tempos de 3, 6 e 24 horas.	66
Figura 13. Dosagem de óxido nítrico (NO) 3, 6, 24 e 48 horas a partir do sobrenadante da cultura de células HEp-2 infectadas pelo isolados de <i>Klebsiella pneumoniae</i> em diferentes tempos	67
Figura 14. Atividade microbicida da célula pela geração de espécies reativas de oxigênio analisadas citometria de fluxo das células depois de 1, 3 e 6 horas da infecção com as linhagens de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	67
Figura 15. Viabilidade celular 3, 6 e 24 horas após a infecção com os isolados bacterianos de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	68
Figura 16. Western blotting para a proteína PPAR- γ 3, 6, 24 e 48 horas após a infecção de células HEp-2 com os isolados bacterianos de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	69
Figura 17. Unidades formadoras de colônias observadas após a infecção de células epiteliais da linhagem HEp-2 por isolados de <i>Klebsiella pneumoniae</i> nos tempos 24 horas utilizando o inibidor GW9662	71
Figura 18. Dosagem de óxido nítrico (NO) na presença do inibidor GW9662 24 horas após a infecção com os isolados bacterianos de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	72

- Figura 19.** Unidades formadoras de colônias observadas após a infecção de células epiteliais da linhagem HEp-2 transfectadas por isolados de *Klebsiella pneumoniae* no tempo de 24 horas **73**
- Figura 20.** Dosagem de óxido nítrico (NO) 24 horas após a infecção com os isolados bacterianos de *Klebsiella pneumoniae* em células HEp-2 transfectadas com o plasmídeo GS56450-1 pcDNA3.1(+)-seq1. **74**
- Figura 21.** Quantificação, por citometria de fluxo, da produção de corpúsculos lipídicos por células HEp-2 não transfectadas e células transfectadas com o plasmídeo com o inserto para a superexpressão de PPAR- γ **75**

Lista de Tabelas

Tabela	Página
Tabela 1. Características de cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> clássicas e hipervirulentas	19
Tabela 2. Identificação dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para as PCRs.	51
Tabela 3. Critério para a classificação da produção de biofilme conforme a média aritmética obtida da triplicata da absorbância obtida na leitura do teste	54
Tabela 4. Perfil de resistência e sensibilidade apresentado pelos 3 isolados bacterianos de <i>Klebsiella pneumoniae</i> para os antibióticos testados.	61
Tabela 5. Detecção de genes de resistência a antimicrobianos nas linhagens de <i>Klebsiella pneumoniae</i> por meio de PCR	61
Tabela 6. Alelos identificados por sequenciamento de multi-locus das linhagens de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	63

Abreviaturas

BLSEs: beta-lactamases de espectro estendido

CFU: Unidade Formadora de Colônia

cKp: *K. pneumoniae* clássica

cKp-MDR: *K.pneumoniae* clássicas multirresistentes

CO₂: Dióxido de carbono

CTX-M: beta lactamase do tipo cefotaximase

ERIC :Sequencias Consensus Repetitivas de Enterobactérias

HBDs: peptídeos antimicrobianos

HvKp: *K. pneumoniae* hipervirulentas

IFN- γ : Interferon- gama

IL: Interleucina

ITUs: infecções do trato urinário

KPCs: beta lactamase do tipo carbapenamase

LPS: Lipopolissacarídeo

MAPK: Proteína quinase ativada por mitógenos

MDR: multirresistentes

MLST: sequenciamento por multi-locus

MOI: Multiplicidade de infecção

MTT: (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

MyD88: Fator de diferenciação mielóide 88

NF-kB: Fator nuclear kB

NK: Células matadoras naturais

NO: Óxido nítrico

OMPs: proteínas de membrana externa

OXA: beta-lactamase do tipo oxacilinase

PBS: Salina tamponada com fosfato

PCR: reação da polimerase em cadeia

PPAR: Receptor ativado por proliferadores de peroxissomos

PPREs: elementos responsivos de PPAR

ROS: espécies reativas de oxigênio

RXR: receptor retinóide X

SHV: beta lactamase do tipo SHV

SST3: Sistema de secreção tipo III

ST: *sequence type*

TEM: beta lactamase do tipo TEM

TLR: Receptor do tipo toll

TNF- α : Fator de necrose tumoral – alfa

UTIs: unidades de terapia intensiva

Sumário

I. Introdução.	17
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	18
<i>Klebsiella pneumoniae</i> hipervirulentas.	20
<i>Klebsiella pneumoniae</i> e resistência a antimicrobianos.	22
Fatores de virulência.	25
Cápsula.	25
Lipopolissacarídeos – LPS.	26
Fímbrias do Tipo 1 e Tipo 3.	27
Sideróforos.	28
Bombas de efluxo.	31
Porinas.	31
Metabolismo de alantoína.	31
Transportadores.	32
OMPs (proteínas de membrana externa).	32
Biofilme.	33
Imunomodulação associada a infecções por HvKP.	34
Imunomodulação por cápsula de <i>K. pneumoniae</i>	35
Imunomodulação por LPS de <i>K. pneumoniae</i>	38
Imunomodulação por fímbrias do tipo 1 e 3 de <i>K. pneumoniae</i>	40
PPAR- γ	42
Corpúsculos lipídicos	46
Justificativa	46
II. Objetivos	48
Objetivo geral.	48
Objetivos específicos.	48

III. Material e métodos.	49
1. Desenho experimental.	49
2. Isolamento, cultivo e armazenamento das linhagens de <i>K. pneumoniae</i>	49
3. Antibiograma.	50
4. Detecção de genes de resistência.	50
5. Análise do perfil de similaridade genética por ERIC-PCR.	52
6. Análise clonal de sequenciamento por Multi-locus.	52
7. Perfil plasmidial.	53
8. Quantificação da produção de biofilme em superfície abiótica.	53
9. Sobrevivência em sangue e soro humanos.	54
10. Cultivo da linhagem celular HEp-2 (carcinoma epidermoide de laringe humana).	54
11. Infecção de células HEp-2 com os isolados de <i>K. pneumoniae</i>	55
12. Teste de viabilidade de células HEp-2 após infecção.	55
13. Determinação da sobrevivência bacteriana em células Hep-2.	56
14. Western blotting para detecção de PPAR γ	56
15. Sobrevivência de <i>K. pneumoniae</i> em células HEp-2 com super expressão de PPAR γ	57
16. Sobrevivência de <i>K. pneumoniae</i> em células HEp-2 com inibição de PPAR γ	57
17. Atividade microbicida da célula.	58
18. Quantificação de corpúsculos lipídicos.	59
19. Análise dos dados.	59

IV. Resultados.	60
1. Isolados bacterianos.	60
2. Perfil de resistência a antimicrobianos.	60
3. Perfil de similaridade genética.	62
4. Avaliação do potencial de produção de biofilme em superfície abiótica e da capacidade de sobrevivência em sangue total e soro humanos.	64
5. Capacidade de infecção e de sobrevivência dos isolados no interior de células epiteliais da linhagem HEp-2.	65
6. Perfil de expressão de PPAR- γ pelas células HEp-2 infectadas.	68
7. Papel do PPAR- γ na capacidade de sobrevivência intracelular dos isolados bacterianos.	69
7.1 Efeito da inibição de PPAR- γ em células HEp-2 na capacidades de sobrevivência intracelular dos isolados bacterianos.	70
7.2 Efeito da super-expressão de PPAR- γ em células HEp-2 na capacidade de sobrevivência intracelular dos isolados bacterianos. . .	72
8. Quantificação de corpúsculos lipídicos.	74
V. Discussão.	75
Caracterização microbiológica.	75
Sobrevivência em células epiteliais e citotoxicidade celular.	78
O papel do PPAR- γ na sobrevivência intracelular dos isolados HvKP.	80
PPAR- γ e biogênese de corpúsculos lipídicos.	81
Mecanismos microbicidas da célula.	84
VI. Conclusões.	86
VII. Referências bibliográficas.	87

I. Introdução

Klebsiella pneumoniae é considerada um dos patógenos mais importantes causadores de infecções entre indivíduos imunocomprometidos. Estima-se que *K. pneumoniae* encontra-se no grupo dos oito patógenos infecciosos mais importantes encontrados em hospitais. Os problemas clínicos causados pelo bacilo podem levar a graves complicações, incluindo infecções do trato urinário, septicemia, pneumonia e morte (Huang *et al.*, 2009).

A principal complicação associada às infecções oportunistas causadas por *K. pneumoniae* é a resistência e multirresistência à antimicrobianos. Devido à alta plasticidade de seu genoma, as linhagens bacterianas podem, inclusive, substituir a microbiota do hospedeiro por meio da aquisição de mecanismos de resistência. Sendo assim, a resistência é um fator chave para o desenvolvimento de infecções, podendo ser considerada um fator de virulência em ambientes específicos, os quais podem ser colonizados pelas bactérias resistentes aos antibióticos (Beceiro *et al.*, 2013).

Apesar de estarem primariamente associadas às infecções oportunistas, existem linhagens de *K. pneumoniae* multirresistentes que apresentam fatores de virulência que as capacitam causar patologias graves de notável morbidade e elevado potencial de mortalidade (Shon *et al.*, 2013). A associação da virulência à multirresistência torna a bactéria ainda mais perigosa devido à restrita opção para tratamento (Patel *et al.*, 2014). Linhagens de *K. pneumoniae* podem ainda apresentar hipervirulência, um fenótipo associada à produção de uma cápsula hipermucóide (Liu *et al.*, 1991) que as habilitam causar patologias em hospedeiros saudáveis, ou seja, sem imunocomprometimento.

Durante a infecção, a cápsula protege a bactéria do sistema imune do hospedeiro impedindo a fagocitose por células do sistema imune, a ativação da resposta imune e impossibilitando a lise pelo sistema complemento e a ação de peptídeos antimicrobianos, sendo dessa forma, um fator de virulência importante para o estabelecimento de uma patologia (Domenico *et al.*, 1994). Desta forma, estas bactérias apresentam capacidade metastática de disseminação no hospedeiro.

Para que *K. pneumoniae* cause uma infecção, é fundamental que o patógeno seja capaz de passar por uma série de mecanismos de defesas imunes humorais e celulares do hospedeiro (Zhang

et al., 2000) . Estudos *in vitro* e *in vivo* tentam elucidar como o sistema imune se comporta durante uma infecção e como este patógeno se evade e protege das defesas do hospedeiro. Contudo, esses mecanismos variam a depender da linhagem bacteriana e dos fatores de virulência expressos pela bactéria (Xiong *et al.*, 2015).

Indubitavelmente, numerosos fatores bacterianos adicionais, a serem ainda descritos, devem ser críticos à patogênese da infecção. Ainda não estão esclarecidas quais as características de *K. pneumoniae* hipervirulentas que as capacitam de disseminação metastática. Apesar da colonização de células epiteliais ser considerada um pré-requisito para a doença, a porta de entrada para a infecção e os mecanismos pelos quais ela ocorre ainda são desconhecidos. Além disto, a sobrevivência associada à imunoevasão no interior do hospedeiro é pobremente caracterizada na literatura, especialmente no âmbito da modulação do metabolismo lipídico do hospedeiro.

A família dos fatores de transcrição denominados receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs) tem sido estudado devido ao seu papel importante como chave na regulação da diferenciação de adipócitos e na homeostase do metabolismo de lipídeos e da glicose. Mais recentemente, seu papel na imunoregulação tem sido bastante estudado já que esses receptores são expressos por uma grande quantidade de células do sistema imune como monócitos, macrófagos, linfócitos B e T, células NK, células dendríticas, neutrófilos, eosinófilos entre outras (Almeida *et al.*, 2012) (Clark *et al.*, 2002).

Devido a sua atuação na imunorregulação e diferenciação celular, o PPAR- γ apresenta um papel importante no estabelecimento de infecções metastáticas. Assim, este estudo visa esclarecer o papel do PPAR- γ na colonização de células epiteliais por HvKP.

Klebsiella pneumoniae

Klebsiella é um gênero pertencente à família *Enterobacteriaceae* que compreende bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos, imóveis e produtores de cápsula mucóide. Esse gênero abriga quatro espécies: *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella terrigena*, *Klebsiella planticola* e *Klebsiella*

pneumoniae (Li *et al.*, 2004) sendo, a última, um patógeno oportunista capaz de causar problemas clínicos que podem levar a graves complicações, principalmente em indivíduos imunocomprometidos (Amraie *et al.*, 2014).

A maioria das infecções causadas por esse patógeno se dá em ambientes nosocomiais e são causados pela cepa clássica de *K. pneumoniae* (cKp). As principais síndromes causadas por esse patógeno são pneumonia, infecções do trato urinário (ITUs), infecções abdominais, infecções em dispositivos intra-vasculares, infecções em sítios cirúrgicos e bacteremia (Pomakova *et al.*, 2012).

Inicialmente, as cKp eram responsáveis por inúmeros casos de pneumonias adquiridas na comunidade, principalmente em pacientes alcólatras. Esse fenômeno ainda é muito observado em locais da África e da Ásia, mas nos outros continentes tornou-se algo incomum (Ko *et al.*, 2002).

A aquisição de multirresistência por cKp principalmente devido a aquisição de beta-lactamases de espectro estendido (BLSEs) e carbapenamases tem sido um dos motivos pelos quais esses patógenos se tornaram bem sucedidos em ambientes hospitalares. Cepas multirresistentes (cKp-MDR) tem causado uma grande quantidade de surtos hospitalares em unidades de terapia intensiva (UTIs) e maternidades (Moellering *et al.*, 2010) (Pomakova *et al.*, 2012).

Contudo, uma nova variante de *K. pneumoniae* tem surgido nas últimas décadas, uma variante hipervirulenta (hvKp) diferente em alguns aspectos da cKp (Tabela 1).

Tabela 1. Características de cepas de *Klebsiella pneumoniae* clássicas e hipervirulentas. Fonte: Adaptado de Paczosa *et al* (2016).

Parâmetros	Características por tipo de cepa	
	Clássica	Hipervirulenta
Tipos de infecção mais comuns	Pneumonia, ITU, bacteremia	Abcesso no fígado, pulmão, pescoço e rim, bacteremia, pneumonia, celulite, miosite, meningite, endoftalmias
População suscetível	Imunocomprometidos	Diabéticos, pessoas saudáveis
Tipos de cápsula	Cápsula sorotipos K1-K78	Hipercápsula sorotipo K1 e K2
Concentração geográfica	Todo o mundo	Principalmente Taiwan e sudeste da Ásia
Tipo de infecção	Hospitalar	Adquirida na comunidade
Resistência antimicrobiana	Frequente	Não frequente

Figura 1. Epidemiologia da distribuição de hvKp pelo mundo. Disseminação endêmica são as regiões em que existem casos de múltiplos surtos de hvKp. Disseminação esporádica trata-se de locais em que casos foram relatados, mas que não houveram surtos. Nos outros locais houve registros raros de casos e outros locais não apresentaram nenhum registro de hvKp. Fonte: Adaptado de Lee *et al* (2017).

O fenótipo de hipermucoviscosidade além de aumentar a produção desse muco polissacarídico também aumenta a produção de biofilme e aumenta a resistência à atividade bactericida promovida pelo soro quando comparadas as linhagens clássicas de *K. pneumoniae* (Shan *et al.*, 2017). O fenótipo pode ser identificado pelo “string test”. Este teste é positivo quando uma “string” maior que 5mm é formada quando uma alça de inoculação toca uma colônia de *K. pneumoniae* cultivada em ágar sangue (Fang *et al.*, 2004). Além desse teste, existem outras características apresentadas por essas variantes que diferem das linhagens clássicas, como a habilidade de causar graves patologias em pacientes ambulatoriais mas também em indivíduos saudáveis e capacidade de causar infecções em sítios não usuais, como meninges e olhos causando patologias como meningites e oftalmias, o que indica a capacidade metastática dessa variante. Essas características reunidas permitem diferenciar uma variante hvKp de uma *K. pneumoniae* clássica.

Para que sejam capazes de causar patologias em indivíduos imunocompetentes, linhagens hvKp possuem uma grande quantidade de fatores de virulência que atuam estrategicamente as capacitando de se multiplicar e se proteger do sistema imune do hospedeiro. Dentre esses fatores estão produção de cápsula, lipopolissacarídeos, sideróforos e fímbrias. Vários outros fatores de virulência foram descobertos recentemente, contudo, seus papéis na patogênese da infecção ainda não se encontram completamente elucidados. Entre esses fatores temos OMPs (proteínas de membrana externa), porinas, bombas de efluxo, sistemas de transporte de ferro e genes envolvidos no metabolismo de alantoina (Paczosa *et al.*, 2016).

***Klebsiella pneumoniae* e resistência a antimicrobianos**

A emergência de *K. pneumoniae* multirresistentes (MDR) tem se apresentado como um grave problema no manejo e tratamento de infecções causadas por essas bactérias. O carregamento de resistência por meio de plasmídeos facilmente transferíveis de uma bactéria para outra tem permitido a disseminação de resistência entre as cepas.

Existem três mecanismos principais pelos quais as bactérias podem se tornar resistentes a antibióticos e, esses mecanismos podem ainda ocorrer simultaneamente um com o outro. São eles: a diminuição na absorção dessas drogas (Pagès *et al.*, 2008), modificação dos alvos dos antibióticos (Sander *et al.*, 2002) e inativação do antibiótico (Paterson *et al.*, 2005).

A bactéria pode promover a diminuição na absorção do antibiótico por dois mecanismos principais, reduzindo a absorção da droga ou promovendo a expulsão da droga do interior da célula ou mesmo utilizando esses dois mecanismos simultaneamente. De forma geral, os antibióticos devem penetrar pela membrana externa para atingirem seus alvos no interior da célula bacteriana. Antibióticos hidrofóbicos costumam passar pela membrana enquanto antibióticos hidrofílicos atravessam a membrana por meio de porinas. Por vezes, a membrana pode ser alterada por meio da modificação de alguns aminoácidos e dessa forma se tornar uma barreira de permeabilidade para os antibióticos (Delcour *et al.*, 2009). A presença de bombas de efluxo também podem funcionar simultaneamente com a modificação de porinas já que são mecanismos capazes de expulsar as drogas do interior das células bacterianas (Poole *et al.*, 2005).

As bactérias também são capazes de modificar estruturas alvo dos antibióticos de forma a escaparem dos efeitos destes (Wright *et al.*, 2011). Existem vários alvos que podem ser modificados, como a subunidade 50S do ribossomo, metilação de genes que impedem a ação dos antibióticos e modificação do Lipídeo A do LPS (Sander *et al.*, 2002). Além destes mecanismos, existe ainda a resistência causada pela inativação do antibiótico. Essa resistência é devida principalmente a enzimas expressas pelas bactérias que são capazes de inativar o antibiótico (Paterson *et al.*, 2005).

Existem dois mecanismos de resistência mais comumente descritos em *K. pneumoniae*. Um é a expressão de BLSEs que confere resistência as cefalosporinas e aos monobactâmicos. O outro mecanismo é a expressão de carbapenamases que conferem resistência a praticamente todos os antibióticos beta-lactâmicos disponíveis incluindo os antibióticos carbapenêmicos (Paczosa *et al.*, 2016). A expressão de 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* MDRs (Tzouvelekis *et al.*, 2012).

O primeiro relato de uma bactéria Gram-negativa produzindo beta-lactamase ocorreu em 1965 em um isolado de *Escherichia coli*. Esta beta-lactamase foi denominada TEM-1 devido ao nome da paciente em que a bactéria foi isolada, Temoniera (Datta *et al.*, 1965). A beta-lactamase é uma enzima capaz de hidrolizar o quarto átomo do anel beta-lactâmico, uma estrutura comum a todos os antibióticos dessa classe, tornando o antibiótico inerte e tornando as bactérias portadoras dessa enzima imunes aos efeitos desses antimicrobianos (Medeiros *et al.*, 1997). Dessa forma, as beta-lactamases tornaram-se o principal mecanismo de resistência aos antibióticos beta-lactâmicos (Davies *et al.*, 1994).

Um pouco mais tarde, em 1982 uma outra beta-lactamase foi isolada, dessa vez de *K. pneumoniae*. Devido a suas cadeias de aminoácido essa beta-lactamase ficou conhecida como variante sulfidril 1 (SHV-1). As duas enzimas, TEM-1 e SHV-1 evoluíram e sofreram modificações em sua cadeia de aminoácidos de forma a serem descritas 178 variantes de TEM-1 e 137 de SHV-1 (Jacoby *et al.*, 2011). Devido ao amplo espectro de atividade dessas enzimas contra os antibióticos beta-lactâmicos, elas foram nomeadas como BLSEs. Desde então, mais de 100 tipos de BLSEs já foram descritas (Bradford *et al.*, 2001). CTX-M (resistente a cefotaxime) foi uma das últimas beta-lactamases a surgir e já possui 112 variantes identificadas (Jacoby *et al.*, 2011). Essas BLSEs são classificadas segundo sua estrutura na classificação de Ambler como classe A, B, C ou D. Nas classes A, C e D as enzimas utilizam serina para a hidrólise do anel beta-lactâmico. Na classe B as enzimas utilizam íons divalentes metálicos para realizar essa hidrólise (Bush *et al.*,

2010). Na classe A (penicilinas) estão enzimas TEMs, SHVs, CTX-Ms e KPCs. A classe B inclui as metalo beta-lactamases MBLs, VIMs (*Verona integron encoded metallo-beta-lactamases*) e imipenases. Na classe C estão as cefalosporinas AmpCs e na classe D estão as várias oxacilinas OXAs. As carbapenamases são, em geral, membros das classes A, B e D (Queenan *et al.*, 2007).

Os antibióticos carbapenêmicos são antibióticos em que o átomo de enxofre da estrutura do núcleo da penicilina foi substituído por um átomo de carbono. Essa substituição foi suficiente para que as antigas beta-lactamases fossem ineficazes nesses antibióticos (Birnbaum *et al.*, 1995)

O primeiro caso de *K. pneumoniae* expressando carbapenamase foi registrado em 1996 na Carolina do Norte. Esta carbapenamase foi chamada de KPC (Yigit *et al.*, 2001) e foi periodicamente registrada nos três anos seguintes. Contudo, na última década, cepas de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos tem sido descritas por todo o mundo e estima-se que mais de 33% dos isolados de *K. pneumoniae* encontrados em centros hospitalares apresentam essa resistência (Landman *et al.*, 2007). Existem 22 variantes dessa enzima e por serem carregadas por plasmídeos passíveis de serem transferidos, essa enzima, originalmente descrita em *K. pneumoniae*, já foi transferida para diversas outras bactérias como *E. coli*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Proteus* etc (Pitout *et al.*, 2008). Além disso, outras carbapenamases como MBL, NDM-1, IMP, e VIM já foram encontradas em linhagens de *K. pneumoniae*. Todas essas carbapenamases já foram descritas em outras espécies bacterianas o que contribui ainda mais para a disseminação de resistência aos carbapenêmicos por todo o mundo (Pitout *et al.*, 2015).

Uma das hipóteses existentes para a disseminação de resistência é de que a transferência horizontal de plasmídeos carregando resistência entre *E. coli* e *K. pneumoniae* residentes do trato gastrointestinal seja uma das formas de disseminação (Goren *et al.*, 2010). Essa forma de transferência torna-se preocupante visto que o trato gastrointestinal de pacientes hospitalizados é frequentemente colonizado por *K. pneumoniae* e, dessa forma, torna-se um reservatório de possíveis infecções em ambientes hospitalares visto que a aquisição desses plasmídeos por bactérias da

microbiota comensal pode facilitar a posterior transferência para linhagens causadoras de infecções extra-intestinais.

A prevalência de resistência antimicrobiana em variantes hvKp é consideravelmente menor quando comparadas com cepas cKp (Lee *et al.*, 2016). Ainda não se tem claro o motivo, mas sabe-se que isolados hvKp resistentes tem sido descritos com cada uma frequência cada vez maior por todo o mundo, principalmente em países com uma disseminação epidêmica de hvKp (Lee *et al.*, 2017).

O surgimento de hvKp resistentes, principalmente as resistentes a antibióticos carbapenêmicos tem sido motivo de grande preocupação já que o manejo e tratamento de infecções causadas por hvKp resistentes é ainda mais difícil e por esse motivo as taxas de mortalidade e morbidade em pacientes com essas infecções são bastante altas (Lee *et al.*, 2017).

Com o estabelecimento das tecnologias de sequenciamento rápido de genomas completos tem sido possível a comparação de genomas individuais de isolados bacterianos e com as análises de bioinformática tem sido possível identificar reguladores que controlam a expressão de genes relacionados à resistência antimicrobiana. Com essas ferramentas tem sido possível compreender ainda mais os processos relacionados a resistência antimicrobiana (Clegg *et al.*, 2016).

Fatores de virulência

Cápsula

A cápsula é constituída de uma matriz polissacarídica que envolve a bactéria. É necessária para a virulência de *K. pneumoniae* e, por isso, é o fator de virulência mais estudado (Podschun *et al.*, 1998) (Lawlor *et al.*, 2006). Infecções em modelos animais com *K. pneumoniae* sem cápsula mostram que essas variantes são menos eficientes em causar pneumonia e em disseminar a infecção sistemicamente, não são capazes de crescer nos pulmões ou na traqueia e são incapazes de causar a morte do hospedeiro mesmo quando inoculados em grandes quantidades nos animais (Lawlor *et al.*, 2005).

As variantes hvKp produzem uma hipercápsula que é um exopolissacarídeo mucoviscoso que reveste a bactéria mais robustamente do que a cápsula normal. Essa hipercápsula também contribui significativamente para a patogenicidade de hvKp (Yeh *et al.*, 2007). Tanto a cápsula tradicional quanto a hipercápsula são formadas por polissacarídeos capsulares denominados antígenos K. Esses antígenos permitem classificar as cepas de *K. pneumoniae* em sorotipos. Existem 78 sorotipos indo de K1 até K78 sendo as linhagens pertencentes aos sorotipos K1 e K2 consideradas mais virulentas do que as pertencentes a outros sorotipos (Lin *et al.*, 2010). Em hvKp a produção de hipercápsula pode ocorrer por diversos mecanismos como pela expressão de dois reguladores transcricionais localizados em plasmídeos denominados *rmpA* e *rmpA2* (*regulator of mucoid phenotype A*). Também deve-se à expressão da cópia desse mesmo gene localizada no cromossomo ou ainda pela regulação dos *capsule synthesis A and B genes* (*rcaA* e *rcaB*). A produção de hipercápsula também pode ser desencadeada pela expressão do *chromosomal mucoviscosity-associated gene A* (*magA*). Existe ainda a possibilidade do aumento da produção de cápsula pelos genes mencionados acima em resposta a uma alteração ambiental como mudança na quantidade de glicose ou ferro disponíveis no ambiente (Paczosa *et al.*, 2016) (Ko *et al.*, 2002).

