

UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO

Programa de Pós-Graduação Stricto sensu em Ciências da Saúde

MARIA EDUARDA SOUZA GUERRA

**AVALIAÇÃO DA IMPORTÂNCIA DO GENE *potD* PARA A
FORMAÇÃO DE BIOFILME e *QUORUM SENSING* EM *Klebsiella
pneumoniae***

Bragança Paulista
2022

MARIA EDUARDA SOUZA GUERRA – R.A.: 202113413

**AVALIAÇÃO DA IMPORTÂNCIA DO GENE *potD* PARA A
FORMAÇÃO DE BIOFILME e *QUORUM SENSING* EM *Klebsiella*
*pneumoniae***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Ciências da Saúde

Orientador: Prof. Dr. Thiago Rojas Converso

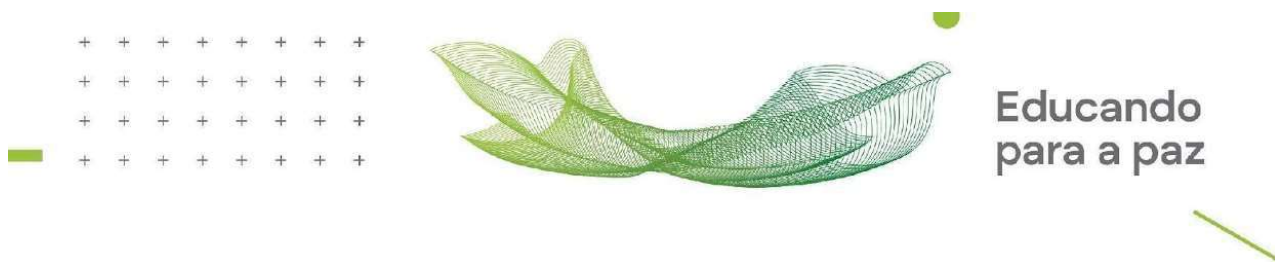
Bragança Paulista
2022

QW 138.5.K5
G964a Guerra, Maria Eduarda Souza
Avaliação da importância do gene *potD* para a
formação de biofilme e Quorum sensing em *Klebsiella*
pneumoniae / Maria Eduarda Souza Guerra. – Bragança
Paulista, 2023.
74 p.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-
Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da
Universidade São Francisco.
Orientação de: Thiago Rojas Converso.

1. *Klebsiella pneumoniae*. 2. Biofilme. 3. Quorum
sensing. 4. Poliaminas. I. Converso, Thiago Rojas. II.
Título.

Sistema de Bibliotecas da Universidade São Francisco – USF
Ficha catalográfica elaborada por: Denise Isabel Arten / CRB-8/5823



Educando
para a paz

GUERRA, Maria Eduarda Souza. "Avaliação da importância do gene *potD* para a formação de biofilme e quorum sensing em *Klebsiella pneumoniae*". Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em 10 de fevereiro de 2023 pela Banca examinadora constituída pelos professores:

Prof. Dr. Thiago Rojas Converso - Orientador e Presidente
Universidade São Francisco

Profa. Dra. Larissa Vilela Nascimento
(por videoconferência)
Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Raquel Girardello
Universidade São Francisco

Dedicatória

À minha família e a todos que me ajudaram nessa
caminhada.

Agradecimentos

À Deus por me proteger e permitir vivenciar essa experiência.

À minha família, meus pais Geilsa e Alceu e meu irmão Daniel por todo o apoio, paciência e dedicação nessa jornada. Aos meus pais, obrigado pelo incentivo, confiança e esforço para que eu perdesse o medo de dirigir e sempre ficasse com um carro a semana inteira, amo vocês.

Ao Prof. Dr. Thiago Rojas Converso, por toda paciência, dedicação e orientação para que esse trabalho fosse concluído, foi essencial para minha formação e amadurecimento na pesquisa, muito obrigada!

Aos professores do laboratório 7, Michelle, Lúcio, Raquel e Thais, que de alguma forma sempre estavam disponíveis para ajudar e colaborar, obrigada!

Aos professores do Programa de Pós-graduação, que exerceram sua profissão com excelência e foram fundamentais para o meu desenvolvimento.

Processo nº 2021/01211-1, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro.

Às minhas irmãs científicas Brenda e Giulia, por toda ajuda durante os experimentos, conversas na copa e por compartilharem momentos além da pesquisa, vocês são muito especiais!

Ao Lucas, por sempre me ajudar e tirar minhas dúvidas desde a iniciação científica, muito obrigada!

As meninas do laboratório, Ana Julia, Alquiandra, Paloma, Juliana pela contribuição.