Lipopolissacarídeos - LPS

LPS também conhecido como endotoxina é um constituinte da parede celular de todas as bactérias Gram-negativas. É formado pelo antígeno O, um núcleo de oligossacarídeo e o Lipídeo A. Existem 9 tipos de antígeno O sendo o O1 o mais comum (Hansen *et al.*, 1999). O LPS apresenta um papel duplo já que é capaz de proteger a bactéria de defesas humorais do hospedeiro, mas também é um forte ativador do sistema imune. Vários estudos indicam que o LPS possui um papel muito importante tanto na infecção por cepas clássicas de *K. pneumoniae* quanto por linhagens hipervirulentas (Cortés *et al.*, 2002). Já se tem descrito que o antígeno O que compõe o LPS possui um papel de interferir na fagocitose por neutrófilos e macrófagos e interferir na produção de citocinas. Em estudos com modelos animais, verificou-se que infecções causadas por *K.*

pneumoniae que não possuíam o antígeno O na molécula de LPS provocavam uma menor taxa de mortalidade nos animais infectados, falhavam em produzir uma infecção invasiva e o *clearance* bacteriano pelo sistema hospedeiro era mais rápido quando comparado com as bactérias com o antígeno O. (Lugo *et al.*, 2007).

Fímbrias do Tipo 1 e Tipo 3

Fímbrias são fatores de virulência de *K. pneumoniae* fundamentais para sua adesão nos tecidos do hospedeiro e às superfícies abióticas. Dentre os fatores de virulência descritos com função de adesão como a fímbria KPF-28, o fator CF29K e um material similar ao da cápsula, as fímbrias do Tipo 1 e 3 são considerados os que tem maior poder de adesão (Favre-Bonte *et al.*, 1995) (Darfeuille-Michaud *et al.*, 1992) (Di Martino *et al.*, 1996).

A fímbria do Tipo 1 é uma estrutura fina, com protusões filiformes dispersas por toda a superfície bacteriana. É uma estrutura encontrada em praticamente todos os membros da família das *Enterobacteriaceae*. Em *K. pneumoniae* é um fator encontrado em praticamente 90% de todos os isolados tanto hospitalares quanto ambientais (Stahlhut *et al.*, 2009) (Klemm *et al.*, 2000). A fímbria do tipo 1 é composta por duas porções, uma porção adesiva menor denominada FimH e uma porção maior denominada FimA (Struve *et al.*, 2008). *K. pneumoniae* utilizam as características do sítio em que estão para modular a expressão de fímbrias do tipo 1. Por exemplo, essas fímbrias são expressas quando a bactéria se encontra no trato urinário onde desempenham um papel no desenvolvimento de ITUs contribuindo para a invasão da bexiga e formação de biofilme, mas não são expressas no trato gastro intestinal nem nos pulmões sendo consideradas desnecessárias para a colonização desses dois outros sítios. Um estudo de pneumonia em modelo animal causada por *K. pneumoniae* mostrou que linhagens que não possuíam fímbria do tipo 1 não só eram capazes de colonizar os pulmões como também conseguiam se disseminar para outros sítios (Struve *et al.*, 2008) (Rosen *et al.*, 2008) (Struve *et al.*, 2009).

As fímbrias do tipo 3 são constituídas por duas porções também, uma porção adesiva menor denominada MrkD e uma porção maior denominada MrkA (Chan *et al.*, 2012). Essas fímbrias também se mostram desnecessárias na colonização do trato gastro-intestinal e na virulência de infecções nos pulmões e também parecem não contribuir para ITUs. (Struve *et al.*, 2009).

A importância clínica principal das fímbrias está no seu papel fundamental de adesão em superfícies abióticas e formação de biofilme. A capacidade de adesão em superfícies abióticas pode ser de grande relevância quando consideramos a possibilidade de essas superfícies serem dispositivos hospitalares como cateteres, tubos endotraqueais, equipamentos para ventilação de pacientes etc. (Struve *et al.*, 2008) e (Struve *et al.*, 2009).

Fímbrias do tipo 3 promovem a colonização de tubos endotraqueais e o estabelecimento de infecção pulmonar por *K. pneumoniae* por duas etapas, primeiramente MrkA se liga a superfície plástica do tubo e depois MrkD promove a ligação a superfícies cobertas por matriz derivada de colágeno ou à células brônquicas (Jagnow *et al.*, 2003). Mecanismos semelhantes podem ocorrer em outros dispositivos e equipamentos hospitalares.

Sideróforos

A habilidade de adquirir ferro é essencial para o crescimento e replicação de *K. pneumoniae* e tem um papel crucial no estabelecimento de uma infecção. Este é um recurso escasso e, por isso, deve ser adquirido pela bactéria no sítio de infecção em que esta se encontra. Contudo, o ferro não se encontra livremente disponível no hospedeiro, a maior parte está ligada a transportadores de ferro como as transferrinas. Além disto, o hospedeiro ainda é capaz de reduzir ainda mais os níveis de ferro disponíveis mediante uma infecção promovendo a ligação de ferro a lactoferrina (Bullen *et al.*, 1972) e (Miethke *et al.*, 2007). Dessa forma, as bactérias devem utilizar estratégias para conseguir esse ferro necessário para seu crescimento e propagação da infecção.

A principal estratégia usada para a aquisição de 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). *K. pneumoniae* é capaz de expressar vários sideróforos como enterobactina, yersiniabactina, salmoquelina e aerobactina. Cada um deles contribuindo para a virulência da bactéria (Figura 2).

Enterobactina é o sideróforo com maior afinidade pelo ferro e está presente quase que unanimemente em todas as cepas de *K. pneumoniae* sejam elas clássicas ou hvKp (Tarkkanen *et al.*, 1992) (El Fertas-Aissani *et al.*, 2013). Esse sideróforo possui seu transportador na membrana da bactéria para entrada do ferro sequestrado chamada FepA (Hsieh *et al.*, 2008). A expressão de enterobactina é aumentada quando ocorre a infecção, contudo sua ação é neutralizada por uma molécula produzida pelo hospedeiro chamada Lipocalina-2 (Lawlor *et al.*, 2007).

Lipocalina-2 é uma proteína produzida por uma variedade de células incluindo neutrófilos e que possui propriedades antimicrobianas. Contudo, seu mecanismo de ação é impedir a ação da enterobactina impedindo assim a aquisição de ferro pela bactéria por meio desse sideróforo (Colwland *et al.*, 1997) (Goetz *et al.*, 2002). Lipocalina-2 também desempenha uma função pró-inflamatória visto que estimula o recrutamento de neutrófilos por meio da produção de IL-8 (Bachman *et al.*, 2009).

Outro sideróforo denominado Yersiniabactina foi descoberto em uma ilha de patogenicidade presente em *Yersinia* mas já foi descrito em diversos outros organismos incluindo *K. pneumoniae*. O sideróforo possui como transportador uma estrutura formada pela proteína YbyQ (Bach *et al.*, 2000). Yersiniabactina tem sido observado em cerca de 90% dos isolados hvKp e em menos de 20% dos isolados de *K. pneumoniae* clássicas (Weiser *et al.*, 2011). Estudos sugerem que possivelmente este sideróforo possa desempenhar um papel nas infecções causadas pela variante hvKp (Russo *et al.*, 2015). Esse sideróforo é expresso principalmente em infecções pulmonares e por ter uma estrutura diferente da enterobactina, sua ação não é inibida pela Lipocalina-2, contudo, essa inibição ocorre na presença de transferrina (Lawlor *et al.*, 2007) e (Bachman *et al.*, 2009).

Salmoquelina é uma forma glicosilada da enterobactina (Fischbach *et al.*, 2005) e o transportador do ferro adquirido para o interior da bactéria é o IroN. Essa forma, diferenciada em

relação à enterobactina, também impede a ação da Lipocalina-2 sobre esse sideróforo. A presença deste sideróforo está relacionada a infecções na orofaringe e sua presença em isolados de hvKp relacionada a abscessos hepáticos é de mais de 90% (Hsieh *et al.*, 2008) e (El Fertas-Aissani *et al.*, 2013).

Aerobactina é um sideróforo com prevalência de quase 100% em hvKp e baixíssima prevalência em linhagens clássicas (El Fertas-Aissani *et al.*, 2013). A produção de aerobactina está sempre associada com a produção de hipercápsula embora nem todas as cepas com hipercápsula possuam esse sideróforo (Bachman *et al.*, 2009). Estudos em modelos animais de pneumonia e infecções subcutâneas mostram que esse sideróforo é essencial para o sucesso das infecções causadas por hvKp (Russo *et al.*, 2015).

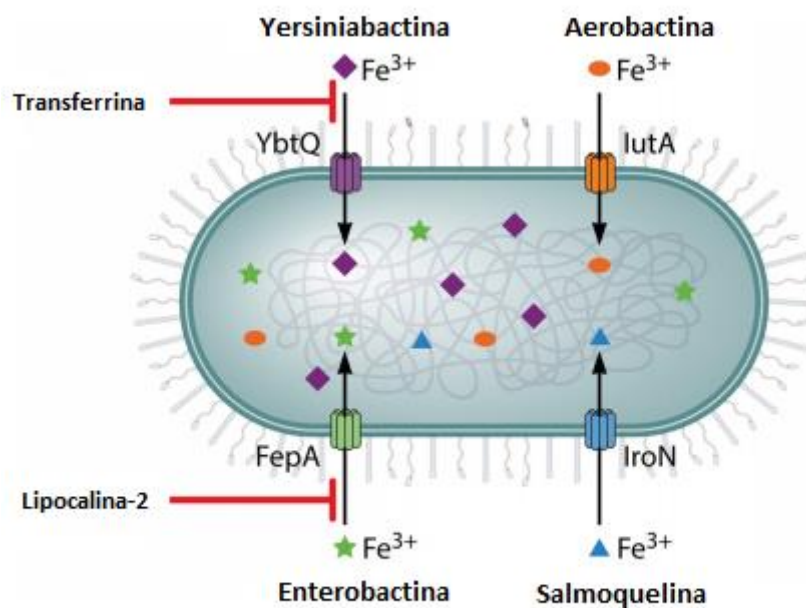


Figura 2. Sideróforos descritos em *Klebsiella pneumoniae*. Fonte: Adptada de Paczosa *et al* (2016).

Bombas de efluxo

K. pneumoniae expressa a bomba de efluxo AcrAB que promove a expulsão não apenas de antibióticos como quinolonas e beta-lactâmicos como também a de agentes antimicrobianos produzidos pelo hospedeiro. Essa bomba de efluxo também é um mecanismo importante para a resistência aos mecanismos de defesa imune inata do hospedeiro. Estudos mostram que mutantes bacterianos sem essa bomba de efluxo são mais suscetíveis a ação de peptídeos antimicrobianos como HBD-1 e HBD-2. A inativação dessa bomba não apenas confere suscetibilidade a vários antibióticos como também confere a diminuição da capacidade de causar pneumonia em modelos animais (Padilla *et al.*, 2010)(Lee *et al.*, 2014).

A expressão de outra bomba de efluxo em *K. pneumoniae* denominada EefABC não confere resistência a antibióticos mas confere tolerância ao ácido *in vitro* e uma alta capacidade competitiva no trato gastro intestinal do hospedeiro (Coudeyras *et al.*, 2008) (Lee *et al.*, 2014).

Porinas

K. pneumoniae expressa duas porinas principais OmpK35 e OmpK36 por meio das quais moléculas hidrofílicas são capazes de entrar para o interior da bactéria (Tsai *et al.* 2011). Existem ainda porinas alternativas como KpnO (Garcia-Sureda *et al.*, 2011) e OmpK26 (Srinivasan *et al.*, 2012). A perda de OmpK36, KpnO ou OmpK26 leva a um aumento da resistência a cefalosporinas e carbapenêmicos e reduz a virulência de infecções sistêmicas em modelos animais. A perda de OmpK35 não leva a nenhuma alteração na resistência a antibióticas ou na virulência da bactéria (March *et al.*, 2013) (Tsai *et al.* 2011) (Garcia-Sureda *et al.*, 2011). A perda de OmpK36 leva a uma mudança estrutural que promove uma suscetibilidade maior a fagocitose diminuindo assim a virulência bacteriana (Tsai *et al.* 2011).

Metabolismo de alantoina

O metabolismo de alantoina é uma forma pela qual a bactéria pode obter nitrogênio e carbono do ambiente (Vogels *et al.*, 1976). Um operon contendo genes relacionados ao metabolismo de alantoina encontra-se fortemente associando com hvKp visto que nessa variante sua expressão se encontra aumentada quando comparada com linhagens clássicas e possui um papel importante em abscessos hepáticos (Chou *et al.*, 2004). A utilização deste operon por hvKp muito provavelmente aumenta a virulência *in vivo* dessas variantes como mostra um estudo de modelo de infecção intragástrica (Chou *et al.*, 2004).

Transportadores

Kfu é um transportador de ferro que envolve a aquisição de ferro por *K. pneumoniae* e que está fortemente expresso em hvKp (Jung *et al.* 2013). Em um modelo animal de peritonite, observou-se que kfu era necessário para a formação de abscessos no fígado e no cérebro e de fato este gene é mais encontrado em isolados clínicos mais invasivos provenientes de meningites e endoftalmias do que nos isolados menos invasivos (Ma *et al.*, 2005)

OMPs (Proteínas de membrana externa)

OmpA é uma das proteínas externa de membrana principais em bactérias Gram-negativas e é importante para prevenir a ativação de células epiteliais das vias aéreas pela atuação nas vias dependentes de NF-kB, p38 e p44 / 42 promovendo, dessa forma, a atenuação da resposta inflamatória mediada por estas células (March *et al.*, 2011). A perda de OmpA deixa *K. pneumoniae* mais suscetível a ação dos peptídeos antimicrobianos (Llobet *et al.*, 2009). OmpA também contribui promovendo a resistência a fagocitose por macrófagos alveolares (March *et al.*, 2013). Estudos com OmpA também mostram que esse é um fator importante para a evasão do sistema imune tanto *in vivo* quanto *in vitro* por meio da indução de mediadores inflamatórios através da ativação de NF-KB e MAPKs (March *et al.*, 2011).

Biofilme

Biofilme trata-se de um agregado de microrganismos envoltos em uma matriz polissacarídica, DNA extracelular e proteínas. Sua formação é um processo que envolve várias etapas como adesão, produção de microcolônias, formação de biofilme maduro e liberação de fragmentos ou bactérias planctônicas do biofilme para a colonização de novos sítios. 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). A produção de biofilme é considerado um importante fator de virulência por promover um aumento da resistência aos mecanismos de defesa do hospedeiro e aos antimicrobianos (Thornton *et al.*, 2012) (Fux *et al.*, 2005).

Os mecanismos pelos quais o biofilme aumenta a resistência a antimicrobianos podem ser atribuídos a densa matriz de polissacarídeos, proteínas e DNA que envolvem as bactérias e dificultam a difusão dessas substâncias para o interior dessa estrutura. Em alguns casos em que a taxa de difusão do antimicrobiano não é prejudicada o biofilme ainda pode atuar facilitando a degradação desses antimicrobianos (Anderl *et al.* 2003) (Clegg *et al.*, 2016).

As bactérias localizadas mais no interior do biofilme tendem a crescer de forma mais lenta que as localizadas mais próximas da superfície do biofilme, dessa forma antimicrobianos que agem em bactérias em divisão não são capazes de afetar as bactérias localizadas no interior do biofilme. Além disso, a proximidade destas bactérias no interior do biofilme facilitam a troca de material genético e, conseqüentemente, facilitam a troca de material que confere resistência a antibióticos (Lazăr *et al.*, 2010; (Hennequin *et al.* 2012; (Long *et al.*, 2010). Por essas razões, a produção de biofilme contribui para a permanência e cronicidade de infecções causadas por *K. pneumoniae* que se encontram protegidas por essa estrutura (Clegg *et al.*, 2016).

Linhagens hvKp produzem mais biofilme do que linhagens clássicas de *K. pneumoniae* sendo dessa forma um importante fator para o aumento da virulência dessas variantes (Wu *et al.*, 2011).

Imunomodulação associada a infecções por HvKP

Quando uma infecção por *K. pneumoniae* ocorre, um dos primeiros mecanismos de defesa encontrado por esse patógeno, quando o sítio de infecção são as vias aéreas, é a presença de muco e cílios que promovem a expulsão destes do aparelho respiratório. Se o sítio de infecção for o trato geniturinário, o fluxo urinário e um conjunto de fatores químicos como o pH baixo da urina impedem que *K. pneumoniae* cheguem até a bexiga. Caso o sítio de infecção seja o trato gastrointestinal existem obstáculos como o peristaltismo, presença de muco e fatores químicos como a bile e enzimas digestivas (Puente *et al.*, 2001) (McClane *et al.*, 1999). Após passar por essa barreira inicial, *K. pneumoniae* tem que ultrapassar as defesas imunes celulares e humorais do hospedeiro.

K. pneumoniae evoluiu de forma a possuir uma série de mecanismos para se evadir do sistema imune principalmente em relação ao reconhecimento e morte pelas células imunes do hospedeiro. A cápsula e outros componentes celulares bacterianos são essenciais para camuflar a bactéria dos peptídeos antimicrobianos como as beta defensinas, deposição do sistema complemento e opsonização e também reduzindo o reconhecimento e adesão por células epiteliais e fagócitos promovendo assim uma resistência a fagocitose (Moranta *et al.*, 2010) (Lee *et al.*, 2014).

Esses mecanismos promovidos por esses fatores envolvem uma série de componentes da resposta imune do hospedeiro e variam conforme a cepa e o sítio de infecção (Gomez-Simmonds *et al.* 2017).

Inicialmente, assim que adentra o organismo, este patógeno entra em contato com os receptores de reconhecimento padrão que são expressos pelas células epiteliais e pelas células do sistema imune. Esses receptores tem a função de iniciar a cascata de sinais inflamatórios e, dessa

forma, promover o recrutamento de células fagocíticas. Os *toll like receptors* (TLRs) fazem parte desses receptores e dentro dessa categoria os principais são o TLR-2 e TLR-4 já que estes são ativados por componentes bacterianos como LPS, fímbrias e DNA bacteriano (Takeda *et al.*, 2003).

No trato respiratório a interação com o patógeno promove a ativação de uma cascata por Myd88 e TRIF levando a ativação de NF- κ B e de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs). A ativação dessa cascata leva a produção de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias o que promove o recrutamento de neutrófilos para o *clearence* bacteriano (Cai *et al.*, 2009) (Figura 3).

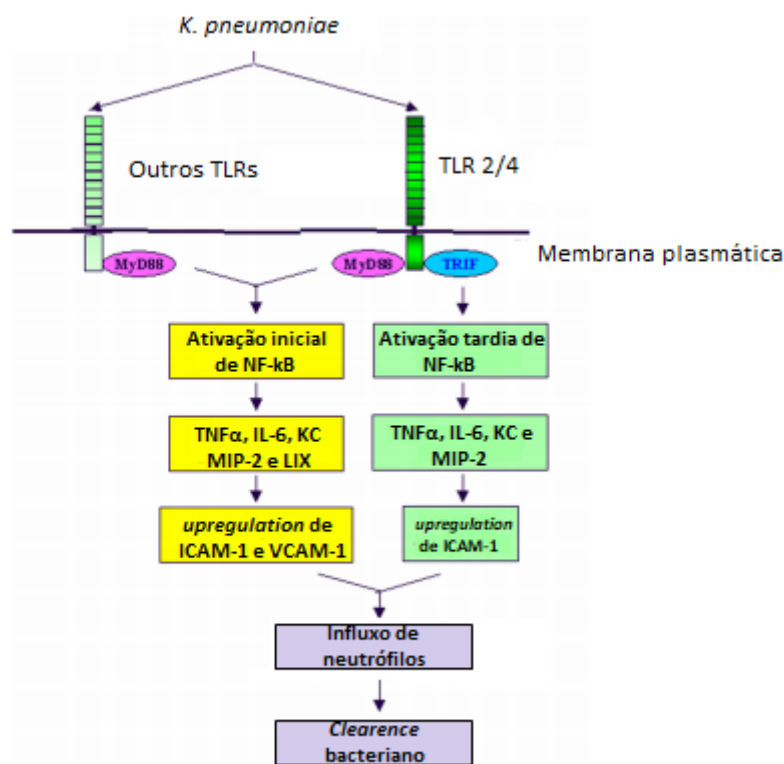


Figura 3. Cascata de sinalização via Myd88 e TRIF promovendo o influxo de neutrófilos e consequente *clearence* bacteriano. Fonte: Adaptada de Cai *et al* (2009).

Imunomodulação por cápsula de *K. pneumoniae*

Durante a infecção por *K. pneumoniae*, a cápsula protege o patógeno do sistema imune do hospedeiro de diferentes maneiras: por meio da inibição da fagocitose pelas células imunes, prevenindo a ativação da resposta imune precoce e impedindo a lise bacteriana pelo sistema complemento e por peptídeos antimicrobianos (Figura 4). Mesmo na presença de opsoninas, variantes, sem cápsulas são mais prováveis de serem fagocitadas por células do sistema imune do que linhagens capsuladas. Essa dificuldade de fagocitose promovida pela cápsula impede a ativação de sinais inflamatórios gerando uma resposta imune menos robusta e eficiente (Domenico *et al.*, 1994) (Evrard *et al.*, 2010). Estudos também mostram que linhagens capsuladas estimulam fracamente a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-6 em contrapartida estimulam a produção de grandes quantidades de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 quando comparadas com as variantes sem cápsula (Yoshida *et al.*, 2000) (Yoshida *et al.*, 2001). Estirpes com cápsula também diminuem a produção de IL-8 impedindo assim o recrutamento e a ativação de neutrófilos (Regueiro *et al.*, 2011) (Paczosa *et al.*, 2016).

A cápsula também promove resistência à lise pelo sistema complemento já que variantes sem cápsula tendem a ser mais ligadas por C3 devido à exposição maior de ativadores de complemento na superfície bacteriana, resultando no aumento da opsonização e fagocitose e também aumento da morte causada pelo soro na via alternativa do complemento (Álvarez *et al.*, 2000).

A cápsula também se liga aos peptídeos antimicrobianos produzidos pelo hospedeiro e impedem a interação dessas moléculas com a superfície bacteriana, é o que ocorre com os HBDs. HBDs são peptídeos antimicrobianos produzidos por células epiteliais do trato respiratório HBD-1, HBD-2 e HBD-3, os dois últimos são expressos apenas em casos de infecção por patógenos e citocinas pró-inflamatórias (Harder *et al.*, 2001). Estes peptídeos tem a sua expressão reduzida devido à cápsula de *K. pneumoniae* pois a mesma impede as respostas derivadas dos receptores TLRs e estimulam a expressão de CYLD e MKP-1, que atuam como reguladores negativos da expressão dos HBDs (Moranta *et al.*, 2010). A expressão de cápsula, inclusive, pode ser aumentada

quando se encontra na presença de moléculas antimicrobianas como lactoferrina e Polimixina B, como mostram alguns estudos (Llobet *et al.*, 2011).

O fenótipo da hipercápsula ainda se apresenta mais eficiente quando se trata de proteção e evasão do sistema imune do hospedeiro. Ele aumenta a resistência a morte bacteriana pelo sistema complemento e pela ação de peptídeos antimicrobianos como HBD-1, HBD-2, HBD-3, lactoferrina, proteína neutrofílica 1 (Fang *et al.*, 2004); aumenta também a resistência a fagocitose por neutrófilos (Pan *et al.*, 2012), macrófagos (Cortes *et al.*, 2002), células epiteliais (Sahly *et al.*, 2000) e células dendríticas (Evrard *et al.*, 2010) já que a presença de fucose na hipercápsula é capaz de ajudar na evasão a fagocitose (Pomakova *et al.*, 2012) (Fang *et al.*, 2004) (Wu *et al.*, 2008). Linhagens hipervirulentas de sorotipo K1 também mostram uma interação menor com macrófagos quando comparadas com as clássicas. Após serem fagocitadas as HvKps resistem aos mecanismos microbicidas dos neutrófilos e usam essas células como transportadores para outros locais como o fígado causando abscessos hepáticos (Wu *et al.*, 2008).

A cápsula também pode impedir a maturação de células dendríticas e por esse mecanismo reduzir a produção de citocinas pró-Th1 como IL-12 e TNF- α o que promoveria a ação de destruição do patógeno durante a apresentação de antígenos de *K. pneumoniae* por células dendríticas. Por esse mecanismo, a ativação de células T é prejudicada e ocorre também uma redução da migração de células NK mediada por células dendríticas (Evrard *et al.*, 2010). Dessa forma, a inibição da maturação de células dendríticas permite que a bactéria se evada sistema imune do hospedeiro e se multiplique no organismo mais facilmente (Li *et al.*, 2014).

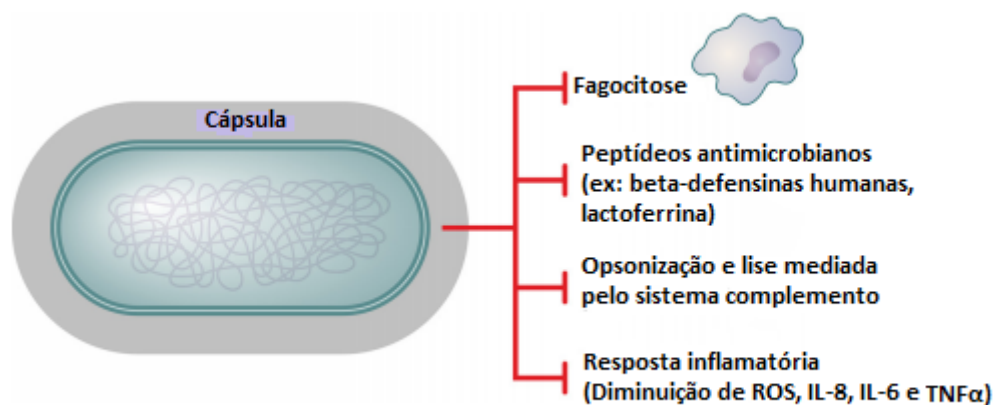


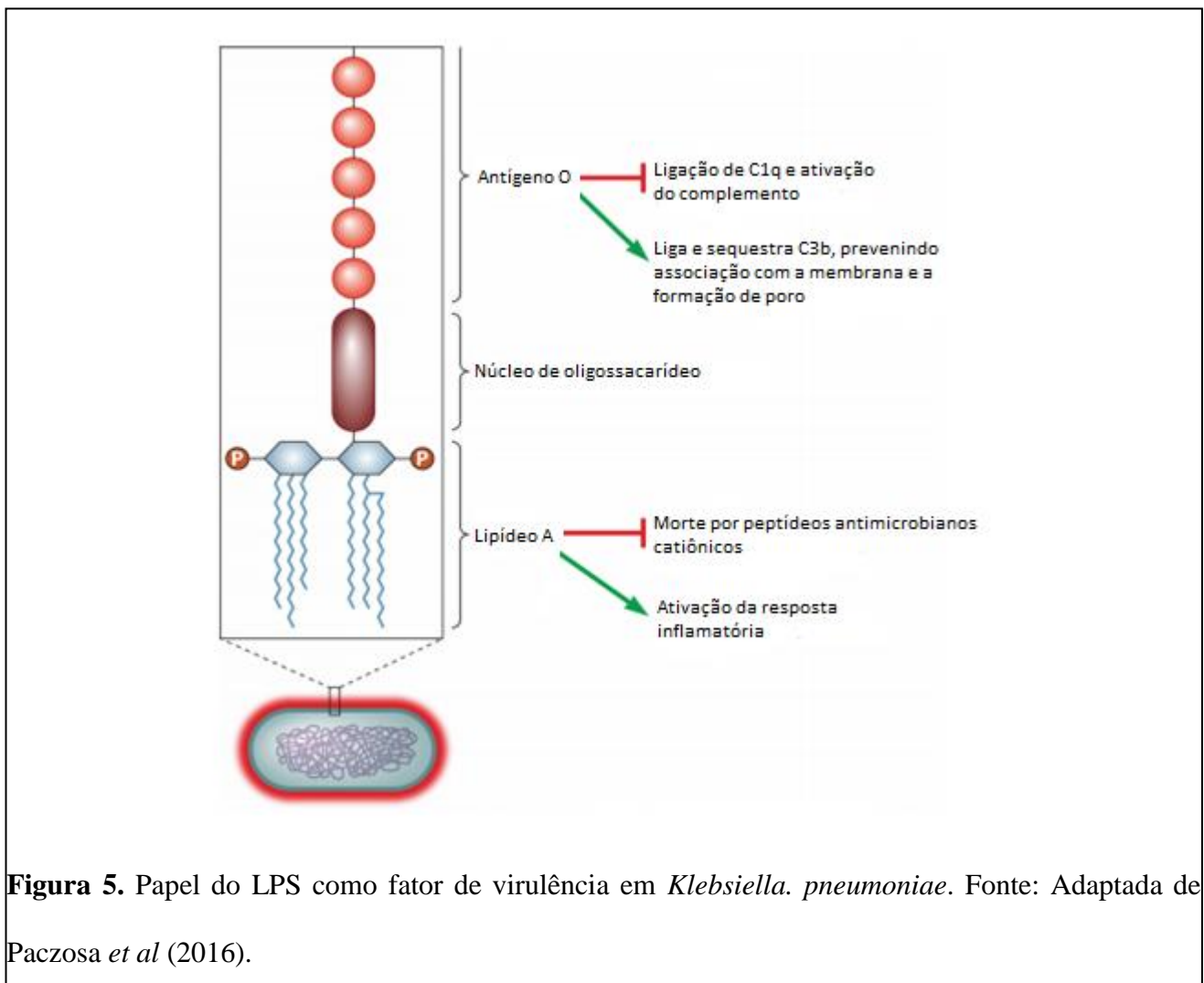
Figura 4. Papel da cápsula como fator de virulência em *Klebsiella pneumoniae*. Fonte: Adaptada de Paczosa *et al* (2016).

Imunomodulação por LPS de *K. pneumoniae*

O LPS também possui grande importância como fator de virulência para a evasão do sistema imune. O antígeno O é capaz de interferir na fagocitose de neutrófilos e macrófagos e interferir na produção de citocinas (Figura 5). Já o lipídeo A é capaz de se ligar fortemente ao TLR4 que promoverá a produção de citocinas e quimiocinas que promoverão o recrutamento e ativação de células imunes como macrófagos e neutrófilos que promoverão o *clearance* bacteriano (Figura 5). Isso tem sido demonstrado em modelos animais em que, quando o animal era *knockout* para TLR4 e Myd88, este se tornava mais suscetível a pneumonia e infecções sistêmicas por *K. pneumoniae* (Branger *et al.*, 2005; Cai *et al.*, 2009), pois a fraca produção de citocinas e quimiocinas impedia o recrutamento de neutrófilos. Contudo, a cápsula também funcionaria como uma forma de esconder e impedir a interação do LPS com TLRs. Estudos ainda sugerem que a depender do antígeno K presente na cápsula, a linhagem bacteriana teria mais ou menos facilidade em camuflar seu LPS (Merino *et al.*, 1992). A hipercápsula teria o mesmo papel do que a cápsula comum de camuflar o LPS e, dessa forma, diminuir a sinalização de TLR4 (Wu *et al.*, 2009). Uma das estratégias utilizadas também por *K. pneumoniae* é modificar o LPS modificando o lipídeo A de forma que este

não mais possa ser reconhecido por receptores humanos. Dessa forma já se verificou que esses lipídeos modificados não são capazes de ativar uma resposta inflamatória tão intensamente quanto o não modificado. Essa estratégia aumenta a virulência de *K. pneumoniae* (Llobet *et al.*, 2015). Estudos também mostram que o lipídeo A tem uma função protetora contra peptídeos.

O LPS também desempenha uma função protetora contra o complemento. Estirpes de *K. pneumoniae* que possuem uma cadeia íntegra e completa de antígeno O ou “*Smooth LPS*” resistem ao efeito bactericida mediada pelo sistema complemento quando comparada com linhagens que não possuem essas características (Clements *et al.*, 2007). Isso porque o antígeno O impede a ligação de C3 com C3b, um processo fundamental visto que essa ligação forma uma estrutura que funciona como uma opsonina e também faz parte da formação de poro (Merle *et al.*, 2015) (Shankar-Sinha *et al.*, 2004). Além disso, variantes que não possuem o antígeno O mostram-se mais sensíveis a ligação de C1q a superfície bacteriana resultando na ativação da via clássica do sistema complemento. Estudos em modelos animais ainda mostram que quando infectados por cepas sem o antígeno O, os animais eram colonizados, contudo, a infecção não se espalhava sistemicamente tornando a cepa sem esse antígeno menos virulenta (Alberti *et al.*, 1993) (Shankar-Sinha *et al.*, 2004).



Imunomodulação por fímbrias do tipo 1 e 3 de *K. pneumoniae*

K. pneumoniae portadoras de fímbrias podem se aderir a células fagocíticas o que desencadearia a fagocitose e morte bacteriana. As fímbrias do tipo 1 são capazes de desencadear uma forma de fagocitose independente de opsonização chamada lectinofagocitose. Neutrófilos e macrófagos são células capazes de realizar esse tipo de fagocitose (Athamna *et al.*, 1991) (Athamna *et al.*, 1988).

A porção da fímbria do tipo 1 denominada FimH é capaz de se ligar a mastócitos dessa forma induzir a liberação de citocinas que aumentam o recrutamento de neutrófilos durante a infecção (Malaviya *et al.*, 1996). Em algumas linhagens, a cápsula pode inibir a expressão de

fímbrias do tipo 1 e impedir a ligação a células fagocíticas e epiteliais. Embora o papel das fímbrias do tipo 3 não sejam tão bem elucidados quanto as do tipo 1 em relação a fagocitose, estudos *in vitro* mostram que as fímbrias do tipo 3 podem estimular uma resposta oxidativa em neutrófilos (Przondo-Mordarska *et al.*, 1991) (Figura 6).

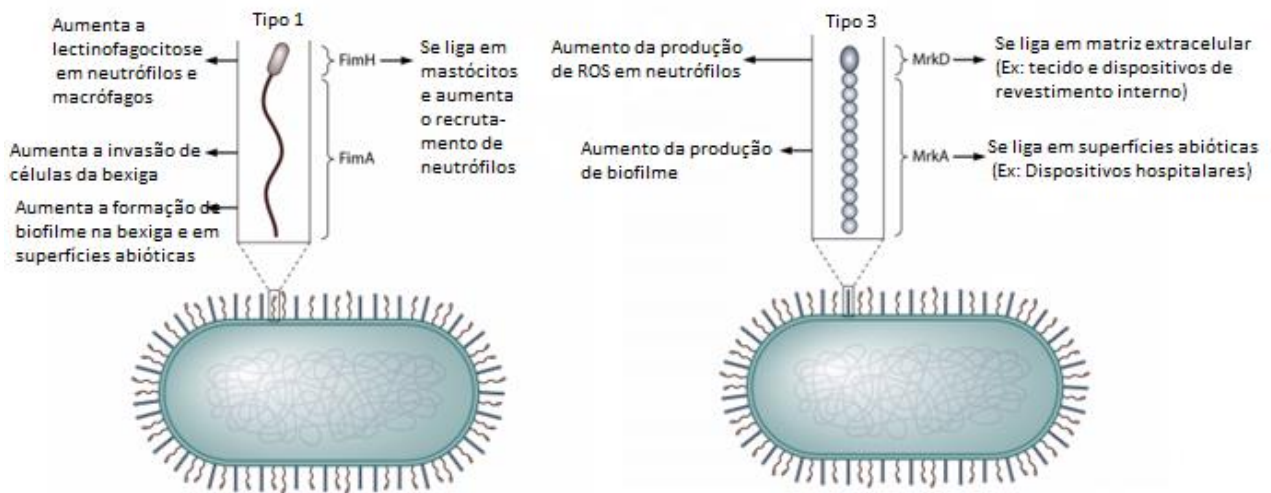


Figura 6. Papel das fímbrias do tipo 1 e 3 como fator de virulência de *Klebsiella pneumoniae*.

Fonte: Adaptada de Paczosa *et al* (2016).

A função dos principais fatores de virulência de *K. pneumoniae* estão ilustrados em conjunto na Figura 7.

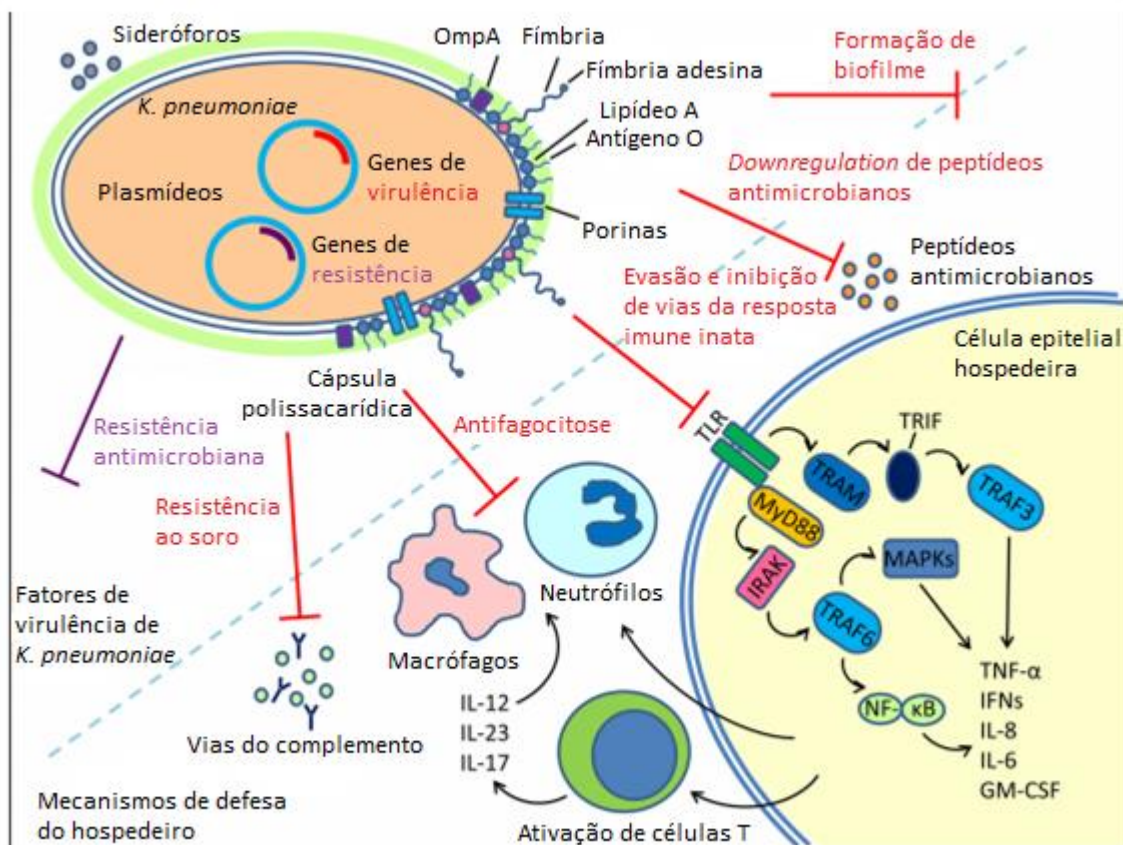


Figura 7. Resumo esquemático dos mecanismos de defesa da célula hospedeira mediante os fatores de virulência de *Klebsiella pneumoniae*. Fonte: Modificada de Simmonds *et al* (2016).

PPAR- γ

A família dos receptores ativados por proliferadores de peroxissoma compreendem três isoformas, PPAR- α , PPAR- β/δ e PPAR- γ . Essas três isoformas diferem uma da outra em relação a distribuição tecidual, sua função e suas moléculas ligantes específicas (Berger *et al.*, 2002).

PPAR- γ é expresso no tecido adiposo marrom e branco, no intestino e no baço. Sua expressão nos adipócitos tem um papel importante no processo de adipogênese, no balanço energético e na biossíntese de lipídeos além de ter um papel importante também no metabolismo de lipoproteínas e de sensibilidade a insulina (Berger *et al.*, 2002).

O gene do PPAR- γ produz três mRNAs, PPAR- γ 1, PPAR- γ 2 e PPAR- γ 3 todas apresentando um papel fundamental na diferenciação de adipócitos e no metabolismo da glicose. As proteínas traduzidas a partir de PPAR- γ 1 e PPAR- γ 3 são idênticas visto que o mRNA produzido é idêntico e a proteína traduzida a partir de PPAR- γ 1 apresenta uma porção NH₂ terminal adicional composta por 30 aminoácidos. A isoforma PPAR- γ 1 é expressa em praticamente todas as células e PPAR- γ 2 é expressa principalmente em tecido adiposo (Feige *et al.*, 2006) (Janani *et al.*, 2015).

A ativação de PPAR- γ ocorre da mesma forma em todas as isoformas, após a ligação da molécula ligante específica, o PPAR- γ forma um heterodímero com um receptor nuclear ativado por ligante denominado receptor retinóide X (RXR). O heterodímero PPAR- γ -RXR se liga aos elementos responsivos de PPAR (PPREs) na região promotora dos respectivos genes alvo (Wang *et al.*, 2014) (Figura 8). Essa ativação promove respostas como a sinalização de insulina, aumenta o transporte de glicose, aumenta a glicogênese, aumenta o funcionamento das mitocôndrias e a mobilização de lipídeos dos músculos e do fígado (DeFronzo *et al.*, 2009).

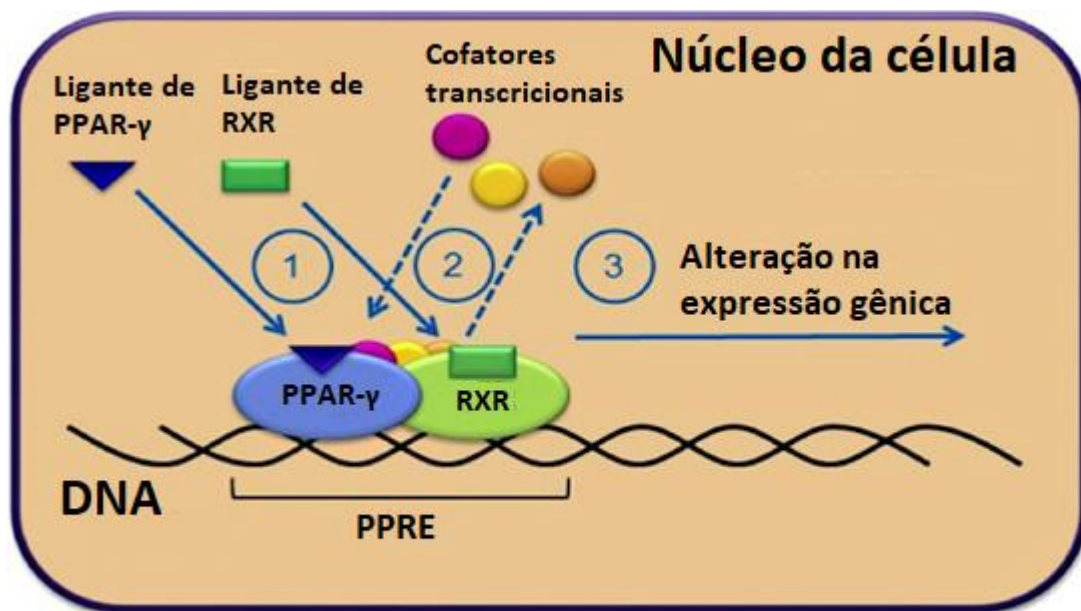


Figura 8. Ativação do PPAR- γ . Interação com o ligante específico com posterior dimerização com RXR e alteração na expressão gênica. Fonte: Modificada de Wang *et al* (2014).

Mais recentemente, o papel do PPAR- γ na imunoregulação tem sido bastante estudado já que esses receptores são expressos por uma grande quantidade de células do sistema imune como monócitos, macrófagos, linfócitos B e T, células NK, células dendríticas, neutrófilos, eosinófilos entre outras (Almeida *et al.*,2012), (Clark *et al.*, 2002).

Uma variedade de moléculas ligantes tanto naturais quanto sintéticas são capazes de ativar PPAR γ . São representantes de ligantes naturais as moléculas de ácidos graxos saturados e insaturados, eicosanoides como 15-deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J2(15d-PGJ2), ácido oleico entre outros. Após a ligação de um desses ligantes tanto naturais quanto sintéticos as moléculas co-repressoras são liberadas possibilitando a heterodimerização do PPAR γ com receptores retinoide X possibilitando a ligação deste complexo nas regiões promotoras dos genes alvo. (Berger *et al.*,2002).

A expressão e ativação de PPAR γ são alteradas durante processos inflamatórios e essas alterações parecem ser um fator importante na patogênese de algumas doenças. (Kaplan *et al.*, 2011). A ativação parece ter um efeito positivo em infecções bacterianas, especialmente com seus efeitos anti-inflamatórios pela inibição de moléculas pró inflamatórias como IL-6, TNF- α , IL-1 β , e IL-12. Estudos indicam que PPAR γ auxilia no *clearance* do patógeno em infecções bacterianas(Aronoff *et al.*, 2007). Outros estudos indicam que a ativação de PPAR γ aumenta a expressão de receptores de CD36 que promovem um *uptake* de neutrófilos apoptóticos por macrófagos, um processo crítico para a resolução da inflamação. (Asada *et al.*, 2004).

O PPAR γ também tem mostrado um efeito protetor em modelos de septicemia. Em um modelo de infecção nos pulmões a ativação PPAR γ mostrou um aumento do edema pulmonar aumentando a permeabilidade capilar, elevando ROS e a produção de citocinas e quimiocinas, a infiltração de neutrófilos e a expressão de moléculas de adesão associadas à inflamação como ICAM-1 e PECAM-1 (Reddy *et al.*, 2012). Uma resposta inflamatória exacerbada em animais que eram deficientes de PPAR γ é devido a um aumento na expressão de receptores *toll-like* 4 (TLR4) ocorrendo uma *upregulation* da sinalização via TLR4 incluindo a via de NF- κ B (Reddy *et al.*, 2012). A sinalização via TLR4 tem um papel importante na modulação da inflamação e septicemia (Ogawa

et al., 2005). Estudos mostram também que PPAR γ exerce um efeito protetor contra septicemia por meio da redução da expressão de Myd88 via IL-10 e este é um componente importante na via de TLR (Reddy *et al.*, 2008).

Sabe-se também que a ativação de PPAR γ pode inibir as vias de NF- κ B que é uma via importante na sinalização de respostas pró-inflamatórias. Essa inibição pode ocorrer por meio da degradação do complexo NF- κ B/p56, exportação nuclear de p56, por meio da competição com as moléculas co-ativadoras compartilhadas com NF- κ B. Além disso, PPAR γ também pode inibir a transcrição de NF- κ B por meio da transrepressão dos sítios iniciadores de transcrição de mediadores inflamatórios. O PPAR γ também pode se ligar competitivamente em sítios genômicos que são específicos para fatores de transcrição específicos da resposta inflamatória (Libby *et al.*, 2007).

Dessa forma, em infecções bacterianas em que a remoção completa do patógeno e o controle da inflamação são fatores fundamentais para o paciente, agonistas de PPAR γ oferecem promissoras estratégias terapêuticas (Reddy *et al.*, 2012).

Contudo, a ativação de PPAR γ também apresenta pontos negativos já que desencadeia apoptose em uma variedade de células imunes o que pode provocar uma redução da resposta imune durante uma infecção bacteriana (Bodles *et al.*, 2008). A ativação de PPAR γ também pode diminuir a migração e adesão de neutrófilos, um processo fundamental durante uma infecção (Reddy *et al.*, 2008).

Algumas bactérias, como *Mycobacterium*, são capazes de modular positivamente a via de ativação do PPAR γ a fim de alterar o metabolismo lipídico e conseqüentemente a biogênese de corpúsculos lipídicos para promover sua sobrevivência intracelular e replicação no hospedeiro sendo dessa forma um mecanismo auxiliar na patogênese dessas bactérias (Mahajan *et al.* 2012).

Embora muitas infecções bacterianas possam ser tratadas com o uso de antimicrobianos, o aumento cada vez maior de microrganismos multirresistentes ameaçam a saúde em todo o mundo comprometendo e complicando o tratamento de tais microrganismos, aumentando a mortalidade e

resultando em custos financeiros cada vez maiores. Com isso, drogas com novos mecanismos de ação são necessárias e o entendimento cada vez maior do papel do PPAR γ na imunidade, infecção e inflamação podem se tornar um novo aliado no combate a infecções bacterianas. Em conjunto com a antibioticoterapia o uso de agonistas e antagonistas de PPAR γ podem diminuir a dosagem de antibióticos usados e melhorar o resultado do tratamento (Tenover *et al.*, 2006) (Reddy *et al.*, 2016).

Corpúsculos lipídicos

Os corpúsculos lipídicos são organelas citoplasmáticas ricas em lipídeos, encontradas em uma diversidade de organismos incluindo plantas, bactérias, leveduras, células de mamíferos etc. Esses corpúsculos funcionam não apenas para o armazenamento e para o metabolismo de lipídeos, mas também no tráfego de membranas e na sinalização celular (Murphy *et al.*, 2001).

Em várias células o aumento da quantidade de corpúsculos lipídicos ocorre em geral em casos de infecção ou outros processos inflamatórios (DiDonato *et al.*, 2003). A formação de corpúsculos lipídicos durante infecções é um fenômeno bem regulado que pode ter implicações na patogênese microbiana. Os corpúsculos também funcionam como locais de compartimentalização da produção de mediadores inflamatórios favorecendo o aumento da produção de eicosanóides em células envolvidas em processos infecciosos (D'Ávila *et al.*, 2008).

O PPAR γ é um receptor que possui um papel fundamental na regulação da produção de corpúsculos lipídicos durante esses processos inflamatórios e/ou infecciosos.

Justificativa

A presença de linhagens bacterianas multirresistentes e hipervirulentas de *Klebsiella pneumoniae* no ambiente hospitalar são sempre motivo de preocupação devido aos danos que essas linhagens podem causar nos pacientes e também pela alta possibilidade de disseminação de resistência antimicrobiana em ambiente hospitalar. Essas linhagens hipervirulentas são dotadas de

uma grande quantidade de fatores de virulência que as torna capazes de colonizar e causar patologias em indivíduos imunocompetentes. A associação desses fatores de virulência com a aquisição de mecanismos de resistência antimicrobiana tornam esses patógenos um risco para a saúde pública. Por esta razão, o entendimento da origem clonal destas linhagens é essencial para a identificação da presença de clones de alta disseminação de resistência antimicrobiana. Paralelamente, a caracterização da capacidade de colonização e de sobrevivência no hospedeiro permite identificar os mecanismos associados ao estabelecimento desta bacteremia. Até o presente momento, pouco se conhece a cerca dos mecanismos envolvidos na modulação do metabolismo lipídico celular induzido pela bactéria *K. pneumoniae*. Contudo, já se sabe da importância do papel do PPAR γ durante o estabelecimento de uma infecção bacteriana. Este fator é capaz de inibir moléculas pró inflamatórias, auxiliar no processo de *clearance* do patógeno durante infecções bacterianas e também mostra um efeito protetor em modelos de septicemia. Controversamente, a ativação deste fator também é capaz de desencadear apoptose em uma variedade de células imunes e promover a diminuição da migração e adesão de neutrófilos, um processo fundamental durante uma infecção. Desta forma, a caracterização das vias associadas à modulação do metabolismo lipídico, especialmente no entendimento do papel do receptor nuclear PPAR- γ , em células epiteliais infectadas com *K. pneumoniae* contribuirá para o entendimento do estabelecimento desta bacteremia e disseminação bacteriana no interior do hospedeiro. Neste sentido, a realização deste trabalho visa esclarecer os mecanismos bacterianos associados à sobrevivência do patógeno no hospedeiro. Estes conhecimentos poderão ser utilizados futuramente para o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos a serem utilizados em infecções causadas por *K. pneumoniae* hipervirulentas e com resistência antimicrobiana.

II. Objetivos

Objetivo geral

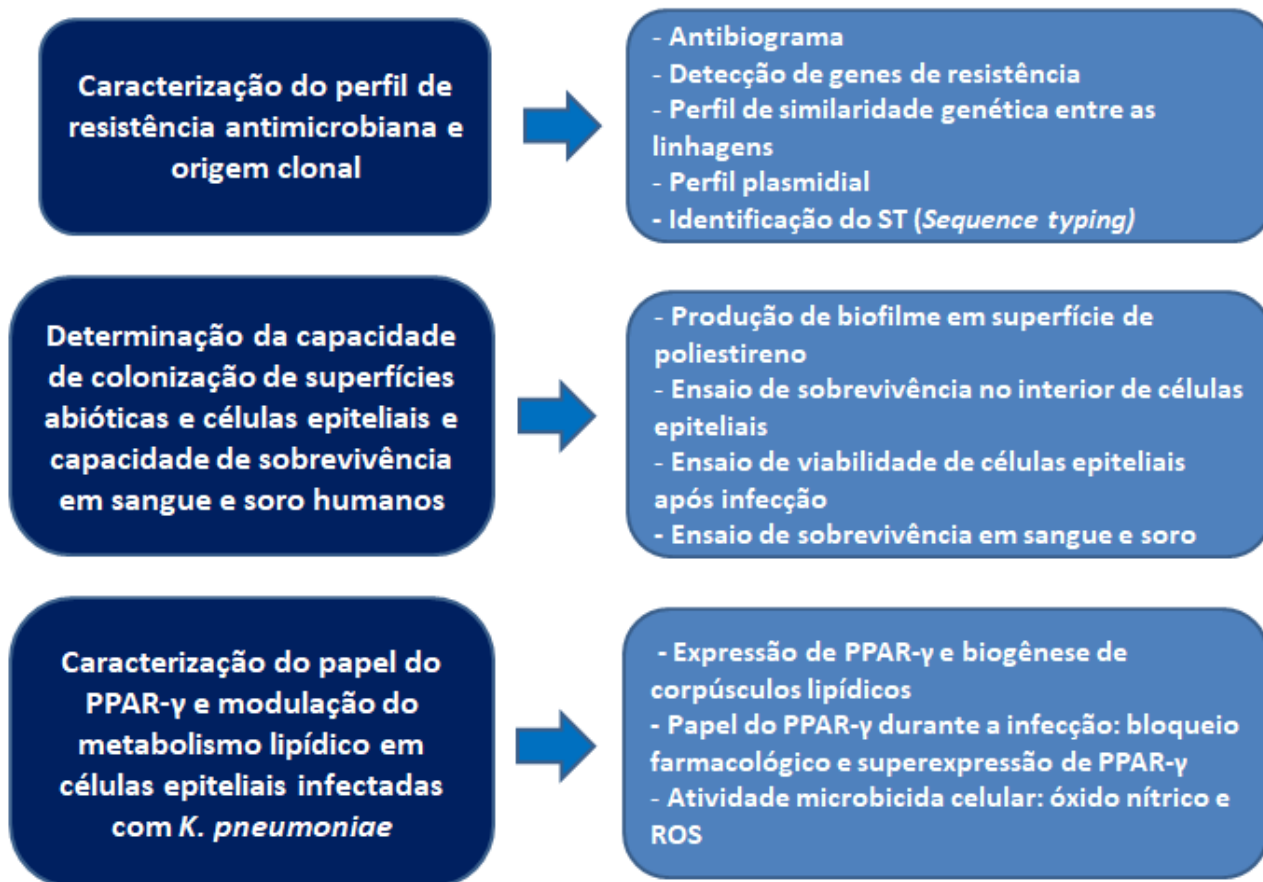
Caracterizar microbiologicamente e avaliar o papel do PPAR- γ na capacidade de colonização de células epiteliais por isolados hipermucoides de *Klebsiella pneumoniae* (HvKp).