Às alunas de Iniciação Científica, Ângela e Márcia por toda ajuda para o desenvolvimento da pesquisa e por me dar a oportunidade de ensinar, obrigada meninas!

Às minhas amigas da vida, Débora, Bianca, Francielli, Amanda, Heloísa, por sempre se torcerem e por momentos alegres vividos.

RESUMO

Klebsiella pneumoniae (*K. pneumoniae*) é um importante agente etiológico envolvido nas infecções nosocomias e adquiridas pela comunidade, atingindo com maior frequência recém-nascidos, idosos e indivíduos imunocomprometido. Colonizadora da orofaringe, trato gastrointestinal e geniturinário, em situações mais graves pode invadir outras regiões ocasionando pneumonia, bacteremia, meningite e abscessos hepáticos. A bactéria utiliza um mecanismo de comunicação intercelular denominado *quorum sensing* para produzir biofilmes e com isso aumentar sua disseminação pelo ambiente e resistência a agentes antimicrobianos, essa comunicação é guiada, principalmente, pela produção de moléculas autoindutoras tipo II (AI-2). Além dessa comunicação, alguns estudos descreveram a influência das poliaminas, moléculas necessárias para o crescimento e desenvolvimento de todas as células, e de seus transportadores na formação de biofilme por diferentes microrganismos. Neste trabalho avaliamos a importância do gene *potD* na formação de biofilme em *K. pneumoniae* e na capacidade de interferir no *quorum sensing*. Utilizamos a cepa mutante, cujo gene *potD* foi deletado, para comparar a habilidade da bactéria em formar biofilme em superfície abiótica, utilizando microplacas, e biótica, utilizando a linhagem celular A549 (células de adenocarcinoma de pulmão humano CCL-185; ATCC) - comparando o comportamento das duas cepas. Nossos resultados mostram que PotD é importante para a formação de biofilme *in vitro* e esse efeito é proporcional a idade do biofilme, foi observado diferença em 24 h e 48 h. Porém não houve diferença no crescimento planctônico. Para mimetizar um ambiente mais fisiológico de colonização e infecção no hospedeiro, também utilizamos substrato celular, para a formação de biofilme. Os dados demonstraram que a quantidade de Unidade Formadora de Colônias recuperada pela cepa selvagem é maior quando comparada com a cepa mutante, confirmando que PotD afeta a formação de biofilme. Também foi avaliada a produção de moléculas AI-2, foi observado que a deleção do gene *potD* afetou a produção de moléculas AI-2 e, conseqüentemente, o *quorum sensing*, esse resultado pode justificar a capacidade reduzida em formar biofilme pela cepa mutante, uma vez que, o *quorum sensing* é importante para a formação de biofilme.

Palavras-chave: *Klebsiella pneumoniae*. Biofilme. *Quorum sensing*. Poliaminas

ABSTRACT

Klebsiella pneumoniae (*K. pneumoniae*) is an important etiological agent involved in nosocomial and community-acquired infections, affecting newborns, the elderly and immunocompromised individuals more frequently. Colonizing the oropharynx, gastrointestinal and genitourinary tract, in more serious situations it can invade other regions causing pneumonia, bacteremia, meningitis and liver abscesses. The bacterium uses an intercellular communication mechanism called *quorum sensing* to produce biofilms and thereby increase its dissemination through the environment and resistance to antimicrobial agents, this communication is mainly guided by the production of type II autoinducer molecules (AI-2). In addition to this communication, some studies have described the influence of polyamines, molecules necessary for the growth and development of all cells, and their transporters in biofilm formation by different microorganisms. In this work, we evaluated the importance of the *potD* gene in biofilm formation in *K. pneumoniae* and in its ability to interfere with quorum sensing. We used the mutant strain, whose *potD* gene was deleted, to compare the bacteria's ability to form biofilm on abiotic surfaces, using microplates, and biotic ones, using the A549 cell line (CCL-185 human lung adenocarcinoma cells; ATCC) - comparing the behavior of the two strains. Our results show that PotD is important for in vitro biofilm formation and this effect is proportional to the age of the biofilm, a difference was observed at 24 h and 48 h. However, there was no difference in planktonic growth. To mimic a more physiological environment of colonization and infection in the host, we also used cellular substrate for biofilm formation. The data showed that the amount of Colony Forming Units recovered by the wild strain is higher when compared to the mutant strain, confirming that PotD affects biofilm formation. The production of AI-2 molecules was also evaluated, it was observed that the deletion of the *potD* gene affected the production of AI-2 molecules and, consequently, the *quorum sensing*, this result may explain the reduced ability to form biofilm by the mutant strain, since, quorum sensing is important for biofilm formation.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*. Biofilm. *Quorum sensing*. Polyamines.