Objetivos específicos

- Caracterizar o perfil de resistência a antimicrobianos de três isolados de *Klebsiella pneumoniae* hipermucoides causadores de bacteremia;
- Determinar o perfil de similaridade genética dos isolados acima referidos;
- Determinar o potencial de produção de biofilme em superfície abiótica exibido pelos isolados, da capacidade de sobrevivência em sangue total e em soro humano;
- Determinar a capacidade de infecção e de sobrevivência dos isolados no interior de células epiteliais da linhagem HEp-2 (carcinoma epidermóide de laringe humana);
- Identificar o perfil de expressão de PPAR- γ pelas células HEp-2 infectadas pelos isolados hipermucoides;
- Determinar o papel do PPAR- γ na capacidade de sobrevivência intracelular dos isolados bacterianos;
- Verificar o comportamento microbicida das células HEp-2 após a infecção com os isolados hipermucoides;

III. Material e Métodos

1. Desenho experimental



2. Isolamento, cultivo e armazenamento das linhagens de *K. pneumoniae*

Os isolados bacterianos foram obtidos a partir de hemocultura (Kp 31), cultura de *swab* retal (Kp 32) e cultura de *swab* nasal (Kp 34) de um paciente da Unidade de Terapia Intensiva (UTI) do Hospital Universitário de Brasília. A espécie bacteriana foi identificada pela plataforma VITEK-2 (bioMerieux) pelo Centro de Patologia Clínica do HUB/UnB. Após isolamento, cada isolado foi cultivado durante 18 horas em meio LB (Sigma-Aldrich) a 37°C e armazenadas em freezer -80°C em LB com glicerol (50%). A obtenção dos isolados 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).

3. Antibiograma

O antibiograma foi realizado pelo método de disco-difusão (Kirby-Bauer) conforme descrito pelo fabricante dos discos utilizados (Sensidisc DME – Diagnósticos Microbiológicos Especializados). Para este fim, 100uL de cada suspensão bacteriana, previamente cultivada em 5mL de LB (Sigma-Aldrich) a 37°C, foi inoculada em Ágar Muller Hinton (Kasvi) por meio de espalhamento com alça de Drigalski. Sobre cada inóculo, foram acondicionados os discos de antibióticos (Ciprofloxacina, Levofloxacina, Ofloxacina, Norfloxacina, Amicacina, Piperacilina/Tazobactam, Imipenem, Meropenem, Gentamicina, Ticarcilina/Ácido Clavulânico, Polimixina, Cefepime, Aztreonam, Tobramicina, Amoxicilina/Ácido Clavulânico, Ampicilina, Ampicilina/Sulbactam, Cefalotina, Cefoxitina, Cefazolina, Cloranfenicol, Ceftriaxona, Cefotaxima, Cefuroxima, Ertapenem, Nitrofurantoína, Sulfametoxazol/Trimetoprim, Tetraciclina). Após 24 horas de incubação a 37°C, as placas foram analisadas por meio da medida do halo de disco-difusão. Os resultados obtidos foram classificados como susceptível, intermediário ou resistente como descrito pelo fabricante dos discos utilizados.

4. Detecção de genes de resistência à antimicrobianos

Os isolados foram submetidos a ensaios de PCR para detecção e identificação dos genes de resistência. Foram detectados genes de carbapenamases, metalo beta-lactamases e beta lactamases de espectro estendido por meio da metodologia de Multiplex-PCR e Simplex-PCR que foram executadas como descrito por Dallenne *et al.* (2010) e Doyle *et al.* (2012). A pesquisa dos genes de resistência foi realizada pelo pesquisador Dr. André Pitondo da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo (USP). Os primers e as condições utilizadas para detecção dos genes de resistência estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Identificação dos oligonucleotídeos usados para as PCRs.

PCR	Genes	Amplicom (pb)	Primers (5'-3') F/R	Referência
Multiplex	<i>bla</i> _{KPC}	900	TGTCACTGTATCGCCGTC CTCAGTGCTCTACAGAAAACC	Doyle <i>et al.</i> (2012)
	<i>bla</i> _{IMP}	587	CTCAGTGCTCTACAGAAAACC GAAGGCGTTTATGTTTCATAC	
	<i>bla</i> _{NDM}	782	GCAGCTTGTCGGCCATGCGGGC GGTCGCGAAGCTGAGCACCCGCAT	
Multiplex	<i>bla</i> _{GES}	399	AGTCGGCTAGACCGGAAAG TTTGTCCGTGCTCAGGAT	Dallenne <i>et al.</i> (2010)
Simplex	<i>bla</i> _{VIM-1}	389	GTTTGGTTCGCATATCGCAAC AATGCGCAGCACCCAGGATAG	Mendes <i>et al.</i> (2007)
Simplex	seqüências ERIC	Tamanhos variados	CAGCCATGAACAACCTGGTGGCG TGCTTTGCGC AGGGAAGATTCC	Versalovic <i>et al.</i> (1991)
Simplex	<i>rpoB</i>	1075	GGCGAAATGGCWGAGAACCA GAGTCTTCGAAGTTGTAACC	MLST DATA BASE
Simplex	<i>gapA</i>	662	TGAAATATGACTCCACTCACGG CTTCAGAAGCGGCTTTGATGGCTT	MLST DATA BASE
Simplex	<i>mdh</i>	756	CCCAACTCGCTTCAGGTTTCAG CCGTTTTTCCCCAGCAGCAG	MLST DATA BASE
Simplex	<i>pgi</i>	566	GAGAAAAACCTGCCTGTACTGCTGGC CGCGCCACGCTTTATAGCGGTTAAT	MLST DATA BASE
Simplex	<i>phoE</i>	602	ACCTACCGCAACACCGACTTCTTCGG TGATCAGAAGCTGGTAGGTGAT	MLST DATA BASE
Simplex	<i>infB</i>	462	CTCGCTGCTGGACTATATTCG CGCTTTCAGCTCAAGAACTTC	MLST DATA BASE
Simplex	<i>tonB</i>	539	CTTTATACCTCGGTACATCAGGTT ATTCGCCGGCTGRGCRGAGAG	MLST DATA BASE*

*<https://pubmlst.org/kpneumoniae/>

5. Análise do perfil de similaridade genética por ERIC-PCR

Para a análise do perfil de similaridade genética, 100ng do DNA de cada linhagem, extraído conforme descrito por (Ausubel *et al.*1988) foram utilizados para a amplificação de sequências ERIC (Sequências Consensus Repetitivas de Enterobactérias) conforme descrito por (Versalovic *et al.* 1991). Após a amplificação, o perfil de bandas foi analisado após eletroforese em gel de agarose (1,5%) impregnado com brometo de etídio (0,5 ug/mL).

O perfil de similaridade genética entre as linhagens foi determinado por meio do uso do *software* Bionumerics versão 5.0. Os primers utilizados para o ERIC-PCR, estão descritos na Tabela 2.

6. Análise clonal de sequenciamento por Multi-locus

A determinação do *Sequence Type* de cada isolado bacteriano foi realizada por meio do Sequenciamento de Multi-locus conforme determinado pelo banco de dados de *Klebsiella pneumoniae* MLST DATABASE (<http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Kpneumoniae.html>). A metodologia utilizada para a técnica de MLST incluindo os *primers* e condições de reações de PCR, está disponível nesse banco de dados. Existem dois protocolos disponíveis e, para este estudo, foi adotado o protocolo que utiliza *primers* para a amplificação de genes *housekeeping*. Após a amplificação ocorre o sequenciamento dos genes amplificados para a determinação do ST. Os alelos e STs das linhagens estudadas foram determinados utilizando a plataforma do próprio site.. A amplificação dos genes ocorreu a uma temperatura de desnaturação de 94 °C por 2 minutos, 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 50°C por 1 minuto, 72°C por 30 segundos e na elongação final, 72°C por 5 minutos. A análise de sequenciamento por *Multi-Locus* foi realizada pelo pesquisador Dr. André Pitondo da USP de Ribeirão Preto.

7. Perfil plasmidial

Para a determinação do perfil plasmidial os isolados foram submetidos a uma extração plasmidial utilizando-se o kit NucleoBond® Xtra Midi (Macherey-Nagel) conforme as instruções do fabricante. Em seguida o material extraído foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,7% impregnado com brometo de etídeo para a visualização do perfil plasmidial.

8. Quantificação da produção de biofilme em superfície abiótica

A quantificação da produção de biofilmes foi feita pela quantificação da densidade óptica como descrito por (Stepanovic *et al.* (2004). O ensaio foi realizado em triplicata incluindo o controle negativo (meio de cultura LB). Cada isolado foi previamente cultivado em meio LB a 37 °C durante 18 horas. Em uma placa de poliestireno de 24 poços foram acrescentados 920uL de meio de cultura LB estéril e 40uL de cada suspensão bacteriana. A placa foi incubada a 37 °C por 24 horas. Após esse tempo, o sobrenadante foi descartado e os poços lavados com solução salina (0,9%). A fixação foi feita colocando-se metanol durante 15 minutos sobre cada poço. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e a placa deixada em temperatura ambiente até secar. Depois de seca, adicionou-se cristal violeta por 5 minutos. Após esse tempo, o excesso de corante foi lavado com água corrente e a placa deixada em temperatura ambiente para secar. Em seguida, foi adicionado 1 ml de ácido acético glacial (33%) para ressolubilização do sedimento. Depois a densidade ótica foi medida utilizando o espectrofotômetro de microplacas SpectraMax em 600nm. Para quantificar a produção de biofilme foi realizada uma média aritmética dos três valores de absorbância obtidos por cada amostra. Os isolados foram classificados em não produtores de biofilme, produtores fracos de biofilme, produtores de biofilme moderado e produtores de biofilme forte conforme os critérios descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Critério para a classificação da produção de biofilme conforme a média aritmética obtida da triplicata da absorbância obtida na leitura do teste. VA: valor de absorbância obtido da amostra. CN: valor de absorbância do controle negativo.

Biofilme forte	Biofilme moderado	Biofilme fraco	Não produtora
VA > 4x CN	4x CN ≥ VA > 2x CN	2x CN ≥ VA > CN	CN ≥ VA

9. Sobrevivência em sangue e soro humanos

As capacidade de sobrevivência em sangue total humano e soro humano foram determinadas como descrito por (DeLeo *et al.*, 2017). Os isolados previamente cultivadas em LB por 18 horas a 37°C foram inoculados em 550 uL de sangue total e em 550 uL de soro humano obtidos de doadores saudáveis. Nos tempos de 0, 30, 60 e 120 minutos após o inóculo bacteriano no sangue ou no soro, uma alíquota de 10 uL foi retirada, diluída 5x (nos tempos de 0 e 30 minutos) ou 6x (nos tempos de 60 e 120 minutos) em 90 uL de PBS. A seguir 10 uL das duas últimas diluições foram plaqueadas em ágar MacConkey (Kasvi), incubadas em estufa a 37°C. Após 24 horas de incubação foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônias (CFU). No experimento de sobrevivência em sangue foram utilizadas 10^7 bactérias de cada um dos três isolados e no experimento de sobrevivência em soro foram utilizadas 10^8 bactérias.

10. Cultivo da linhagem celular HEp-2 (carcinoma epidermoide de laringe humana)

Para a realização dos ensaios de infecção foram utilizadas a linhagem celular HEp-2, derivada de carcinoma epidermóide de laringe humana obtida do Núcleo de Cultura de Células do Instituto Adolfo Lutz. As linhagens foram armazenadas em freezer -80°C em soro fetal bovino (Gibco) e 10% de DMSO. Para a realização dos ensaios, a linhagem celular foi cultivada em garrafas de cultura em

meio DMEN (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco) e 1% do antibiótico PenStrep (Gibco) e mantidas em estufa a 37°C com uma atmosfera contendo 5% de CO₂.

11. Infecção de células HEp-2 com os isolados de *K. pneumoniae*

As células epiteliais HEp-2 foram cultivadas em meio DEMEN suplementado com 10% de soro fetal e 1% de PenStrep (Gibco). A cultura foi mantida a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂. As células foram infectadas pelas bactérias conforme descrito por (Favre-Bonte *et al.*, 1999) utilizando-se o MOI de 1:1000. O período de estimulação em todos os experimentos foi de 2 horas. Após esse período as células foram lavadas três vezes com a solução PBS 1X e em seguida, adicionado meio DEMEN com 1% de Gentamicina (1mg/ml) para a finalização do período de infecção.

12. Teste de viabilidade de células HEp-2 após infecção

A viabilidade de células HEp-2 infectadas foi determinada pelo método colorimétrico MTT, que verifica a viabilidade celular por meio da conversão da substância MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) em cristais de Formazan por meio da ação de desidrogenases mitocondriais. Esses cristais de Formazan que são produzidos por células viáveis, após serem solubilizados, são submetidos à espectrofotometria. O controle de morte celular foi feito com DMSO 20% e também outro controle onde as células não são estimuladas.

O teste de viabilidade celular foi realizado em triplicata, em placa de 96 poços. As células foram plaqueadas e no dia seguinte, com uma confluência de 70% foi realizada a infecção. Após 2 horas de infecção, foi acrescentado nos poços meio DMEN (Sigma-Aldrich) com o antibiótico Gentamicina (10mg/L). As placas de cultura foram novamente incubadas a 37°C com 5% e CO₂ e após 3, 6 e 24 horas foi realizada a adição de 10% de MTT (5mg/ml). A placa novamente incubada sob proteção da luz.. Após duas horas da adição do MTT foi realizada a ressolubilização utilizando

100uL de DMSO 100% . A placa foi submetida à leitura das absorvâncias em espectrofotômetro (SpectraMax) no comprimento de onda de 570 nm. Quanto menor a viabilidade celular, menor a redução do MTT e menor o sinal obtido pelo espectrofotômetro.

13. Determinação da sobrevivência bacteriana em células HEp-2

As células HEp-2 previamente cultivadas em placas de 24 poços apresentando confluência de 70% foram submetidas à infecção utilizando-se o MOI de 1:1000. Após duas horas, os poços foram lavados três vezes com PBS e em seguida foi adicionado meio de cultura com o antibiótico Gentamicina na concentração de 1% para a finalização do período de infecção. Após 3, 6 e 24 horas as células foram lavadas novamente 3X com PBS e em seguida desaderidas e lisadas com PBS 1X gelado e 0,5% de Triton-100X (Sigma-Aldrich). A placa foi centrifugada a 12.000g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento resuspenso em 100 ul de PBS 1X. Foi feita uma diluição em 90uL de PBS (1:10) e em seguida o lisado diluído e o não diluído foram plaqueados em meio Ágar-MacConkey (Kasvi) com o auxílio de uma alça de Drigalski. Após 24 horas de incubação a 37°C, o número de unidades formadoras de colônias (CFU) foi determinado.

14. Western blotting para detecção de PPAR γ

Para a análise da expressão de PPAR- γ , células HEp-2 foram infectadas . Após os períodos de 3, 6, 24 e 48 horas, a suspensão celular foi submetida à extração de proteínas por meio da utilização de um tampão de lise (100mM de Tris, 2% de SDS) e coquetel inibidor de protease (cOmplete Tablets, Mini EDTA-free, EASYpack -Roche). Após dosagem pelo método BCA (*Bicinchoninic Acid*), 50ug de proteínas foram precipitadas sob incubação a 8°C *overnight* em uma solução constituída de 8 partes de acetona para uma de metanol e uma parte de extrato de proteína. Em seguida, as proteínas foram submetidas a uma eletroforese em SDS-PAGE (12%) com uma voltagem de 90 volts até sair do concentrador e depois a 180 volts. Após a eletroforese,

as proteínas foram transferidas para uma membranas de nitrocelulose, utilizando o sistema miniprotean cell® (Bio-Rad) e o marcador pré-marcado Novex®sharp PreStained (Invitrogen). Após a transferência, a membrana foi incubada em solução de bloqueio PBST (PBS 1X acrescido de 0,01% de Tween-20), adicionados a leite desnatado 2,5% (Molico, Nestlé) *overnight* a 4°C. Após esse período a membrana foi lavada 3X durante 5 minutos em cada lavagem com PBST. A membrana foi incubada com o anticorpo anti PPAR- γ (Santa Cruz Biotechnology) na concentração de 1:200 *overnight* a 4°C. Em seguida, a membrana foi lavada novamente 3X e incubada por duas horas a temperatura ambiente com o anticorpo secundário Goat Anti-rabbit IgG Whole molecule – Alkaline phosphatase antibody (Novex, Life Technologies), diluído 1:5000. Após esse período, a membrana foi lavada 3X novamente em PBST e revelada em BCIP/NBT (Sigma), na concentração indicada pelo fabricante. A revelação foi interrompida com água destilada.

15. Sobrevivência de *K. pneumoniae* em células HEp-2 com super expressão de PPAR γ

Para a superexpressão de PPAR- γ , células HEp-2 foram transfectadas com o plasmídeo GS56450-1 pcDNA3.1(+)-seq1 com o inserto que promove a superexpressão de PPAR- γ . A transfecção foi realizada utilizando-se o reagente Viromer-RED (Lipocalyx) em placas de 24 poços com cultura celular apresentando confluência de 70%. Após um período de 24hs, as células foram infectadas com os isolados bacterianos (MOI 1:1000). Após duas horas a infecção foi finalizada com meio com Gentamicina e as placas incubadas por 24 horas a 37°C com 5% de CO₂. Posteriormente as células foram lisadas com PBS e 0,5% de Triton-X100 e a suspensão foi plaqueada em meio MacConkey (Kasvi). Após 24hs de incubação a 37°C as CFUs recuperadas foram contabilizadas.

16. Sobrevivência de *K. pneumoniae* em células HEp-2 com inibição de PPAR γ

Também foi realizado o experimento de sobrevivência dos isolados em células HEp-2 acrescidas do inibidor de PPAR γ , GW9662 (1 μ M/ml). O inibidor foi adicionado na cultura de células 1 hora antes da infecção com os isolados. Após esse período a infecção foi realizada (MOI 1:1000). Após duas horas de infecção ocorreu a finalização acrescentando meio de cultura com Gentamicina. Então as células foram incubadas por 24 horas. Após esse período as células foram lisadas e plaqueadas em MacConkey (Kasvi). Após 24hs de incubação a 37°C as CFUs recuperadas foram contabilizadas.

17. Atividade microbica da célula da linhagem HEp-2

A análise da atividade microbica da célula quantificada por meio da dosagem dos níveis de óxido nítrico celulares por espectrofotometria pelo método de Griess. No método de Griess a formação do óxido nítrico é verificada de forma indireta por meio da dosagem de nitrito, que é um produto estável obtido da oxidação do metabolismo do óxido nítrico. Para a dosagem, utilizou-se o sobrenadante obtido da cultura celular infectada nos tempos de 3, 6, 24 e 48hs. Foram adicionados volumes equivalentes de sobrenadante e reagente de Griess (1: 1 de sulfanilamida 1% diluído em 5% de H₃PO₄ e NEED (naphthylethylenediamine dihydrochloride) 0,1% diluído em água destilada) e a placa incubada durante 15 minutos em temperatura ambiente protegida de luz e o teor de nitrito foi medido por absorvância a 540 nm (Spectra Mx). A concentração de nitrito nas amostras foi calculada utilizando uma curva padrão preparada com NaNO₂.

Também analisamos a atividade microbica da célula pela geração de espécies reativas de oxigênio por citometria de fluxo das células depois de 1, 3 e 6 horas da infecção com as linhagens bacterianas. Após o experimento as células foram marcadas na placa de 24 poços com o composto fluorescente DCFDA por 1 hora. Em seguida as células foram desaderidas, centrifugadas a 1000g por 5 minutos e lavadas 5x com PBS. Após as lavagens as células foram ressuspensas em 200 μ L de PBS e analisadas no citômetro FACSVerse.

18. Quantificação de corpúsculos lipídicos

A biogênese de corpúsculos lipídicos foi verificada por meio de análises por citometria de fluxo das células marcadas através de marcação com a sonda lipofílica BODIPY (Life Technologies). As células foram marcadas 24 horas após a infecção, durante 30 minutos em placa de 24 poços. Após a marcação as células foram desaderidas, centrifugadas a 1000g por 5 minutos e lavadas 3x com PBS. Após as lavagens, estas foram ressuspensas em 200uL de PBS e encaminhadas para análise no citômetro FACSVerse.

19. Análise dos dados

A análise estatística dos dados obtidos foi feita pelo *software* GraphPadPrism versão7.0. Os dados de citometria de fluxo foram obtidos por FACSVerse (BD Bioscience) e foram analisados com o *software* Flowjo (Tree Star Inc.). As análises estatísticas foram feitas pelo *software* GraphPadPrism, utilizando o teste Anova e pós-teste de Bonferroni. Valores iguais ou menores que 0,05 foram considerados significativos.

IV. Resultados

1. Isolados bacterianos

No presente estudo foram utilizados três isolados de *Klebsiella pneumoniae* causadores de bacteremia. Os isolados foram obtidos de um paciente do sexo masculino, de 67 anos que foi submetido à hemicolectomia esquerda para a remoção de lesão vegetante. Após a realização da cirurgia, o paciente teve alta da Unidade de Tratamento Intensiva (UTI) do Hospital Universitário de Brasília (HUB/UnB) e foi para a enfermaria, onde apresentou piora do seu estado geral e sepse. Após laparotomia exploratória, o paciente foi novamente encaminhado para a UTI onde foi realizada a coleta de sangue para a hemocultura e swabs retal e nasal. Todas as culturas bacterianas foram positivas para *Klebsiella pneumoniae* e os isolados foram denominados Kp 31 (hemocultura), Kp 32 (swab retal) e Kp 34 (swab nasal). Todos os três isolados apresentaram fenótipo hipermucoide aos serem avaliados pelo método de “string” (Shon *et al.*, 2013), ou seja, produção de hipercápsula.

2. Perfil de resistência a antimicrobianos

O perfil de resistência a antimicrobianos foi avaliado por meio de halo de inibição (CLSI, 2016) e pela identificação de genes de resistência por PCR (Dallenne *et al.* 2010; Doyle *et al.* 2012).

A análise do antibiograma por halo de inibição demonstrou que os três isolados apresentaram-se resistentes aos antibióticos: Aztreonam, Ciprofloxacina, Cefepime, Imipenem, Levofloxacina, Meropenem, Norfloxacina, Ofloxacina, Piperacilina/Tazobactam, Ticarcilina/Ácido Clavulânico, Amoxicilina/Ácido Clavulânico, Ampicilina, Ampicilina/Sulbactam, Cefalotina, Cefoxitina, Cefazolina, Cloranfenicol, Ceftriaxona, Cefotaxima, Cefuroxima, Ertapenem, Nitrofurantoína, Sulfametoxazol/Trimetoprim, Tetraciclina. Além disso, apresentaram-se sensíveis apenas a Amicacina, Gentamicina, Polimixina B e Tobramicina sendo dessa forma classificados como Multirresistentes (MDR) (Tabela 4). Uma linhagem recebe essa classificação quando

apresenta resistência a ao menos um antibiótico em três classes diferentes de antibióticos, de acordo com (Magiorakos *et al.* 2011).

Tabela 4. Perfil de resistência e sensibilidade apresentado pelos 3 isolados bacterianos para os antibióticos testados.

Resistência	Sensibilidade
Aztreonam, Ciprofloxacina, Cefepime, Imipenem, Levofloxacina, Meropenem, Norfloxacin, Ofloxacina, Piperacilina/Tazobactam, Ticarcilina/Ácido Clavulânico, Amoxicilina/Ácido Clavulânico, Ampicilina, Ampicilina/Sulbactam, Cefalotina, Cefoxitina, Cefazolina, Cloranfenicol, Ceftriaxona, Cefotaxima, Cefuroxima, Ertapenem, Nitrofurantoína, Sulfametoxazol/Trimetoprim, Tetraciclina.	Amicacina, Gentamicina, Polimixina B, Tobramicina

Os resultados das PCRs para a detecção de genes de resistência nas linhagens mostraram que os três isolados (Kp 31, Kp 32 e Kp 34) apresentaram-se positivas para a presença de carbapenemases do tipo KPC e metalo beta-lactamases do tipo VIM. E as amostras Kp 32 (*swab* nasal) e Kp 34 (*swab* retal) ainda apresentaram-se positivas para beta lactamases de espectro estendido do tipo TEM e SHV (Tabela 5).

Tabela 5. Detecção de genes de resistência a antimicrobianos nas linhagens de *Klebsiella pneumoniae* por meio de PCR.

Isolados	MULTIPLEX			SIMPLEX		
	<i>bla</i> _{NDM}	<i>bla</i> _{KPC}	<i>bla</i> _{IMP}	<i>bla</i> _{OXA}	<i>bla</i> _{VIM}	<i>bla</i> _{GES}
Kp 31	-	+	-	-	+	-
Kp 32	-	+	-	-	+	-
Kp 34	-	+	-	-	+	-

3. Perfil de similaridade genética

O perfil de similaridade genética apresentado pelos três isolados foi determinado pela amplificação de sequências repetitivas intergênicas de enterobactérias – ERIC-PCR (Versalovic *et al.*, 1994), tipagem por multi-locus conforme determinado pelo banco de dados de *K. pneumoniae* MLST DATABASE (<http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Kpneumoniae.html>). e análise de perfil plasmidial. Os três isolados apresentaram o mesmo perfil plasmidial (Figura 9) e de amplificação de sequências ERIC (Figura 10). Além disto, a análise de MLST demonstrou que todos possuem uma mesma origem clonal, sendo identificados como ST11 e pertencente ao complexo clonal 258 (Tabela 6). Desta forma, os resultados apontam que os três isolados pertencem à uma mesma linhagem bacteriana que foi isolada de três sítios diferentes do paciente.



Figura 9. Eletroforese em gel de agarose 0,7% para análise do perfil plasmidial das três linhagens Kp 31, 32 e 34 V517: linhagem de *Escherichia coli* padrão para peso molecular plasmidial (55Kpb; 7,4Kpb;4Kbp; 2,8Kpb; 2,0 Kpb)

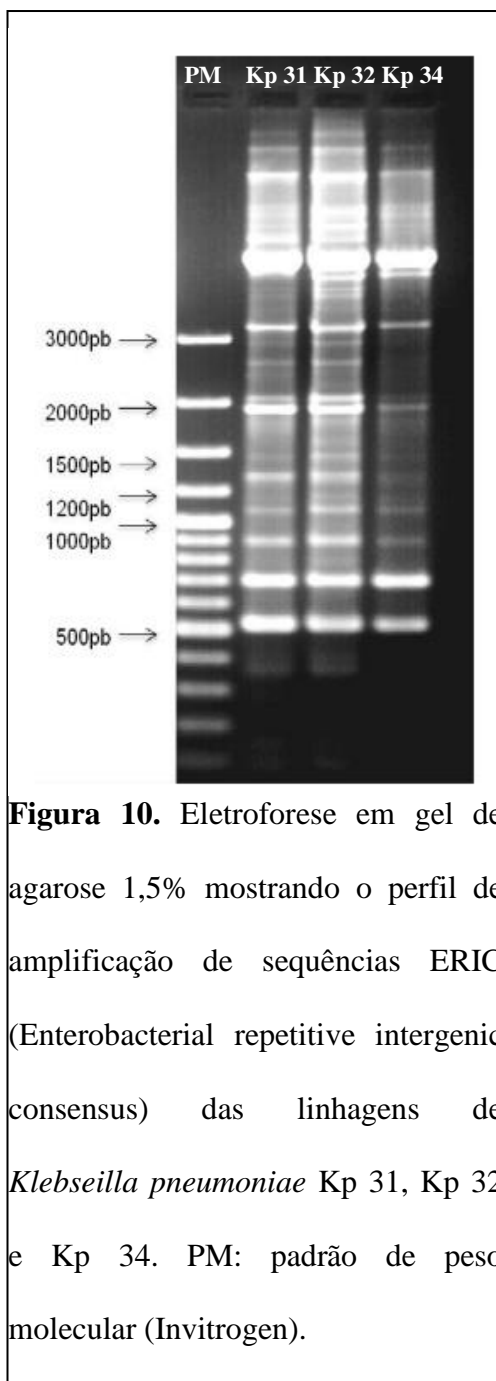


Figura 10. Eletroforese em gel de agarose 1,5% mostrando o perfil de amplificação de seqüências ERIC (Enterobacterial repetitive intergenic consensus) das linhagens de *Klebsiella pneumoniae* Kp 31, Kp 32 e Kp 34. PM: padrão de peso molecular (Invitrogen).

Tabela 6. Alelos identificados por sequenciamento de multi-locus das linhagens de *Klebsiella pneumoniae* Kp 31, Kp 32 e Kp 34.

Isolados	Alelos							ST	CC
	<i>gapA</i>	<i>infB</i>	<i>mdh</i>	<i>Pgi</i>	<i>phoE</i>	<i>rpoB</i>	<i>tonB</i>		
Kp 31	3	3	1	1	1	1	4	11	CC258
Kp 32	3	3	1	1	1	1	4	11	CC258
Kp 34	3	3	1	1	1	1	4	11	CC258

4. Avaliação do potencial de produção de biofilme em superfície abiótica e da capacidade de sobrevivência em sangue total e soro humano

A capacidade de produção de biofilme exibida pelos três isolados foi determinada por meio de detecção de biofilme em superfície de poliestireno conforme descrito por (Stepanovic *et al.* 2004). A análise realizada demonstrou que todos os três isolados foram classificados como fortes produtores de biofilme.

A capacidade de sobrevivência em sangue total humano e soro humano foi realizada como descrito por (DeLeo *et al.*, 2017) a partir da contagem de unidades formadoras de colônias após diferentes tempos de incubação dos isolados em sangue total e soro. Os dados (Figura 11) demonstram que os isolados apresentam multiplicação e ou capacidade de sobrevivência durante 30 minutos em sangue sendo a Kp 31 o único isolado que continuou sua multiplicação no sangue após 30 minutos até o tempo de 120 minutos que foi o tempo que durou o teste. Em soro, os três isolados foram capazes de sobreviver e se multiplicar em 30 minutos e, excetuando-se a Kp 31, os outros dois isolados mantiveram o comportamento de multiplicação até o tempo de 120 minutos.

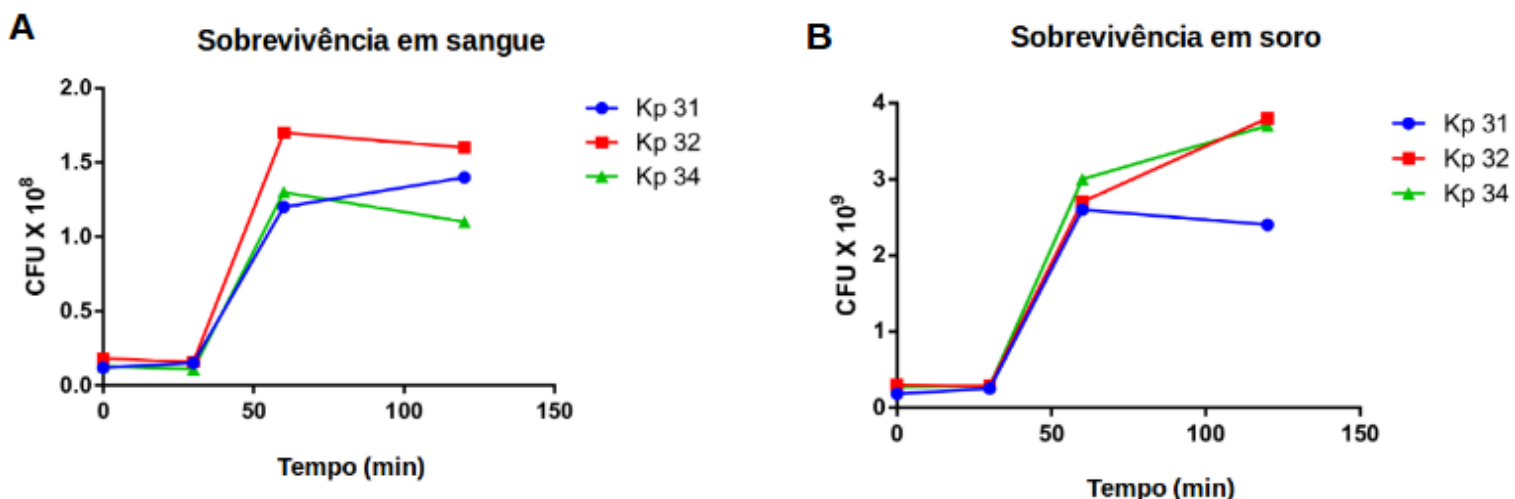


Figura 11. Unidades formadoras de colônias (CFUs) recuperadas após a incubação dos isolados de *Klebsiella pneumoniae* em sangue (A) e em soro (B) humanos nos tempos de 0, 30, 60 e 120 minutos.

5 .Capacidade de infecção e de sobrevivência dos isolados no interior de células epiteliais da linhagem HEp-2

Os isolados bacterianos foram utilizados para infectar células epiteliais da linhagem HEp-2 para avaliação de seus potenciais citotóxicos (por meio do teste de viabilidade celular) e de suas capacidades de sobrevivência no interior de células epiteliais frente à produção de mecanismos microbicidas (produção de Óxido Nítrico e espécies reativas de oxigênio).

A capacidade de infecção e de sobrevivência dos isolados no interior de células epiteliais da linhagem HEp-2 foi realizado conforme descrito por (Favre-Bonte *et al.*, 1999). Após a infecção das células epiteliais, a capacidade de sobrevivência dos isolados foi avaliada por meio da lise das células HEp-2 e cultivo dos isolados bacterianos em ágar MacConkey depois de diferentes tempos de incubação.

Para células infectadas com Kp 31, foram observadas 14700 unidades formadoras de colônia (CFU) nos tempos de 3 horas p.i (após infecção), 29000 em 6 horas p.i e 22666 24 horas p.i. Para as células infectadas com Kp 32 foram observadas 16500 CFUs 3 horas p.i, 19500 em 6 horas p.i e 36500 24 horas p.i. Para células infectadas com Kp 34 foram 21333 CFUs 3 horas p.i, 20666 6 horas p.i e 24500 no tempo de 24 horas p.i.

Os resultados demonstram que os isolados são capazes de sobreviver, se manter e multiplicar-se no interior dessa linhagem celular 3, 6 e 24 horas após a infecção (Figura 12).

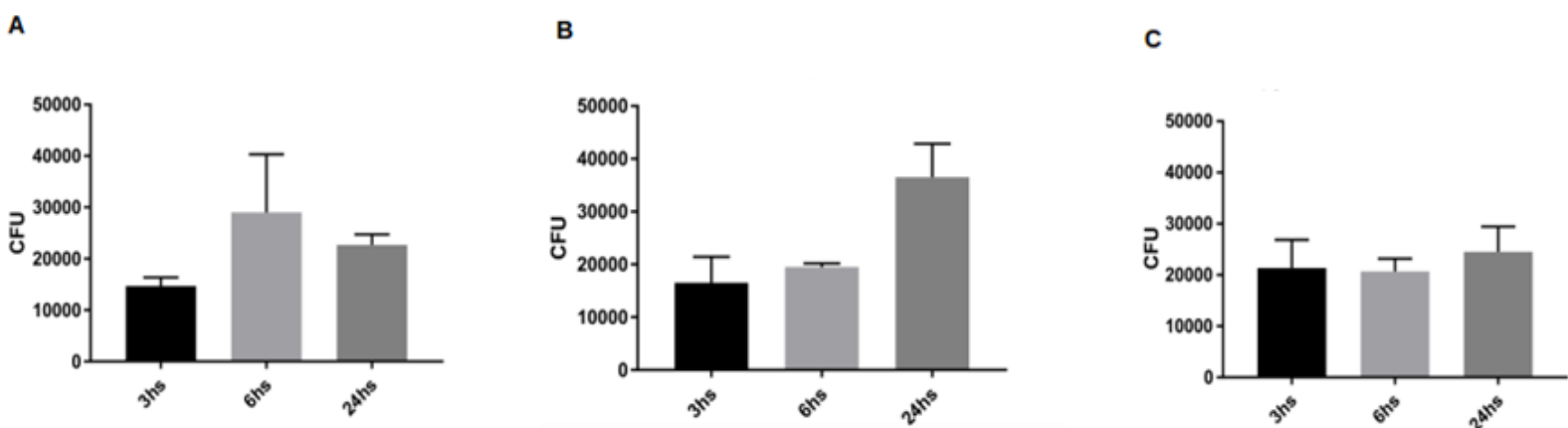


Figura 12. Unidades formadoras de colônias (CFUs) recuperadas após a infecção de células epiteliais da linhagem HEp-2 por isolados de *Klebsiella pneumoniae* nos tempos de 3 (três), 6 (seis) e 24 (vinte e quatro) horas. **A:** Células HEp-2 infectadas por Kp31; **B:** Células HEp-2 infectadas por Kp32; **C:** Células HEp-2 infectadas por Kp34; Ensaio referente a uma triplicata experimental. A análise estatística foi realizada por Anova.

Na análise da dosagem de óxido nítrico (NO) nos diferentes tempos de infecção, observou-se que quando infectadas por Kp 31 e Kp 32, as células HEp-2 mostraram uma baixa produção de NO 3 e 6 horas após a infecção, contudo, nos tempos de 24 e 48 horas após a infecção houve um aumento significativo na produção de NO (Figura 13). O comportamento apresentado pelas células após a infecção com Kp 34 foi diferente produzindo uma quantidade considerável de NO já nos períodos de 3 e 6 horas após a infecção. A produção maior de NO se deu 24 horas após a infecção e em 48 horas houve uma diminuição da quantidade de NO produzida.

Na análise da produção de espécies reativas de oxigênio no período de 1 hora pós a infecção observou-se a maior quantidade de produção de ROS. No período de 3 horas após a infecção essa produção decresce um pouco e no período de 6 horas volta a aumentar. Nos períodos de 1 e 3 horas a Kp 34 apresenta-se como a maior produtora de ROS, no entanto, no tempo de 6 horas passa a produzir menos e Kp 31 e Kp 32 passam a produzir maior quantidade de ROS (Figura 14).

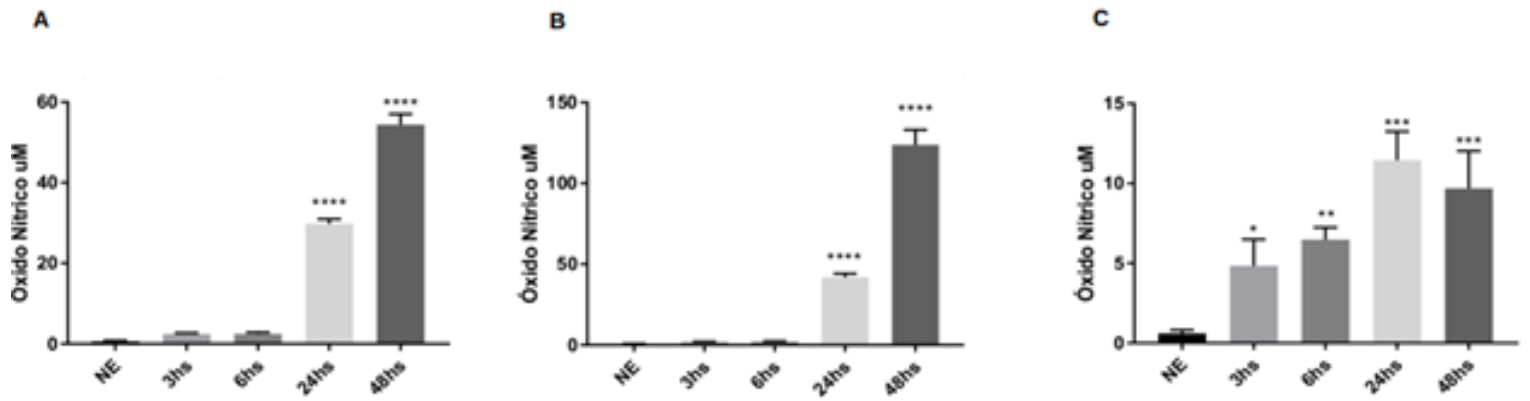


Figura 13. Dosagem de óxido nítrico (NO) 3, 6, 24 e 48 horas a partir do sobrenadante da cultura de células HEp-2 infectadas pelo isolados Kp 31 (A), Kp 32 (B) e Kp 34 (C) em diferentes tempos. NE: controle de células não infectadas. Ensaio referente a uma triplicata experimental. A análise estatística foi realizada por Anova e o asterisco (*) representa $p < 0,05$ em relação ao grupo controle NE.

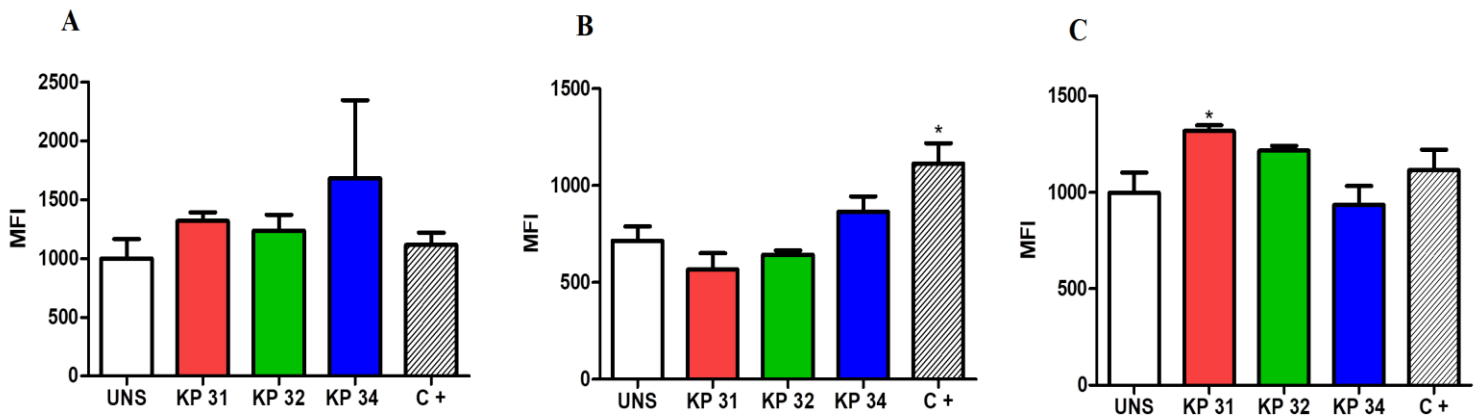


Figura 14. Atividade microbicida da célula pela geração de espécies reativas de oxigênio analisadas citometria de fluxo das células depois de 1 hora (A), 3 horas (B) e 6 horas (C) da infecção com as linhagens bacterianas. UNS: células HEp-2 não estimuladas. C+ :controle positivo realizado com Menadiona 50 µM. Ensaio referente a uma triplicata experimental. Canal utilizado foi FL-1. A análise estatística foi feita por Anova e o asterisco (*) representa $p < 0,05$ em relação ao grupo controle UNS.

Após a infecção das células HEp-2 com os isolados bacterianos observou-se que no período de 3 e 6 horas após a infecção os três isolados provocaram redução da viabilidade celular sendo que Kp 34 causou uma redução maior da viabilidade das células do que os outros dois isolados. Contudo, em 24 horas após a infecção a viabilidade celular voltou a aumentar (Figura 15).

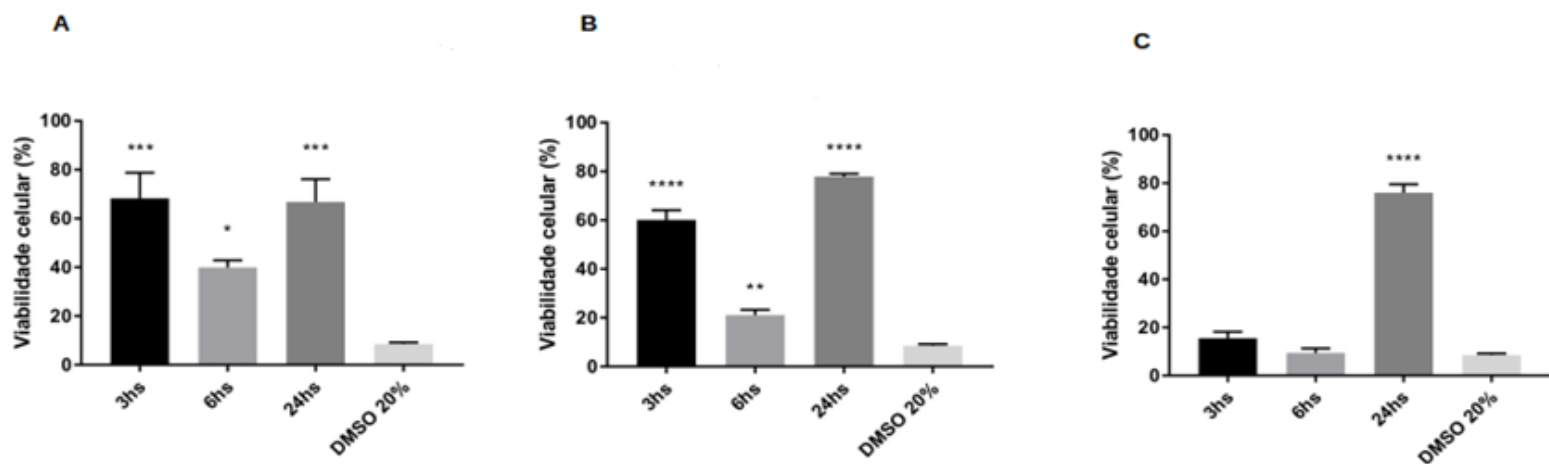


Figura 15. Viabilidade celular 3, 6 e 24 horas após a infecção com os isolados Kp 31 (A), Kp 32 (B) e Kp 34 (C). A taxa de sobrevivência foi calculada usando como referência a sobrevivência de 100% da cultura de células não infectadas e o controle de morte celular foi de 20% de DMSO no meio de cultura.

A análise conjunta dos resultados capacidade de infecção e sobrevivência sugerem que os três isolados são citotóxicos para as células HEp-2 nas primeiras seis horas de infecção. Após 24 horas, o potencial citotóxico bacteriano decresce paralelamente ao aumento da produção do mecanismo microbicida NO pelas células epiteliais. Neste período, ocorre também a multiplicação bacteriana no interior celular sugerindo que os isolados de *K. pneumoniae*, são capazes de sobreviver frente a mecanismos microbicidas da célula hospedeira.

6. Perfil de expressão de PPAR- γ pelas células HEp-2 infectadas

Para a determinação da expressão de PPAR- γ as células HEp-2 foram infectadas e nos períodos de 3, 6, 24 e 48 horas após a infecção foram submetidas a extração das proteínas para a

realização de *western blotting* (WB) para verificar a expressão de PPAR- γ . Nas células infectadas com as linhagens Kp 31 e Kp 32 o WB mostrou expressão de PPAR- γ em 24 e 48 horas após a infecção com os isolados. Já nas células infectadas com Kp 34 observou-se a expressão de PPAR- γ já no tempo de 6 horas após a infecção e um aumento nos tempos seguintes de 24 e 48 horas após a infecção (Figura 16).

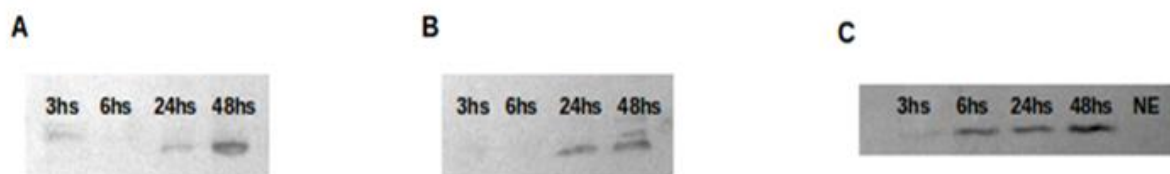


Figura 16. Western blotting para a proteína PPAR- γ 3, 6, 24 e 48 horas após a infecção de células HEp-2 com os isolados Kp 31 (A), Kp 32 (B) e Kp 34 (C). NE: Controle de células não infectadas. Para a detecção foi utilizado o anticorpo (PPAR- γ H-100 Santa Cruz Biotechnology). A concentração de proteínas usadas para o experimento foi de 50 ug.

7. Papel do PPAR- γ na capacidade de sobrevivência intracelular dos isolados bacterianos.

Após a definição do tempo de expressão de PPAR- γ pelas células epiteliais, seu papel na sobrevivência intracelular exibida pelas linhagens hipermucoides de *K. pneumoniae* foi avaliado por meio da infecção de células HEp-2 com inibição de expressão de PPAR- γ e com super-expressão de PPAR- γ .

Para o estudo do efeito de inibição de PPAR- γ , células HEp-2 cultivadas com o inibidor GW9662 foram submetidas à infecção. Após 24 horas, as células foram utilizadas para avaliação da sobrevivência bacteriana (por meio da contagem de unidades formadoras de colônias),

quantificação de óxido nítrico e quantificação de corpúsculos lipídicos por citometria (FACSVerse BD Bioscience).

Para avaliar o efeito da super-expressão de PPAR- γ , as células epiteliais foram transfectadas com o plasmídeo GS56450-2 pcDNA3.1(+)-seq2 para a super-expressão de PPAR- γ . Após 24, as células foram utilizadas para avaliação da sobrevivência bacteriana (por meio da contagem CFU), quantificação de óxido nítrico e quantificação de corpúsculos lipídicos por citometria de fluxo (FACSVerse BD Bioscience) .

7.1 Efeito da inibição de PPAR- γ em células HEp-2 na capacidade de sobrevivência intracelular dos isolados bacterianos

Nos experimentos de sobrevivência das linhagens no interior de células HEp-2 com PPAR- γ inibido pelo uso de GW9662 notou-se que quando este foi inibido as linhagens bacterianas apresentavam uma menor sobrevivência no interior das células (Figura 17).

Para células infectadas com Kp 31 sem o uso do inibidor GW9662, foram observadas 34700 CFUs e 21650 CFUs para as células infectadas na presença do inibidor. Para as células infectadas com Kp 32 sem o uso do inibidor, foram observadas 55500 CFUs e 35500 CFUs para as células infectadas na presença do inibidor. Para as células infectadas com Kp 34 sem o uso do inibidor foram observadas 48050 CFUs e 13100 CFUs para as células infectadas na presença do inibidor.

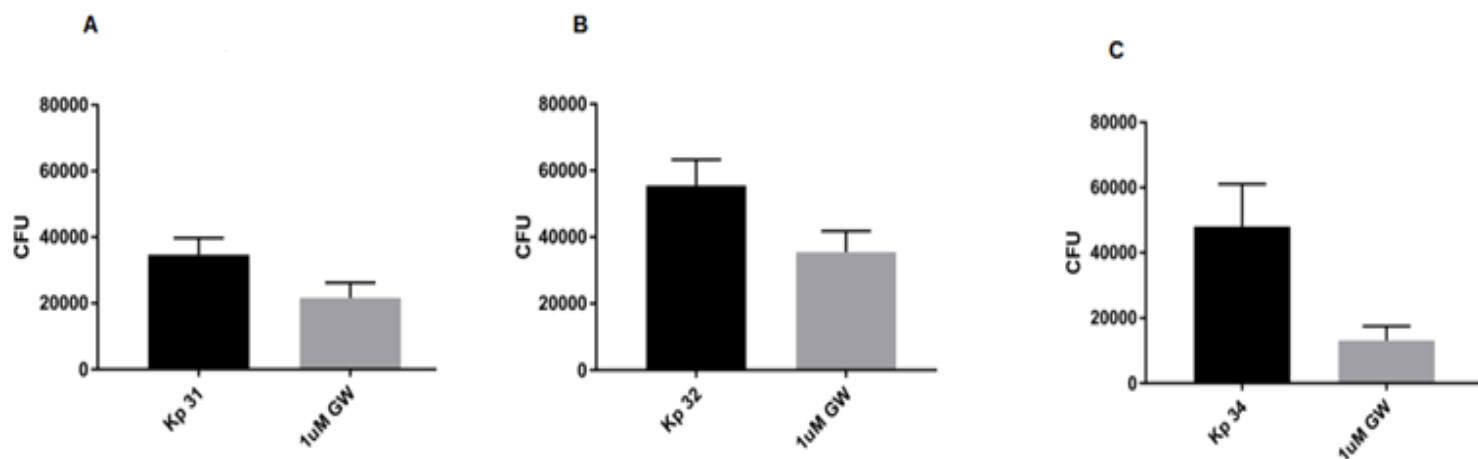


Figura 17. Unidades formadoras de colônias (CFUs) recuperadas após a infecção de células epiteliais da linhagem HEp-2 por isolados de *Klebsiella pneumoniae* no tempo de 24 (vinte e quatro) horas. **A:** Células HEp-2 infectadas por Kp31; **B:** Células HEp-2 infectadas por Kp32; **C:** Células HEp-2 infectadas por Kp34. Toda cultura celular foi incubada com o inibidor GW9662 1 hora antes da infecção. A análise estatística foi realizada por Anova.

Nos experimentos em que as células HEp-2 foram infectadas na presença do inibidor de PPAR- γ GW9662 o sobrenadante foi coletado 24 horas após a infecção para a dosagem de óxido nítrico. Observou-se uma maior produção de NO na presença do inibidor GW9662 do que na ausência do inibidor (Figura 18).

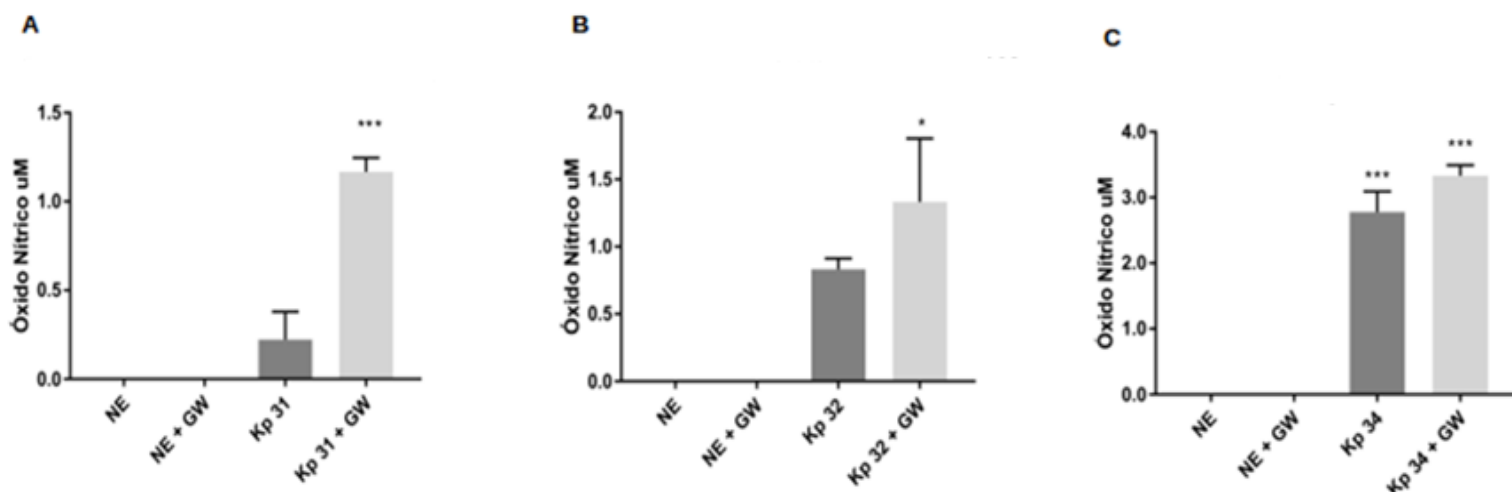


Figura 18. Dosagem de óxido nítrico (NO) na presença do inibidor GW9662 24 horas após a infecção com os isolados Kp 31 (A), Kp 32 (B) e Kp 34 (C). NE: Controle de células não infectadas. NE+GW: Controle de células não infectadas na presença de GW9662. A análise estatística foi realizada por Anova e o asterisco (*) representa $p < 0,05$ em relação aos grupos controles NE e NE+GW.

7.2 Efeito da super-expressão de PPAR- γ em células HEP-2 na capacidade de sobrevivência intracelular dos isolados bacterianos

As células HEP-2 foram transfectadas com o plasmídeo GS56450-2 pcDNA3.1(+)-seq2 para a super-expressão de PPAR- γ e após 24 horas da infecção das células transfectadas com as linhagens foi realizada a contagem de CFUs bacterianas.

Para células infectadas com Kp31 não transfectadas foram observadas 4383 CFUs, 4576 CFUs para as transfectadas com o vetor vazio (VV) e 8660 para as células transfectadas com o plasmídeo de super-expressão. Para as células infectadas com Kp 32 não transfectadas foram observadas 3020 CFUs, 4686 CFUs para as transfectadas com o vetor vazio e 6360 para as células transfectadas com o plasmídeo de super-expressão. Para células infectadas com Kp 34 não transfectadas foram observadas 2373 CFUs, 3486 CFUs para as transfectadas com o vetor vazio e

7270 para as células transfectadas com o plasmídeo de super-expressão. Os resultados indicam que a sobrevivência dos isolados nas células transfectadas é maior em células HEp-2 que superexpressavam PPAR- γ do que nas células não transfectadas (Figuras 19).

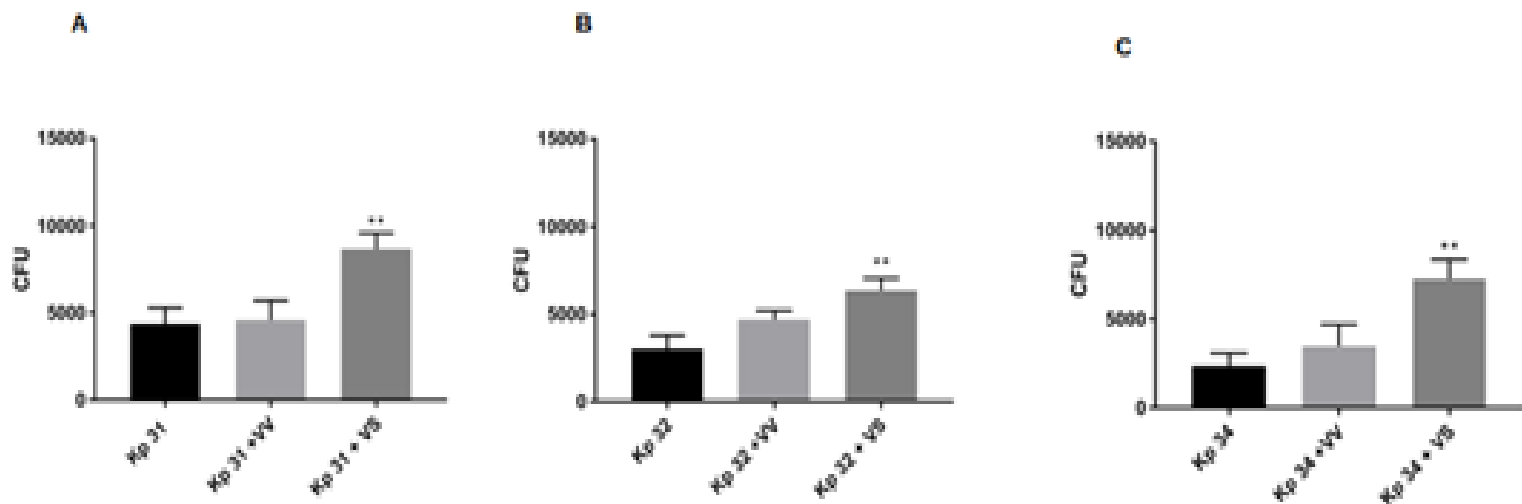


Figura 19. Unidades formadoras de colônias (CFUs) recuperadas após a infecção de células epiteliais da linhagem HEp-2 por isolados de *Klebsiella pneumoniae* em diferentes no tempo de 24 (vinte e quatro) horas. **A:** Células HEp-2 infectadas por Kp31; **B:** Células HEp-2 infectadas por Kp32; **C:** Células HEp-2 infectadas por Kp34. VV: Células transfectadas com vetor vazio. VS: Células transfectadas com plasmídeo para a super-expressão de PPAR- γ . A análise estatística foi feita por Anova e o asterisco (*) representa $p < 0,05$ em relação aos grupos infectados com as bactérias (Kp 31, Kp 32 e Kp 34).

Nos experimentos em que as células HEp-2 foram transfectadas com o plasmídeo para a superexpressão de PPAR- γ o sobrenadante foi coletado 24 horas após a infecção para a dosagem de óxido nítrico. Observou-se que a produção de óxido nítrico nas células infectadas com as linhagens bacterianas e que foram transfectadas com o plasmídeo para a superexpressão de PPAR- γ foi menor quando comparadas com as células infectadas, mas não transfectadas (Figuras 20).

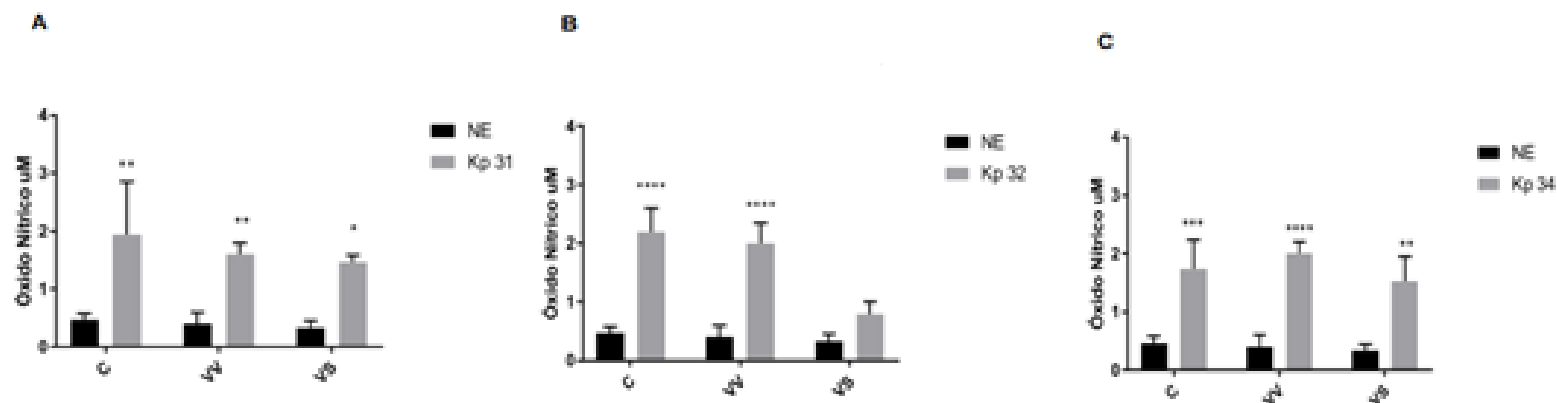


Figura 20. Dosagem de óxido nítrico (NO) 24 horas após a infecção com os isolados Kp 31 (A), Kp 32 (B) e Kp 34 (C) de células HEP-2 transfectadas. C: grupo controle formado por células não infectadas (NE) com os isolados e por células infectadas, mas não transfectadas. VV: células transfectadas com o vetor vazio e que foram infectadas com os isolados e que não foram infectadas (NE). VS: células transfectadas com o vetor de super-expressão que foram infectadas com os isolados e que não foram infectadas (NE). A análise estatística foi feita por Anova e o asterisco (*) representa $p < 0,05$ em relação aos grupos controles NE.

8. Quantificação de corpúsculos lipídicos

No experimento de quantificação de corpúsculos lipídicos marcados com a sonda lipofílica BODIPY para análise por citometria de fluxo, observou-se maior biogênese de corpúsculos lipídicos nas células infectadas com as bactérias quando comparadas com as células infectadas pelos isolados, mas que haviam sido transfectadas com o plasmídeo para superexpressão de PPAR- γ (Figura 21). Como controle positivo para a produção de corpúsculos lipídicos foi utilizado o LPS acrescido nas células 24 horas antes da realização da marcação. Como controle também foi realizada a transfecção em células com o plasmídeo sem o inserto para a superexpressão de PPAR- γ .

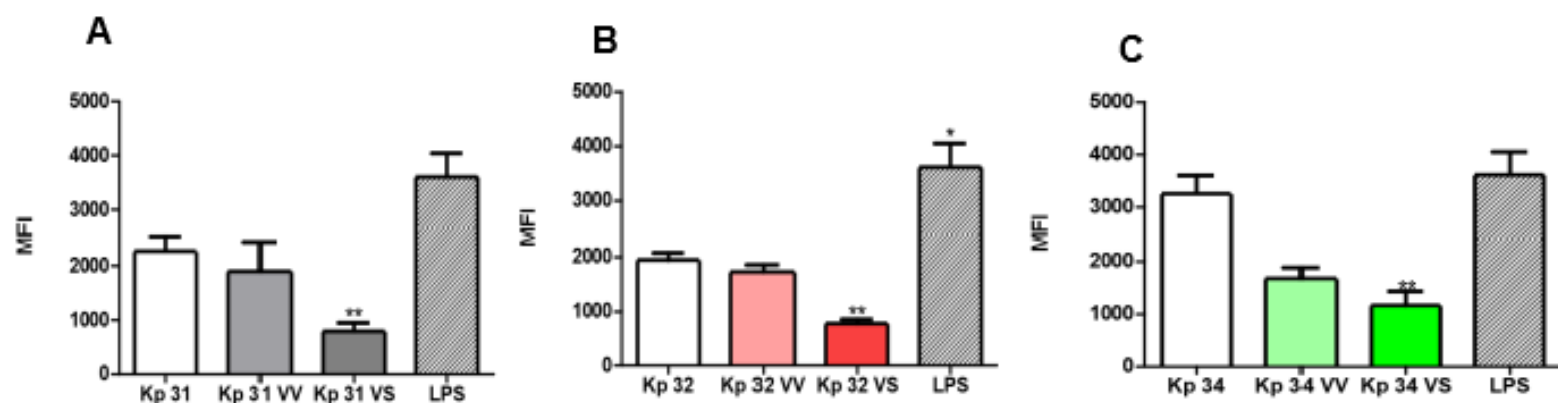


Figura 21 . Quantificação, por citometria de fluxo, da produção de corpúsculos lipídicos por células HEp-2 não transfectadas (Kp 31, Kp 32 e Kp 34) e células transfectadas com o plasmídeo para a superexpressão de PPAR- γ (Kp 31 VS, Kp 32 VS e Kp 34 VS) e com o plasmídeo sem o inserto para a superexpressão (Kp 31 VV, Kp 32 VV, Kp 34 VV). LPS são as células HEp-2 estimuladas com LPS 24 horas antes da marcação das células. O ensaio refere-se a uma triplicata experimental. O canal utilizado foi o FL-1. A análise estatística foi feita por Anova e o asterisco (*) representa $p < 0,05$ em relação ao grupo infectado com os isolados (Kp 31, Kp 32 e Kp 34).

V. Discussão

Neste trabalho visamos realizar a avaliação do papel do PPAR γ na colonização e sobrevivência em células epiteliais da linhagem HEp-2 de isolados hiper mucoides de *K. pneumoniae* causadores de bacteremia. Descrevemos aqui a sobrevivência dos isolados no interior dessas células mediante os mecanismos microbicidas da célula e mediante a presença e ausência de PPAR γ . Também foi realizada a caracterização microbiológica desses isolados a fim de se entender as características desses isolados que permitem com que estes sobrevivam dentro da célula hospedeira.

Caracterização microbiológica

Como parte da caracterização microbiológica os isolados desse estudo foram identificados como pertencentes ao ST11 e portadores de genes de resistência como KPC, VIM, SHV e TEM.

Em um estudo realizado pelo Instituto Oswaldo Cruz (FioCruz) do Rio de Janeiro para a determinação do MLST de 113 isolados de *K. pneumoniae* portadoras de KPC provenientes de vários estados do Brasil mostrou que a presença de *K. pneumoniae* portadoras de KPC é frequente no Distrito Federal visto que 34% dos isolados eram provenientes daqui. Após a realização do MLST, também foi observado que a maior parte dos isolados do DF pertencia ao ST11 seguido pelo ST340. Além da prevalência na região Centro-Oeste, esse ST também se mostrou prevalente no Nordeste e comparando-se entre todos os estados foi um dos três STs mais prevalentes (Pereira *et al.*, 2012).

Por todo o mundo, o ST258 é o clone principal que contribui para a disseminação de *K. pneumoniae* portadoras de KPC. É o que se observa na Polônia (Baraniak *et al.*, 2009), Noruega (Samuelsen *et al.*, 2009), Suécia (Samuelsen *et al.*, 2009), Grécia (Giakkoupi *et al.*, 2011), Israel (Chmelnitsky *et al.*, 2009), Finlândia (Osterblad *et al.*, 2009), Itália (Richter *et al.*, 2012), Alemanha (Wendt *et al.*, 2010), Dinamarca (Hammerum *et al.*, 2010), Hungria (Tòth *et al.*, 2010) e Estados Unidos (Kitchel *et al.*, 2009). Contudo, o ST11 é uma variante *single-locus* do ST258 e tem sido observado como o principal clone dentre as *K. pneumoniae* portadoras de KPC na Ásia, principalmente na China (Yang *et al.*, 2013) tendo sido observado em vários outros países da América Latina (Munoz-Price *et al.*, 2013) e Tailândia (Netikul *et al.*, 2014). Os dois ST pertencem ao mesmo complexo clonal CC258 juntamente com outros 5 clones (ST270, ST340, ST379, ST407 e ST418). Dessa forma, o ST11 se mostra também como um clone dominante de *K. pneumoniae* portadores de KPC.

Tanto o clone ST258 quanto o ST11 são considerados clones de alto risco internacional, isso significa que estes são clones com uma distribuição global e que demonstram uma capacidade

superior de colonizar, disseminar e persistir em uma variedade de nichos (Baquero *et al.*, 2013). Esses clones adquiriram traços que aumentaram sua patogenicidade e habilidades de sobrevivência juntamente com a aquisição de mecanismos de resistência antimicrobiana (Pitout *et al.*, 2015).

A capacidade de resistência aos efeitos microbicidas do soro é um dos mecanismos obtidos por esses clones que os tornam altamente capazes de colonização e se disseminar.

Os isolados desse estudo mostraram capacidade de sobreviver e se multiplicar em sangue total e em soro por 30 minutos, sendo a Kp 31 o único isolado que continuou sua multiplicação no sangue após 30 minutos até o tempo de 120 minutos e em soro. Os outros dois isolados (Kp32 e Kp34) mantiveram o comportamento de multiplicação até o tempo de 120 minutos. Já se tem descrito em estudos realizados por Shah *et al.* (2017) que cepas hvKp demonstram resistência ou uma sensibilidade intermediária aos efeitos bactericidas do soro humano quando comparadas as cepas cKp. Além disto, os autores também notaram que cepas hvKp eram mais prováveis de produzir um biofilme moderado ou forte em comparação com cKp. Em nosso trabalho, observamos que nossos isolados também mostraram resistência em soro, sendo capazes não apenas de sobreviver como de se multiplicar. Os isolados também demonstraram capacidade de produzir forte biofilme, estando conforme o observado em estudos anteriores (Shah *et al.*, 2017). Estudos sugerem que a resistência ao soro seja promovida pelo antígeno O do LPS ou pela cápsula polissacarídica (Tomas *et al.*, 1986). Merino *et al* em 1992 também sugere que a deposição do complemento C3b ocorre muito distante da membrana nessas linhagens de *K. pneumoniae* que apresentam resistência ao soro e, por esse motivo, C5b-C9 MAC falhariam em se formar. Contudo, esse mecanismo ainda não explicaria completamente todos os casos de *K. pneumoniae* resistentes a atividade microbicida do soro (DeLeo *et al.*, 2017).

Quando se trata de *K. pneumoniae* uma das preocupações mais frequentes é a resistência a antibióticos, principalmente aos carbapenêmicos e agora mais recentemente a opções terapêuticas como a colistina. Os isolados desse trabalho apresentam-se resistentes aos carbapenêmicos, quinolonas e beta-lactâmicos, mostrando-se sensíveis apenas aos

aminoglicosídeos. Quando a bactéria apresenta esse tipo de resistência, o tratamento torna-se bastante difícil, contudo, estudos já demonstram alternativas para um possível tratamento. É o que ocorre em um relato de caso de uma bacteremia causado por *K. pneumoniae* portadora de KPC, PDR (pan-resistente), resistente a colistina feito por Oliva *et al* em 2015. Esse estudo mostra sucesso no tratamento dessa infecção utilizando uma nova abordagem terapêutica em que utiliza-se colistina mais uma dupla de antibióticos carbapenêmicos, meropenem e ertapenem. A colistina teria o papel de provocar uma interrupção na membrana celular externa da bactéria permitindo com que os outros dois antibióticos atinjam concentrações adequadas no interior da célula. Mais precisamente, o ertapenem se ligaria as enzimas hidrolíticas funcionando como um inibidor suicida permitindo assim com que o meropenem exerça sua atividade bactericida. Esse regime terapêutico de combinação de antibióticos já tem sido utilizado e descrito na literatura para o tratamento de infecções por *K. pneumoniae* portadoras de KPC (Oliva *et al.* 2014; Tascini *et al.*, 2013). Como os estudos citados se assemelham ao caso do paciente do qual os isolados utilizados nesse trabalho foram obtidos, essa seria uma solução terapêutica passível de ser estudada e possivelmente empregada em casos como esses.

Sobrevivência em células epiteliais e citotoxicidade celular

K. pneumoniae é um patógeno extracelular capaz de ser internalizado por células não fagocíticas. Estudos mostram que a presença de cápsula é um fator que dificulta essa internalização sendo as variantes sem cápsula internalizadas em um número maior que as variantes capsuladas (Sahly *et al.*, 2000). A cápsula também seria um fator que dificultaria essa adesão possivelmente recobrando as adesinas e impedindo que estas se ligassem aos seus receptores nas células epiteliais. Outra possibilidade seria que a cápsula impediria a montagem de fímbrias do tipo 1 na superfície bacteriana (Matatov *et al.*, 1999) e uma terceira hipótese para a baixa internalização de cepas portadoras de cápsula seria que as células epiteliais diferentemente das células fagocíticas não expressam receptores de manose que reconhecem os antígenos capsulares (Ofek *et al.*, 1995).

Em nosso estudo, observou-se que os isolados de *K. pneumoniae* apresentavam um efeito citotóxico sobre as células, o que está de acordo com a literatura visto que estudos realizados por Cano *et al* em 2009 mostraram que estirpes altamente capsuladas de *K. pneumoniae* promoviam efeito citotóxico em células epiteliais de pulmão (A549). O efeito citotóxico começou a ser observado usando-se um MOI de 1:1000 em um período de infecção com duração de 5 horas. Em nosso trabalho, foi utilizado o mesmo MOI porém, o período de infecção foi de apenas 2 horas e o efeito citotóxico foi observado 6 horas após o término da infecção. Em células infectadas com Kp 34 o efeito citotóxico foi observado após 3 horas da infecção. Nesse mesmo estudo de Cano *et al* eles comprovaram que a infecção nas mesmas condições por linhagens sem cápsula não eram capazes de promover o mesmo efeito citotóxico na célula mesmo a taxa de adesão das cepas sem cápsula sendo notadamente maior do que com as cepas sem cápsula.

Especula-se no estudo de Cano *et al* que o efeito citotóxico causado por *K. pneumoniae* em células epiteliais de pulmão possa ser promovido pela produção de vesículas de membrana externa que entregariam toxinas às células já que não se tem nessa bactéria registros da presença de sistemas de secreção, principalmente do tipo III (T3SS). Esse sistema de secreção é utilizado por *Pseudomonas aeruginosa* (Shafikhani *et al.*, 2008), *E. coli* (Shifrin *et al.*, 2002), e *Bordetella bronchiseptica* (Kuwaie *et al.*, 2003) e é notadamente responsável por causar citotoxicidade em células eucarióticas por meio da injeção de moléculas efetoras que causam o efeito citotóxico. Embora de fundamental importância, a cápsula não é suficiente para promover, sozinha, o efeito citotóxico nas células epiteliais, indicando dessa forma que é necessária uma associação entre cápsula e outros fatores de virulência de *K. pneumoniae* para causar citotoxicidade em células eucarióticas.

Em outros estudos utilizando células HepG2 infectadas com *K. pneumoniae* isolada de um paciente com abscesso hepático observou-se efeito citotóxico acentuado 8 e 12 horas após a infecção. No período de 12 horas, aproximadamente 10% das células infectadas estavam viáveis (Yang *et al.*,

2012). Células infectadas por Kp 34, no período de 3 horas pós infecção, já apresentava menos de 20% viabilidade. Após 6 horas da infecção a viabilidade celular foi reduzida a 10%.

O estudo realizado por Leone *et al* em 2015, que teve por objetivo verificar a capacidade de linhagens de *K. pneumoniae*, *K. pneumoniae*-KPC (Kp-KPC) e *K. pneumoniae*-KPC - resistentes a colistina (Kp-KPC-Col-R) em invadir células epiteliais *in vitro* constataram que as duas últimas apresentam maior capacidade de invadir células epiteliais do que as linhagens sensíveis. Os experimentos utilizaram células de epitélio de intestino (Caco2), pele (HaCaT), pulmão (NCI-H460) e rim (786-0) e observou-se que Kp- KPC e Kp-KPC-Col-R são mais internalizadas por células epiteliais do que *K. pneumoniae*. Ademais, Kp-KPC-Col-R apresentaram maior capacidade de internalização por essas células do que Kp-KPC. No mesmo estudo, também observou-se que a viabilidade de células infectadas por Kp-KPC e Kp-KPC-Col-R era significativamente menor quando comparada as células infectadas por *K. pneumoniae*. Ainda verificou-se que a morte das células Caco2 ocorria por necrose. Já se tem descrito na literatura uma associação entre resistência a antibiótico e adesão as células epiteliais do intestino (Di Martino *et al.*, 1997), mas não se sabe ao certo qual seria a possível associação entre resistência a colistina e aumento da capacidade de internalização por células epiteliais, especula-se que as alterações promovidas na membrana que levam a resistência a colistina também ofereceriam alguma vantagem na capacidade de internalização e infecção das células (Leone *et al.*, 2015).

O papel do PPAR- γ na sobrevivência intracelular dos isolados HvKP

Em nossos estudos podemos observar que a expressão de PPAR- γ aumentou conforme o tempo pós infecção, sendo observado principalmente nos períodos de 24 e 48 horas após a infecção. E notamos também que na presença de PPAR- γ , as bactérias eram capazes de sobreviver em maior quantidade no interior das células do que quando este fator estava inibido por GW9662. Esse é um resultado também observado em outros estudos.

Sabe-se que PPAR- γ é *up-regulated* durante infecção de macrófagos com espécies de *Mycobacterium* (Stavrum *et al.*, 2011) ou durante a infecção de células epiteliais com espécies de *Salmonella* (Kelly *et al.*, 2004). Também foi observado em estudos de Abdullah *et al* em 2012 um aumento da expressão de PPAR- γ em macrófagos infectados com *Listeria monocytogenes*. Nesse mesmo estudo também observou-se que na ausência de PPAR- γ os macrófagos conseguiam promover maior *clearance* bacteriano do que os macrófagos com a presença de PPAR- γ . Nos estudos de Almeida *et al* em 2009, também verificou-se que quando PPAR- γ estava inibido em macrófagos aumentava-se a capacidade de eliminação de *Mycobacterium* dessas células. Devido ao papel anti-inflamatório do PPAR- γ tal aumento na expressão de PPAR γ em macrófagos após infecção bacteriana pode dar origem à evasão de respostas imunes inatas que atuam em diversos mecanismos efectores imunes (Glass *et al.*, 2008). Essas propriedades anti-inflamatórias do PPAR- γ teriam então uma função protetora para esses patógenos, permitindo que estes sobrevivessem no interior das células na presença desse fator. Neste estudo de Abdullah também utilizaram camundongos transgênicos em que faltava PPAR- γ nas células mielóides desses animais e observou-se também que os animais transgênicos em que faltava PPAR- γ nas células mielóides eram mais resistentes à infecção com *L. monocytogenes*, sustentando a hipótese de que a expressão de PPAR γ pode ajudar a bactéria a evadir as primeiras fases de imunidade inata.

PPAR- γ e biogênese de corpúsculos lipídicos

Nos experimentos de citometria de fluxo realizados para verificar a produção de corpúsculos lipídicos (CLs) em células HEP-2 infectadas pelos isolados, observou-se a redução dos mesmos quando as células estavam transfectadas com o plasmídeo com inserto para a superexpressão de PPAR γ .

Isso poderia sugerir que os isolados bacterianos poderiam estar utilizando os corpúsculos lipídicos para sua sobrevivência e proliferação no interior das células. Esse mecanismo de uso dos

corpúsculos lipídicos de células já foi descrito para outras bactérias, como *Mycobacterium* spp e poderia ser o que está acontecendo também para os nossos isolados.

A biogênese de CLs em células infectadas por *Mycobacterium leprae* apresenta um papel importante na patogênese dessa bactéria facilitando a persistência desse patógeno nas células por pelo menos dois mecanismos: primeiramente durante a adesão e internalização de *M. leprae*, os corpúsculos lipídicos são prontamente recrutados e acumulados em fagossomos contendo bactérias (Mattos *et al.* 2011). O recrutamento desses corpúsculos lipídicos provavelmente constitui uma estratégia intracelular de *M. leprae* para adquirir lipídios das células hospedeiras como fonte nutricional e / ou abrigo para promover a sobrevivência bacteriana. Em segundo lugar, a acumulação de lipídios derivados do hospedeiro em células infectadas favorece a geração de uma resposta imune inata que pode contribuir para um ambiente favorável para a proliferação de *M. leprae* em pele e nervos lepromatosos. Estudos mostram que quando a biogênese de CLs é impedida, a célula infectada consegue matar as bactérias intracelulares corroborando a teoria de que os corpúsculos seriam utilizados para permanecer na célula mantendo a infecção (Mattos *et al.* 2011).

Existem imagens também que mostram que os corpúsculos lipídicos em células infectadas mantêm-se próximos, aderidos ou até mesmo no interior dos vacúolos contendo as bactérias. Observou-se *in vitro*, em células de Schwann, um sofisticado mecanismo de realocização de proteínas responsáveis pela diferenciação adiposa promovida por rearranjos no citoesqueleto da célula em células infectadas por *M. leprae*. Quando esses rearranjos no citoesqueleto eram impedidos e conseqüentemente impedia-se a movimentação dos corpúsculos lipídicos também, verificou-se uma redução na sobrevivência das bactérias nas células infectadas (Mattos *et al.* 2011a). Esses dados reforçam sugerem que *M. leprae* é capaz de interceptar as vesículas exocíticas da via secretória e reforçam a teoria do uso dos corpúsculos lipídicos como uma fonte de nutrientes para as bactérias. Microscopias eletrônicas também sugerem a presença do conteúdo dos corpúsculos lipídicos em vacúolos no interior de bactérias (D'Avila *et al.* 2006). Estudos mostram que a beta oxidação de ácidos graxos é a via dominante de obtenção de energia durante a infecção. A

utilização e modulação das vias lipídicas representam um mecanismo pelo qual as bactérias são capazes de causar e manter a infecção bacteriana (Marques *et al.* 2008).

Outros estudos ainda associam a formação de corpúsculos lipídicos com a capacidade de fagossomos contendo *Mycobacterium tuberculosis* de permanecerem em estado de latência por períodos prolongados no hospedeiro e evitar drogas anti-micobacterianas (Peyron *et al.* 2008) e (Daniel *et al.* 2011).

Estudos mostram que os CLs são organelas chave relacionadas à inflamação com papéis principais na produção de eicosanóides (Bozza *et al.*, 2011). A síntese de eicosanóides pode ocorrer em locais de corpúsculos lipídicos recém-formados durante infecções micobacterianas (D'Avila *et al.* 2006). Essa síntese de eicosanóides nesses sítios, principalmente de prostaglandinas, pode funcionar como moléculas pró-inflamatórias ou inibidores potentes de vários aspectos da resposta imune inata e adaptativa (Weissmann *et al.*, 1993; Dooper *et al.* 2002). Quando funcionando como moléculas pró-inflamatórias os eicosanóides promoveriam necrose celular que permitiria que as bactérias se disseminassem e infectassem novas células (Chen *et al.* 2008) e funcionando como inibidores, atuariam inibindo a resposta imune permitindo assim o crescimento e manutenção da infecção no hospedeiro (D'Avila *et al.* 2006).

PPAR- γ é um regulador negativo da expressão de genes relacionados à inflamação e da ativação de macrófagos (Jiang *et al.*, 1998) e (Ricote *et al.*, 1998). PPAR- γ exerce seu papel anti-inflamatório por meio da trans repressão e interação negativa com fatores de transcrição pró-inflamatórios como NF κ B ou pela estabilização de complexos co-repressores como SMRT ou NCoR em promotores dos genes alvo (Jiang *et al.*, 1998). Dentre os genes alvo da ação inibidora do PPAR- γ estão citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias.

PPAR- γ é conhecidamente *up-regulated* durante a infecção de macrófagos por *Mycobacterium spp* (Stavrum *et al.*, 2011) ou durante a infecção de células epiteliais por *Salmonella spp* (Kelly *et al.*, 2004). Esse aumento também foi notado 30 minutos após a infecção de monócitos humanos com *Listeria monocytogenes* em um estudo de Abdullah em 2012. Nesse

estudo também foi notado que a perda de PPAR- γ em células mielóides resultam em aumento da defesa imune inata contra infecção por *L. monocytogenes* tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Esta resistência aumentada contra a infecção na ausência de PPAR- γ foi caracterizada por níveis aumentados de fatores bactericidas e citocinas inflamatórias: ROS, NO, IFN γ TNF IL-6 e IL-12. Esses dados sugerem que a expressão de PPAR- γ seria capaz de auxiliar as bactérias a se evadir das fases iniciais da resposta imune inata. A falta de PPAR γ em células mieloides também aumentou a expressão de iNOS e produção de NO listeriocidal, o que provavelmente ocorreu indiretamente através da produção aumentada de mediadores pró-inflamatórios, porque iNOS não pertence aos genes regulados por PPAR γ (Lefterova *et al.*, 2010). Esse mecanismo citado poderia ser uma hipótese para explicar o observado em nossos experimentos, em que quando havia a presença de PPAR γ as bactérias no interior das células são capazes de sobreviver mais quando comparado aos experimentos em que PPAR γ está inibido por GW9662.

Mecanismos microbicidas da célula

O óxido nítrico (NO) é um mediador biológico altamente reativo e penetrante produzido por células de mamíferos, e suas ações fisiológicas são amplas. Vários agentes são capazes de induzir a expressão de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) entre eles estão várias citocinas como IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , IL-6 e endotoxinas como LPS (Vera *et al.*, 1995). Já se tem descrito que o PPAR γ é capaz de auxiliar a sobrevivência de patógenos intracelulares por meio da inibição de citocinas pró-inflamatórias e por meio da inibição de mecanismos microbicidas como a produção de NO (Almeida *et al.*, 2012). Estudos com *M. tuberculosis* em macrófagos mostraram que quando ocorria o silenciamento de PPAR γ nos macrófagos infectados ocorria um significativo aumento na expressão de iNOS e consequente aumento da produção de NO nas células (Mahajan *et al.*, 2012). PPAR γ inibe essa expressão atuando contra os fatores de transcrição AP-1, STAT e NF- κ B. Em nossos experimentos verificamos que PPAR γ não parece atuar como um inibidor de iNOS visto que ocorre um aumento na produção de NO quando as células são infectadas pelos isolados e que essa

produção tende a aumentar conforme aumenta o tempo pós infecção. Nos experimentos em que se mediu a produção de NO em células infectadas na presença e na ausência do inibidor de PPAR γ (GW9962), notou-se que quando havia a inibição do PPAR γ a quantidade de NO se elevava sugerindo uma possível inibição parcial de iNOS. Contudo, mesmo com o aumento na produção de NO, não ocorre a morte das bactérias que estão dentro da célula.

Estudos recentes mostram que algumas bactérias são capazes de *up-regulate* sequestradores de NO e/ou alterar a respiração em resposta ao NO endógeno. Um exemplo é a desintoxicação de NO por flavohemoglobina, uma proteína que é regulada em *E. coli* em resposta ao NO produzido em macrófagos (Poole et al., 2005). Os tióis endógenos, como o mirtotiol produzido por micobactérias, também demonstraram reduzir a toxicidade do NO e outras espécies de oxigênio (Miller et al., 2007). Um estudo realizado com *K. pneumoniae* mostrou que este patógeno é bastante resistente aos efeitos do NO. No estudo *K. pneumoniae* mostrou-se bastante insensível a concentrações fisiológicas de NO (até 6 μ M) com a manutenção do seu crescimento e divisão nessas concentrações e apenas com uma quantidade maior de NO (30 μ M) que foi possível observar um efeito bacteriostático exercido pelo NO no crescimento bacteriano (Workman et al., 2017).

Estudos confirmam que variantes hvKp quando comparadas as cKp são capazes de resistir a morte intracelular pelos mecanismos bactericidas de neutrófilos (Wang et al., em 2017)

As espécies reativas de oxigênio (ROS) também são inibidas pelo PPAR γ conforme descrito na literatura. Contudo, ainda não foi realizado o experimento para quantificar ROS com a inibição de PPAR γ . Esse experimento nos permitirá observar se esta inibição está ocorrendo em nosso estudo também (Almeida et al., 2012).

VI. Conclusões

Em conjunto os dados demonstram que:

- * Os três isolados são geneticamente idênticos, multirresistentes, KPC e pertencentes ao ST11.
- * Apresentam produção forte de biofilme em superfícies abióticas bem como a capacidade de sobreviver em sangue por 30 minutos.
- * As células infectadas com os isolados hipermucoides apresentam expressão de PPAR- γ 24 e 48 horas após a infecção.
- * Os isolados são capazes de sobreviver no interior de células Hep-2 3,6 e 24 horas após a infecção. Também apresentam maior capacidade de sobrevivência nas células quando PPAR- γ está presente, quando este é inibido usando o inibidor GW9662 as bactérias apresentam menor capacidade de sobrevivência no interior das células.
- * Os isolados mostram-se citotóxicos para as células diminuindo a viabilidade celular nos tempos de 3 e 6 horas após a infecção, contudo, 24 horas após a infecção as células recuperam sua viabilidade.
- * A produção de óxido nítrico ocorre mais acentuadamente 24 e 48 horas pós infecção com os isolados. Também ocorre um aumento na produção de NO quando PPAR- γ encontra-se inibido por GW9662. Os isolados mostram-se resistentes aos efeitos microbicidas da célula

VII. Referências bibliográficas

ABDULLAH, Zeinab et al. Lack of PPAR γ in myeloid cells confers resistance to *Listeria monocytogenes* infection. **PloS one**, v. 7, n. 5, p. e37349, 2012

ACHOUITI, Ahmed et al. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) serves a protective role during *Klebsiella pneumoniae*-induced pneumonia. **PloS one**, v. 11, n. 1, p. e0141000, 2016.

ALBERTI, S. et al. C1q binding and activation of the complement classical pathway by *Klebsiella pneumoniae* outer membrane proteins. **Infection and immunity**, v. 61, n. 3, p. 852-860, 1993.

ALMEIDA, Patrícia E. et al. *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin infection induces TLR2-dependent peroxisome proliferator-activated receptor γ expression and activation: functions in inflammation, lipid metabolism, and pathogenesis. *The Journal of immunology*, v. 183, n. 2, p. 1337-1345, 2009.

ALMEIDA, Patricia E. et al. PPAR γ expression and function in mycobacterial infection: roles in lipid metabolism, immunity, and bacterial killing. **PPAR research**, v. 2012, 2012.

ÁLVAREZ Dolores et al. Capsular polysaccharide is a major complement resistance factor in lipopolysaccharide O side chain-deficient *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. **Infection and immunity**, v. 68, n. 2, p. 953-955, 2000.

AMRAIE, Hadis et al. Prevalence assessment of magA gene and antimicrobial susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* isolated from clinical specimens in Shahrekord, Iran. **Iranian journal of microbiology**, v. 6, n. 5, p. 311, 2014.

ANDERL, Jeff N. et al. Role of nutrient limitation and stationary-phase existence in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 47, n. 4, p. 1251-1256, 2003.

ARONOFF, David M. et al. Stimulatory effects of peroxisome proliferator-activated receptor- γ on Fc γ receptor-mediated phagocytosis by alveolar macrophages. **PPAR research**, v. 2007, 2007.

ASADA, Kazuhiro et al. Antiinflammatory roles of peroxisome proliferator-activated receptor γ in human alveolar macrophages. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 169, n. 2, p. 195-200, 2004.

ATHAMNA, A. B. E. D. et al. Lectinophagocytosis of encapsulated *Klebsiella pneumoniae* mediated by surface lectins of guinea pig alveolar macrophages and human monocyte-derived macrophages. **Infection and immunity**, v. 59, n. 5, p. 1673-1682, 1991.

ATHAMNA, A. B. E. D.; Ofek, Itzhak. Enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of attachment and ingestion stages of bacterial phagocytosis. **Journal of clinical microbiology**, v. 26, n. 1, p. 62-66, 1988.

BACH, Sandrine; DE ALMEIDA, Alzira; CARNIEL, Elisabeth. The *Yersinia* high-pathogenicity island is present in different members of the family Enterobacteriaceae. **FEMS microbiology letters**, v. 183, n. 2, p. 289-294, 2000.

BACHMAN, Michael A. et al. *Klebsiella pneumoniae* yersiniabactin promotes respiratory tract infection through evasion of lipocalin 2. **Infection and immunity**, v. 79, n. 8, p. 3309-3316, 2011.

BACHMAN, Michael A.; MILLER, Virginia L.; WEISER, Jeffrey N. Mucosal lipocalin 2 has pro-inflammatory and iron-sequestering effects in response to bacterial enterobactin. **PLoS pathogens**, v. 5, n. 10, p. e1000622, 2009.

BAQUERO, Fernando; TEDIM, Ana-Sofia P.; COQUE, Teresa M. Antibiotic resistance shaping multi-level population biology of bacteria. **Frontiers in microbiology**, v. 4, p. 15, 2013.

BARANIAK, Anna et al. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* ST258 with KPC-2 in Poland. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 10, p. 4565-4567, 2009.

BARRAL, Duarte C.; BRENNER, Michael B. CD1 antigen presentation: how it works. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 12, p. 929, 2007.

BECEIRO, Alejandro; TOMÁS, María; BOU, Germán. Antimicrobial resistance and virulence: a successful or deleterious association in the bacterial world?. **Clinical microbiology reviews**, v. 26, n. 2, p. 185-230, 2013.

BERGER, Joel; MOLLER, David E. The mechanisms of action of PPARs. **Annual review of medicine**, v. 53, n. 1, p. 409-435, 2002.

BIRNBAUM, Jerome et al. Carbapenems, a new class of beta-lactam antibiotics: Discovery and development of imipenem/cilastatin. **The American journal of medicine**, v. 78, n. 6, p. 3-21, 1985.

BODLESs, Angela M. et al. Pioglitazone induces apoptosis of macrophages in human adipose tissue. **Journal of lipid research**, v. 47, n. 9, p. 2080-2088, 2006

BOZZA, Patricia T. et al. Lipid body function in eicosanoid synthesis: an update. **Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids (PLEFA)**, v. 85, n. 5, p. 205-213, 2011.

BRADFORD, Patricia A. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. **Clinical microbiology reviews**, v. 14, n. 4, p. 933-951, 2001

BRANGER, Judith et al. Role of Toll-like receptor 4 in gram-positive and gram-negative pneumonia in mice. **Infection and immunity**, v. 72, n. 2, p. 788-794, 2004.

BULLEN, J. J.; ROGERS, Henry J.; GRIFFITHS, E. Iron binding proteins and infection. **British journal of haematology**, v. 23, n. 4, p. 389-392, 1972.

BUSH, Karen; JACOBY, George A. Updated functional classification of β -lactamases. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 969-976, 2010.

CAI, Shanshan et al. Both TRIF-and MyD88-dependent signaling contribute to host defense against pulmonary Klebsiella infection. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 10, p. 6629-6638, 2009

CAMPOS, Miguel A. et al. Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. **Infection and immunity**, v. 72, n. 12, p. 7107-7114, 2004.

CANO, Victoria et al. Klebsiella pneumoniae triggers a cytotoxic effect on airway epithelial cells. **BMC microbiology**, v. 9, n. 1, p. 156, 2009.

CHAN, Chia-Han et al. Identification of protein domains on major pilin MrkA that affects the mechanical properties of Klebsiella pneumoniae type 3 fimbriae. **Langmuir**, v. 28, n. 19, p. 7428-7435, 2012.

CHEN, Minjian et al. Lipid mediators in innate immunity against tuberculosis: opposing roles of PGE2 and LXA4 in the induction of macrophage death. **Journal of Experimental Medicine**, v. 205, n. 12, p. 2791-2801, 2008.

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.

CHMELNITSKY, Inna et al. Detection of aac (6')-Ib-cr in KPC-producing Klebsiella pneumoniae isolates from Tel Aviv, Israel. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 64, n. 4, p. 718-722, 2009.

CHOU, Huei-Chi et al. Isolation of a chromosomal region of Klebsiella pneumoniae associated with allantoin metabolism and liver infection. **Infection and immunity**, v. 72, n. 7, p. 3783-3792, 2004.

CLARK, Robert B. The role of PPARs in inflammation and immunity. **Journal of leukocyte biology**, v. 71, n. 3, p. 388-400, 2002.

CLEGG, Steven; MURPHY, Caitlin N. Epidemiology and Virulence of Klebsiella pneumoniae. **Microbiology spectrum**, v. 4, n. 1, 2016.

CLEMENTS, Abigail et al. Secondary acylation of Klebsiella pneumoniae lipopolysaccharide contributes to sensitivity to antibacterial peptides. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 21, p. 15569-15577, 2007.

CORTÉS, Guadalupe et al. Molecular analysis of the contribution of the capsular polysaccharide and the lipopolysaccharide O side chain to the virulence of Klebsiella pneumoniae in a murine model of pneumonia. **Infection and immunity**, v. 70, n. 5, p. 2583-2590, 2002.

COUDEYRAS, Sophie et al. A tripartite efflux pump involved in gastrointestinal colonization by *Klebsiella pneumoniae* confers a tolerance response to inorganic acid. **Infection and immunity**, v. 76, n. 10, p. 4633-4641, 2008.

COWLAND, Jack B.; BORREGAARD, Niels. Molecular characterization and pattern of tissue expression of the gene for neutrophil gelatinase-associated lipocalin from humans. **Genomics**, v. 45, n. 1, p. 17-23, 1997.

D'AVILA, Heloisa et al. *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin induces TLR2-mediated formation of lipid bodies: intracellular domains for eicosanoid synthesis in vivo. **The Journal of Immunology**, v. 176, n. 5, p. 3087-3097, 2006.

DALLENNE, Caroline et al. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in Enterobacteriaceae. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 3, p. 490-495, 2010.

DANIEL, Jaiyanth et al. *Mycobacterium tuberculosis* uses host triacylglycerol to accumulate lipid droplets and acquires a dormancy-like phenotype in lipid-loaded macrophages. **PLoS pathogens**, v. 7, n. 6, p. e1002093, 2011.

DARFEUILLE-MICHAUD, Arlette et al. R-plasmid-encoded adhesive factor in *Klebsiella pneumoniae* strains responsible for human nosocomial infections. **Infection and immunity**, v. 60, n. 1, p. 44-55, 1992.

DATTA, Naomi et al. Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in Enterobacteriaceae. **Nature**, v. 208, p. 239-41, 1965.

DAVIES, Julian. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. **Science**, v. 264, n. 5157, p. 375-382, 1994.

DE VERA, M. E.; GELLER, D. A.; BILLIAR, T. R. Hepatic inducible nitric oxide synthase: regulation and function. 1995.

DEFRONZO, R. A. Insulin resistance, lipotoxicity, type 2 diabetes and atherosclerosis: the missing links. The Claude Bernard Lecture 2009. **Diabetologia**, v. 53, n. 7, p. 1270-1287, 2010.

DELCOUR, Anne H. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1794, n. 5, p. 808-816, 2009.

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.

DI MARTINO, Patrick et al. A new fimbrial antigen harbored by CAZ-5/SHV-4-producing *Klebsiella pneumoniae* strains involved in nosocomial infections. **Infection and immunity**, v. 64, n. 6, p. 2266-2273, 1996.

DI MARTINO, Patrick et al. Relationship between adhesion to intestinal Caco-2 cells and multidrug resistance in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. **Journal of clinical microbiology**, v. 35, n. 6, p. 1499-1503, 1997.

DOMENICO, Philip et al. Polysaccharide capsule-mediated resistance to opsonophagocytosis in *Klebsiella pneumoniae*. **Infection and immunity**, v. 62, n. 10, p. 4495-4499, 1994.

DOOPER, Maaïke MBW et al. The modulatory effects of prostaglandin-E on cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells are independent of the prostaglandin subtype. **Immunology**, v. 107, n. 1, p. 152-159, 2002.

DOYLE, Diana et al. Laboratory detection of Enterobacteriaceae that produce carbapenemases. **Journal of clinical microbiology**, v. 50, n. 12, p. 3877-3880, 2012.

EL FERTAS-AISSANIertas-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.

EVRARD, B. et al. Roles of capsule and lipopolysaccharide O antigen in interactions of human monocyte-derived dendritic cells and *Klebsiella pneumoniae*. **Infection and immunity**, v. 78, n. 1, p. 210-219, 2010.

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

FAVRE-BONTE, Sabine; Darfeuille-Michaud, Arlette; Forestier, Christiane. Aggregative adherence of *Klebsiella pneumoniae* to human intestine-407 cells. **Infection and immunity**, v. 63, n. 4, p. 1318-1328, 1995.

FAVRE-BONTE, Sabine; Joly, Bernard; Forestier, Christiane. Consequences of reduction of *Klebsiella pneumoniae* capsule expression on interactions of this bacterium with epithelial cells. **Infection and immunity**, v. 67, n. 2, p. 554-561, 1999.

FEIGE, Jérôme N. et al. From molecular action to physiological outputs: peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions. **Progress in lipid research**, v. 45, n. 2, p. 120-159, 2006.

FISCHBACH, Michael A. et al. In vitro characterization of IroB, a pathogen-associated C-glycosyltransferase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 3, p. 571-576, 2005.

FUNG, Chang-Phone et al. *Klebsiella pneumoniae* in gastrointestinal tract and pyogenic liver abscess. **Emerging infectious diseases**, v. 18, n. 8, p. 1322, 2012.

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

GARCÍA-SUREDA, Laura et al. OmpK26, a novel porin associated with carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 10, p. 4742-4747, 2011.

GIAKKOUI, Panagiota et al. An update of the evolving epidemic of bla KPC-2-carrying *Klebsiella pneumoniae* in Greece (2009–10). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 7, p. 1510-1513, 2010. .

GLASS, Christopher K.; OGAWA, Sumito. Combinatorial roles of nuclear receptors in inflammation and immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 1, p. 44, 2006..

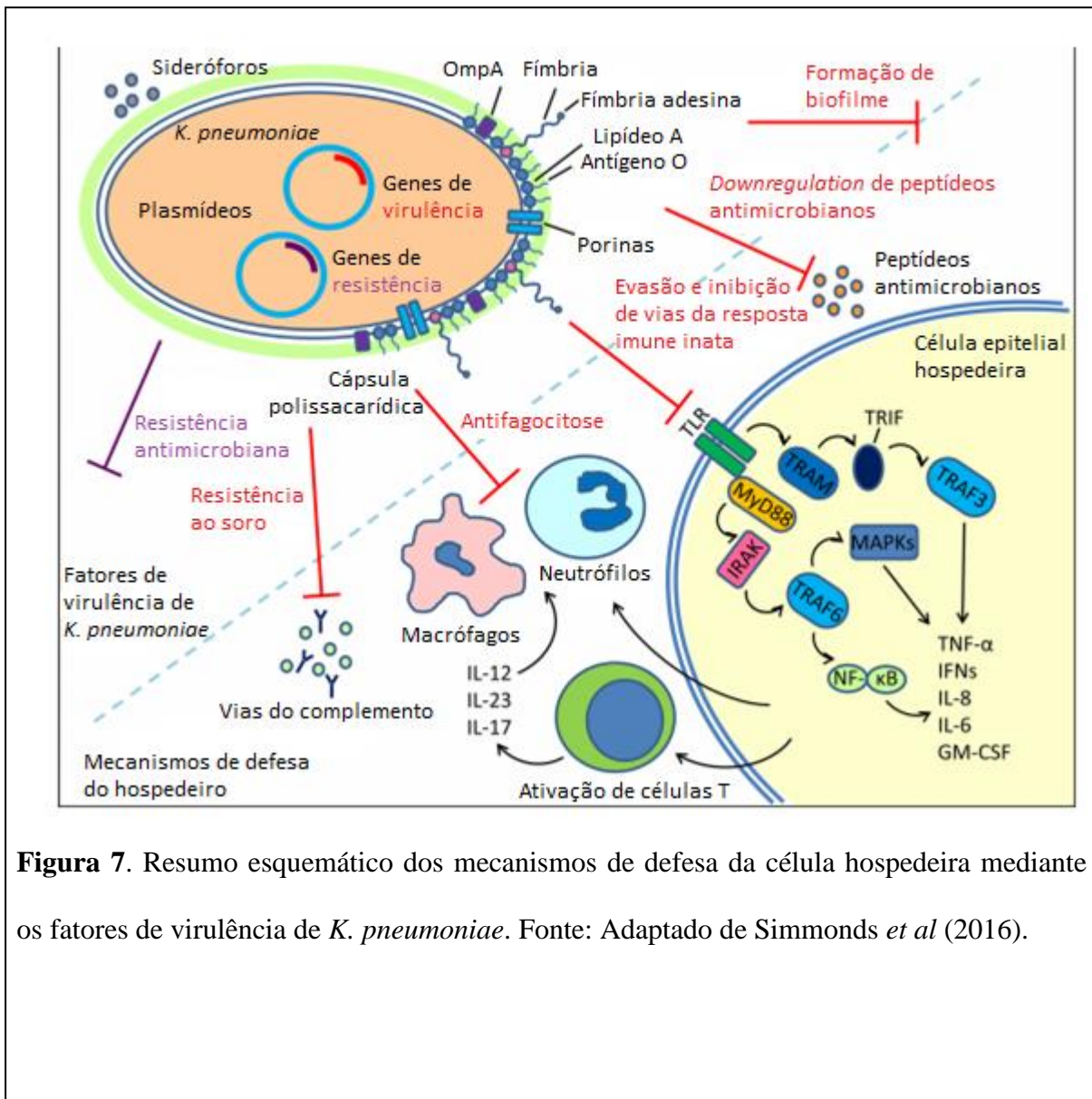


Figura 7. Resumo esquemático dos mecanismos de defesa da célula hospedeira mediante os fatores de virulência de *K. pneumoniae*. Fonte: Adaptado de Simmonds *et al* (2016).

GO
ETZ,
Dav
id H.
et al.
The
neut
roph
il
lipo
cali
n
NG
AL
is a
bact
erio
stati
c
agen
t
that
inter

feres with siderophore-mediated iron acquisition. **Molecular cell**, v. 10, n. 5, p. 1033-1043, 2002.

GOGOLAK, Peter et al. Differentiation of CD1a⁻ and CD1a⁺ monocyte-derived dendritic cells is biased by lipid environment and PPAR γ . **Blood**, v. 109, n. 2, p. 643-652, 2007.

GOMEZ-SIMMONDS, Angela; Uhlemann, Anne-Catrin. Clinical implications of genomic adaptation and evolution of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. **The Journal of infectious diseases**, v. 215, n. suppl_1, p. S18-S27, 2017.

GOREN, Moran G. et al. Transfer of carbapenem-resistant plasmid from *Klebsiella pneumoniae* ST258 to *Escherichia coli* in patient. **Emerging infectious diseases**, v. 16, n. 6, p. 1014, 2010.

HAMMERUM, Anette M. et al. Detection of the first two *Klebsiella pneumoniae* isolates with sequence type 258 producing KPC-2 carbapenemase in Denmark. **International journal of antimicrobial agents**, v. 35, n. 6, p. 610-612, 2010.

HANSEN, Dennis S. et al. *Klebsiella pneumoniae* lipopolysaccharide O typing: revision of prototype strains and O-group distribution among clinical isolates from different sources and countries. **Journal of clinical microbiology**, v. 37, n. 1, p. 56-62, 1999.

HAPPEL, Kyle I. et al. Divergent roles of IL-23 and IL-12 in host defense against *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Experimental Medicine**, v. 202, n. 6, p. 761-769, 2005.

HARDER, Jürgen et al. Isolation and characterization of human β -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 8, p. 5707-5713, 2001.

HENNEQUIN, Claire et al. Antibiotic resistance and plasmid transfer capacity in biofilm formed with a CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* isolate. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 9, p. 2123-2130, 2012.

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

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.

HUANG, Ying-Jung et al. MrkF is a component of type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae*. **Research in microbiology**, v. 160, n. 1, p. 71-79, 2009.

JACOBY, George. β -Lactamase classification and amino acid sequences for TEM, SHV and OXA extended-spectrum and inhibitor resistant enzymes. <http://www.lahey.org/Studies/>, 2012.

JAGNOW, Jennifer; Clegg, Steven. *Klebsiella pneumoniae* MrkD-mediated biofilm formation on extracellular matrix-and collagen-coated surfaces. **Microbiology**, v. 149, n. 9, p. 2397-2405, 2003.

- JANANI, C.; KUMARI, BD Ranjitha. PPAR gamma gene—a review. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, v. 9, n. 1, p. 46-50, 2015.
- JIANG, Chengyu; TING, Adrian T.; SEED, Brian. PPAR- γ agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. **Nature**, v. 391, n. 6662, p. 82, 1998.
- JOHNSON, James R.; Russo, Thomas A. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. **International journal of medical microbiology**, v. 295, n. 6, p. 383-404, 2005.
- JUNG, S. W. et al. Microbiological and clinical characteristics of bacteraemia caused by the hypermucoviscosity phenotype of *Klebsiella pneumoniae* in Korea. **Epidemiology & Infection**, v. 141, n. 2, p. 334-340, 2013.
- KAPLAN, Jennifer M.; Zingarelli, Basilia. Novel therapeutic agents in pediatric sepsis: peroxisome proliferator receptor γ (PPAR γ) agonists. **The open inflammation journal**, v. 4, n. Suppl 1-M14, p. 120, 2011.
- KELLY, Denise et al. Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR- γ and RelA. **Nature immunology**, v. 5, n. 1, p. 104, 2004.
- KELLY, Denise et al. Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR- γ and RelA. **Nature immunology**, v. 5, n. 1, p. 104, 2004
- KITCHEL, Brandon et al. Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United States: clonal expansion of multilocus sequence type 258. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 8, p. 3365-3370, 2009.
- KLEMM, Per; Schembri, Mark A. Fimbrial surface display systems in bacteria: from vaccines to random libraries. **Microbiology**, v. 146, n. 12, p. 3025-3032, 2000.
- KO, Wen-Chien et al. Community-acquired *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: global differences in clinical patterns. **Emerging infectious diseases**, v. 8, n. 2, p. 160, 2002.
- KOTA, Bhavani Prasad; Huang, Tom Hsun-Wei; Roufogalis, Basil D. An overview on biological mechanisms of PPARs. **Pharmacological Research**, v. 51, n. 2, p. 85-94, 2005.

KUWAE, Asaomi et al. BopB is a type III secreted protein in *Bordetella bronchiseptica* and is required for cytotoxicity against cultured mammalian cells. **Cellular microbiology**, v. 5, n. 12, p. 973-983, 2003.

LANDMAN, David et al. Evolution of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, NY. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 60, n. 1, p. 78-82, 2007.

LAWLOR, Matthew S. et al. Identification of *Klebsiella pneumoniae* virulence determinants using an intranasal infection model. **Molecular microbiology**, v. 58, n. 4, p. 1054-1073, 2005.

LAWLOR, Matthew S.; Handley, Scott A.; Miller, Virginia L. Comparison of the host responses to wild-type and *cpsB* mutant *Klebsiella pneumoniae* infections. **Infection and immunity**, v. 74, n. 9, p. 5402-5407, 2006.

LAWLOR, Matthew S.; O'CONNOR, Christopher; MILLER, Virginia L. Yersiniabactin is a virulence factor for *Klebsiella pneumoniae* during pulmonary infection. **Infection and immunity**, v. 75, n. 3, p. 1463-1472, 2007.

LAZĂR, Veronica; CHIFIRIUC, Mariana Carmen. Medical significance and new therapeutical strategies for biofilm associated infections. **Roum Arch Microbiol Immunol**, v. 69, n. 3, p. 125-138, 2010.

LEE, Chang-Ro *et al.* Antimicrobial Resistance of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Hypervirulence-Associated Determinants, and Resistance Mechanisms. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 7, p. 483, 2017.

LEE, Chang-Ro et al. Global dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology, genetic context, treatment options, and detection methods. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 895, 2016.

LEE, Chen-Hsiang et al. Sialic acid involved in hypermucoviscosity phenotype of *Klebsiella pneumoniae* and associated with resistance to neutrophil phagocytosis. **Virulence**, v. 5, n. 6, p. 673-679, 2014.

LEE, H.-C. et al. Clinical implications of hypermucoviscosity phenotype in *Klebsiella pneumoniae* isolates: association with invasive syndrome in patients with community-acquired bacteraemia. **Journal of internal medicine**, v. 259, n. 6, p. 606-614, 2006.

LEFTEROVA, Martina I. et al. Cell-specific determinants of peroxisome proliferator-activated receptor γ function in adipocytes and macrophages. **Molecular and cellular biology**, v. 30, n. 9, p. 2078-2089, 2010.

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

LIBBY, Peter; PLUTZKY, Jorge. Inflammation in diabetes mellitus: role of peroxisome proliferator-activated receptor- α and peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonists. **American Journal of Cardiology**, v. 99, n. 4, p. 27-40, 2007.

LIN, Yi-Tsung et al. Bacteremic community-acquired pneumonia due to *Klebsiella pneumoniae*: clinical and microbiological characteristics in Taiwan, 2001-2008. **BMC infectious diseases**, v. 10, n. 1, p. 307, 2010.

LIU, Yung-Ching et al. Septic metastatic lesions of pyogenic liver abscess: their association with *Klebsiella pneumoniae* bacteremia in diabetic patients. **Archives of internal medicine**, v. 151, n. 8, p. 1557-1559, 1991.

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.

LLOBET, Enrique et al. Analysis of the networks controlling the antimicrobial-peptide-dependent induction of *Klebsiella pneumoniae* virulence factors. **Infection and immunity**, v. 79, n. 9, p. 3718-3732, 2011.

LLOBET, Enrique et al. Deciphering tissue-induced *Klebsiella pneumoniae* lipid A structure. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 46, p. E6369-E6378, 2015.

LLOBET, Enrique et al. *Klebsiella pneumoniae* OmpA confers resistance to antimicrobial peptides. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 1, p. 298-302, 2009.

- LONG, D. Y. et al. Persisters and their effects on microbial biofilm tolerance: a review. **Ying yong sheng tai xue bao= The journal of applied ecology**, v. 21, n. 10, p. 2707-2714, 2010.
- LUGO, Joanelle Z. et al. Lipopolysaccharide O-antigen promotes persistent murine bacteremia. **Shock**, v. 27, n. 2, p. 186-191, 2007.
- MA, Li-Chen et al. Genomic heterogeneity in *Klebsiella pneumoniae* strains is associated with primary pyogenic liver abscess and metastatic infection. **The Journal of infectious diseases**, v. 192, n. 1, p. 117-128, 2005.
- 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.
- MAHAJAN, Sahil et al. Mycobacterium tuberculosis modulates macrophage lipid-sensing nuclear receptors PPAR γ and TR4 for survival. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 11, p. 5593-5603, 2012.
- MAHAJAN, Sahil et al. Mycobacterium tuberculosis modulates macrophage lipid-sensing nuclear receptors PPAR γ and TR4 for survival. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 11, p. 5593-5603, 2012.
- MALAVIYA, Ravi et al. Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF- α . **Nature**, v. 381, n. 6577, p. 77, 1996.
- MARCH, Catalina et al. *Klebsiella pneumoniae* outer membrane protein A is required to prevent the activation of airway epithelial cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 12, p. 9956-9967, 2011.
- MARCH, Catalina et al. Role of bacterial surface structures on the interaction of *Klebsiella pneumoniae* with phagocytes. **PloS one**, v. 8, n. 2, p. e56847, 2013.
- MARQUES, Maria Angela M. et al. Deciphering the proteomic profile of *Mycobacterium leprae* cell envelope. **Proteomics**, v. 8, n. 12, p. 2477-2491, 2008.

MATATOV, Robert et al. Inability of encapsulated *Klebsiella pneumoniae* to assemble functional type 1 fimbriae on their surface. **FEMS microbiology letters**, v. 179, n. 1, p. 123-130, 1999.

MATTOS, Katherine A. et al. Lipid droplet formation in leprosy: toll-like receptor-regulated organelles involved in eicosanoid formation and *Mycobacterium leprae* pathogenesis. **Journal of leukocyte biology**, v. 87, n. 3, p. 371-384, 2010.

MATTOS, Katherine A. et al. Modulation of lipid droplets by *Mycobacterium leprae* in Schwann cells: a putative mechanism for host lipid acquisition and bacterial survival in phagosomes. **Cellular microbiology**, v. 13, n. 2, p. 259-273, 2011.

McClane BA, Mietzner TA. 1999. Overcoming the physical and chemical defenses of the human body, p 225–226. In McClane BA, Mietzner TA, Dowling JN, Phillips BA (ed), *Microbial pathogenesis*. Hayes Barton Press, Raleigh, NC

MEDEIROS, Antone A. Evolution and dissemination of β -lactamases accelerated by generations of β -lactam antibiotics. **Clinical Infectious Diseases**, v. 24, n. Supplement_1, p. S19-S45, 1997.

MERIE QUEENAN, Anne; BUSH, Karen. carbapenemases: the versatile B-lactamases. **Clin Microbiol Rev**, v. 20, n. 3, p. 440-458, 2007.

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

MERLE, Nicolas S. et al. Complement system part II: role in immunity. **Frontiers in immunology**, v. 6, p. 257, 2015.

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.

MILLER, Christopher C. et al. Innate protection of *Mycobacterium smegmatis* against the antimicrobial activity of nitric oxide is provided by mycothiol. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 51, n. 9, p. 3364-3366, 2007.

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

MORANTA, David et al. Klebsiella pneumoniae capsule polysaccharide impedes the expression of β -defensins by airway epithelial cells. **Infection and immunity**, v. 78, n. 3, p. 1135-1146, 2010.

MÜLLER, Silke I.; VALDEBENITO, Marianne; HANTKE, Klaus. Salmochelin, the long-overlooked catecholate siderophore of Salmonella. **Biometals**, v. 22, n. 4, p. 691-695, 2009.

MUNOZ-PRICE, L. Silvia et al. Clinical epidemiology of the global expansion of Klebsiella pneumoniae carbapenemases. **The Lancet infectious diseases**, v. 13, n. 9, p. 785-796, 2013.

NETIKUL, Thidarat et al. Characterization of an IncN2-type bla NDM-1-carrying plasmid in Escherichia coli ST131 and Klebsiella pneumoniae ST11 and ST15 isolates in Thailand. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 11, p. 3161-3163, 2014.

OFEK, I. et al. Nonopsonic phagocytosis of microorganisms. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 239-276, 1995.

OGAWA, Sumito et al. Molecular determinants of crosstalk between nuclear receptors and toll-like receptors. **Cell**, v. 122, n. 5, p. 707-721, 2005.

OLIVA, Alessandra et al. Synergistic activity and effectiveness of a double-carbapenem regimen in pandrug-resistant. 2014.

OLIVA, Alessandra et al. Therapeutic strategy for pandrug-resistant Klebsiella pneumoniae severe infections: short-course treatment with colistin increases the in vivo and in vitro activity of double carbapenem regimen. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 33, p. 132-134, 2015.

ÖSTERBLAD, M. et al. First isolations of KPC-2-carrying ST258 Klebsiella pneumoniae strains in Finland, June and August 2009. **Eurosurveillance**, v. 14, n. 40, p. 19349, 2009.

PACZOSA, Michelle K.; Meccas, Joan. *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 3, p. 629-661, 2016.

PADILLA, Emma et al. Klebsiella pneumoniae AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 1, p. 177-183, 2010.

PAGÈS, Jean-Marie; JAMES, Chloë E.; WINTERHALTER, Mathias. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 12, p. 893, 2008.

PAN, Yi-Jiun et al. Use of a Dictyostelium model for isolation of genetic loci associated with phagocytosis and virulence in *Klebsiella pneumoniae*. **Infection and immunity**, v. 79, n. 3, p. 997-1006, 2011.

PATEL, Payal K.; Russo, Thomas A.; Karchmer, Adolf W. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. In: **Open forum infectious diseases**. Oxford University Press, 2014. p. ofu028

PATERSON, David L.; BONOMO, Robert A. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. **Clinical microbiology reviews**, v. 18, n. 4, p. 657-686, 2005.

PEREIRA, Polyana Silva et al. Update of the molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: spread of clonal complex 11 (ST11, ST437 and ST340). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 2, p. 312-316, 2012.

PEREIRA, S. C. L.; VANETTI, M. C. D. Potential virulence of *Klebsiella* sp. isolates from enteral diets. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 9, p. 782-789, 2015.

PEYRON, Pascale et al. Foamy macrophages from tuberculous patients' granulomas constitute a nutrient-rich reservoir for *M. tuberculosis* persistence. **PLoS pathogens**, v. 4, n. 11, p. e1000204, 2008.

PITOUT, Johann DD. Multiresistant Enterobacteriaceae: New threat of an old problem. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 6, n. 5, p. 657-669, 2008.

PITOUT, Johann DD; NORDMANN, Patrice; POIREL, Laurent. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, a key pathogen set for global nosocomial dominance. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 59, n. 10, p. 5873-5884, 2015.

PODSHUN, R.; Ullmann, U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clinical microbiology reviews**, v. 11, n. 4, p. 589-603, 1998.

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.

POOLE, Keith. Efflux-mediated antimicrobial resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, n. 1, p. 20-51, 2005.

POOLE, R. K. Nitric oxide and nitrosative stress tolerance in bacteria. 2005.

PRZONDO-MORDARSKA, A. et al. Chemiluminescence response of human polymorphonuclear leukocytes induced by purified, latex attached *Klebsiella fimbriae*. **Zentralblatt für Bakteriologie**, v. 275, n. 4, p. 521-529, 1991.

PUENTE JL, Finlay BB. 2001. Pathogenic *Escherichia coli*, p 387–456. In Groisman EA (ed), Principles of bacterial pathogenesis. Academic Press, San Diego, CA.

REDDY, Aravind T. et al. Endothelial cell peroxisome proliferator-activated receptor γ reduces endotoxemic pulmonary inflammation and injury. **The Journal of Immunology**, v. 189, n. 11, p. 5411-5420, 2012.

REDDY, Aravind T.; LAKSHMI, Sowmya P.; REDDY, Raju C. PPAR γ in bacterial infections: a friend or foe?. **PPAR research**, v. 2016, 2016.

REDDY, Raju C. et al. Sepsis-induced inhibition of neutrophil chemotaxis is mediated by activation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ . **Blood**, v. 112, n. 10, p. 4250-4258, 2008

REGUEIRO, Verónica et al. *Klebsiella pneumoniae* subverts the activation of inflammatory responses in a NOD1-dependent manner. **Cellular microbiology**, v. 13, n. 1, p. 135-153, 2011.

REGUEIRO, Veronica et al. The uptake of a *Klebsiella pneumoniae* capsule polysaccharide mutant triggers an inflammatory response by human airway epithelial cells. **Microbiology**, v. 152, n. 2, p. 555-566, 2006.

RICHTER, Sara N. et al. KPC-mediated resistance in *Klebsiella pneumoniae* in two hospitals in Padua, Italy, June 2009-December 2011: massive spreading of a KPC-3-encoding plasmid and involvement of non-intensive care units. **Gut pathogens**, v. 4, n. 1, p. 7, 2012.

RICOTE, Mercedes et al. The peroxisome proliferator-activated receptor- γ is a negative regulator of macrophage activation. **Nature**, v. 391, n. 6662, p. 79, 1998.

ROSEN, David A. et al. Molecular variations in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* FimH affect function and pathogenesis in the urinary tract. **Infection and immunity**, v. 76, n. 7, p. 3346-3356, 2008.

RUSSO, Thomas A. et al. Aerobactin, but not yersiniabactin, salmochelin, or enterobactin, enables the growth/survival of hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* ex vivo and in vivo. **Infection and immunity**, v. 83, n. 8, p. 3325-3333, 2015.

SAHLY, Hany et al. Capsule impedes adhesion to and invasion of epithelial cells by *Klebsiella pneumoniae*. **Infection and immunity**, v. 68, n. 12, p. 6744-6749, 2000.

SAMUELSEN, Ørjan et al. Emergence of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates of sequence type 258 producing plasmid-mediated KPC carbapenemase in Norway and Sweden. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, n. 4, p. 654-658, 2009.

SANDER, P. et al. Ribosomal and non-ribosomal resistance to oxazolidinones: species-specific idiosyncrasy of ribosomal alterations. **Molecular microbiology**, v. 46, n. 5, p. 1295-1304, 2002.

SHAFIKHANI, Sasha H.; MORALES, Christina; ENGEL, Joanne. The *Pseudomonas aeruginosa* type III secreted toxin ExoT is necessary and sufficient to induce apoptosis in epithelial cells. **Cellular microbiology**, v. 10, n. 4, p. 994-1007, 2008.

SHAH, Rambha K. *et al.* The Determination and Correlation of Various Virulence Genes, ESBL, Serum Bactericidal Effect and Biofilm Formation of Clinical Isolated Classical *Klebsiella pneumoniae* and Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* from Respiratory Tract Infected Patients. **Polish Journal of Microbiology**, v. 66, n. 4, p. 501-508, 2017.

SHANKAR-SINHA, Sunita et al. The *Klebsiella pneumoniae* O antigen contributes to bacteremia and lethality during murine pneumonia. **Infection and immunity**, v. 72, n. 3, p. 1423-1430, 2004.

SHIFRIN, Yulia et al. Enteropathogenic *Escherichia coli* induces modification of the focal adhesions of infected host cells. **Cellular microbiology**, v. 4, n. 4, p. 235-243, 2002.

SHON, Alyssa S.; BAJWA, Rajinder PS; RUSSO, Thomas A. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: a new and dangerous breed. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 107-118, 2013.

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.

SRINIVASAN, Vijaya Bharathi et al. Functional characterization of a novel outer membrane porin KpnO, regulated by PhoBR two-component system in *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044. **PLoS One**, v. 7, n. 7, p. e41505, 2012.

STAHLHUT, Steen G. et al. Comparative structure-function analysis of mannose-specific FimH adhesins from *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. **Journal of bacteriology**, v. 191, n. 21, p. 6592-6601, 2009.

STAVRUM, Ruth et al. Modulation of transcriptional and inflammatory responses in murine macrophages by the *Mycobacterium tuberculosis* mammalian cell entry (Mce) 1 complex. **PloS one**, v. 6, n. 10, p. e26295, 2011.

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; Kroghfelt, 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.

STRUVE, Carsten; Bojer, Martin; Kroghfelt, Karen Angeliki. Identification of a conserved chromosomal region encoding *Klebsiella pneumoniae* type 1 and type 3 fimbriae and assessment of the role of fimbriae in pathogenicity. **Infection and immunity**, v. 77, n. 11, p. 5016-5024, 2009.

STRUVE, Carsten; Forestier, Christiane; Kroghfelt, Karen A. Application of a novel multi-screening signature-tagged mutagenesis assay for identification of *Klebsiella pneumoniae* genes essential in colonization and infection. **Microbiology**, v. 149, n. 1, p. 167-176, 2003.

SZATMARI, Istvan et al. Activation of PPAR γ specifies a dendritic cell subtype capable of enhanced induction of iNKT cell expansion. **Immunity**, v. 21, n. 1, p. 95-106, 2004.

SZATMARI, Istvan et al. PPAR γ controls CD1d expression by turning on retinoic acid synthesis in developing human dendritic cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 203, n. 10, p. 2351-2362, 2006.

SZATMARI, Istvan et al. PPAR γ regulates the function of human dendritic cells primarily by altering lipid metabolism. **Blood**, v. 110, n. 9, p. 3271-3280, 2007.

TAKEDA, Kiyoshi; AKIRA, Shizuo. Toll receptors and pathogen resistance. **Cellular microbiology**, v. 5, n. 3, p. 143-153, 2003.

TARKKANEN, A. M. et al. Fimbriation, capsulation, and iron-scavenging systems of Klebsiella strains associated with human urinary tract infection. **Infection and immunity**, v. 60, n. 3, p. 1187-1192, 1992.

TASCINI, Carlo et al. Synergistic activity of colistin plus rifampin against colistin-resistant KPC-producing Klebsiella pneumoniae. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 8, p. 3990-3993, 2013.

TENOVER, Fred C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **The American journal of medicine**, v. 119, n. 6, p. S3-S10, 2006.

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.

TOMÁS, J. M. et al. Role of capsule and O antigen in resistance of Klebsiella pneumoniae to serum bactericidal activity. **Infection and immunity**, v. 54, n. 1, p. 85-89, 1986.

TOTH, A. et al. Emergence of a colistin-resistant KPC-2-producing Klebsiella pneumoniae ST258 clone in Hungary. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**, v. 29, n. 7, p. 765-769, 2010.

TSAI, Yu-Kuo et al. Klebsiella pneumoniae outer membrane porins OmpK35 and OmpK36 play roles in both antimicrobial resistance and virulence. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 4, p. 1485-1493, 2011.

TZOUVELEKIS, L. S. et al. Carbapenemases in Klebsiella pneumoniae and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions. **Clinical microbiology reviews**, v. 25, n. 4, p. 682-707, 2012.

VERSALOVIC, James; Koeth, Thearith; Lupski, R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic acids research**, v. 19, n. 24, p. 6823-6831, 1991.

VOGELS, GD van der; VAN DER DRIFT, C. Degradation of purines and pyrimidines by microorganisms. **Bacteriological reviews**, v. 40, n. 2, p. 403, 1976.

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.

WANG, Limei et al. Natural product agonists of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ): a review. **Biochemical pharmacology**, v. 92, n. 1, p. 73-89, 2014.

WEISSMANN, G. Prostaglandins as modulators rather than mediators of inflammation. **Journal of lipid mediators**, v. 6, n. 1-3, p. 275, 1993.

WENDT, C. et al. First outbreak of Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC)-producing K. pneumoniae in Germany. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**, v. 29, n. 5, p. 563-570, 2010.

WORKMAN, Alan D. et al. Relative susceptibility of airway organisms to antimicrobial effects of nitric oxide. **International forum of allergy & rhinology**. 2017. p. 770-776.

WRIGHT, Gerard D. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Chemical communications**, v. 47, n. 14, p. 4055-4061, 2011.

WU, June Hsieh et al. Contribution of fucose-containing capsules in *Klebsiella pneumoniae* to bacterial virulence in mice. **Experimental Biology and Medicine**, v. 233, n. 1, p. 64-70, 2008.

WU, June Hsieh et al. Contribution of fucose-containing capsules in *Klebsiella pneumoniae* to bacterial virulence in mice. **Experimental Biology and Medicine**, v. 233, n. 1, p. 64-70, 2008.

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.

WU, Ming-Fang et al. Humoral immunity against capsule polysaccharide protects the host from magA+ *Klebsiella pneumoniae*-induced lethal disease by evading Toll-like receptor 4 signaling. **Infection and immunity**, v. 77, n. 2, p. 615-621, 2009. XIONG, Huizhong et al. Distinct contributions of neutrophils and CCR2+ monocytes to pulmonary clearance of different *Klebsiella pneumoniae* strains. **Infection and immunity**, v. 83, n. 9, p. 3418-3427, 2015.

XIONG, Huizhong et al. Innate lymphocyte/Ly6Chi monocyte crosstalk promotes *Klebsiella pneumoniae* clearance. **Cell**, v. 165, n. 3, p. 679-689, 2016.

YANG, J. et al. A nosocomial outbreak of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese hospital: dissemination of ST11 and emergence of ST37, ST392 and ST395. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 19, n. 11, p. E509-E515, 2013.

YANG, Pei-Yin et al. HepG2 cells infected with *Klebsiella pneumoniae* show DNA laddering at apoptotic and necrotic stages. **Apoptosis**, v. 17, n. 2, p. 154-163, 2012.

YEW, 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.

YIGIT, Hesna et al. Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 45, n. 4, p. 1151-1161, 2001.

YOSHIDA, Kanako et al. Induction of interleukin-10 and down-regulation of cytokine production by *Klebsiella pneumoniae* capsule in mice with pulmonary infection. **Journal of medical microbiology**, v. 50, n. 5, p. 456-461, 2001.

YOSHIDA, Kanako et al. Role of bacterial capsule in local and systemic inflammatory responses of mice during pulmonary infection with *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of medical microbiology**, v. 49, n. 11, p. 1003-1010, 2000.

ZHANG, Lina; CHAWLA, Ajay. Role of PPAR γ in macrophage biology and atherosclerosis. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 15, n. 10, p. 500-505, 2004.

ZHANG, Ping et al. Innate immunity and pulmonary host defense. **Immunological reviews**, v. 173, n. 1, p. 39-51, 2000