

UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde

YASMIN FERREIRA CAMPOS

**ACIL-HOMOSERINA LACTONAS MODULAM A
FORMAÇÃO DE BIOFILME POR *Klebsiella pneumoniae***

Bragança Paulista
2025

YASMIN FERREIRA CAMPOS – R.A. 202349623

**ACIL-HOMOSERINA LACTONAS MODULAM A
FORMAÇÃO DE BIOFILME POR *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. Lúcio Fábio Caldas Ferraz.

Bragança Paulista
2025

QW 138.5.K5 Campos, Yasmin Ferreira

C218a

Acil-homoserina lactonas modulam a formação de biofilme por *Klebsiella pneumoniae* / Yasmin Ferreira Campos. -- Bragança Paulista, 2025.
54 p.

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

Orientação de: Lúcio Fábio Caldas Ferraz.

1. *Klebsiella pneumoniae*. 2. Biofilmes.
3. Percepção de Quorum. 4. Acil-Butirolactonas.
I. Ferraz, Lúcio Fábio Caldas. II. Título.



Educando
para a paz

CAMPOS, Yasmin Ferreira de. "Acil-Homoserina Lactonas Modulam a Formação de Biofilme por *Klebsiella Pneumoniae*". Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em 29 de julho de 2025 pela Banca examinadora constituída pelos(as) professores(as):

Prof(a). Dr(a). Lúcio Fábio Caldas Ferraz - Orientador(a) e Presidente
Universidade São Francisco

Prof(a). Dr(a). Enrique Medina-Acosta
(por videoconferência)
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

Prof(a). Dr(a). Manoela Marques Ortega
Universidade São Francisco

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Lúcio Fábio Caldas Ferraz, por aceitar-me ao grupo de pesquisa. Pela extrema paciência, pelas diversas vezes em que motivou na pesquisa, aos aconselhamentos e transmissão de seu conhecimento a mim e meus colegas, por sua dedicação e confiança.

Aos professores Prof. Dr. Enrique Medina-Acosta e Profa. Dra. Manoela Marques Ortega, presentes na banca, pela disponibilidade e pelas contribuições para esse trabalho. E às professoras Profa. Dra. Teca Galvão e Profa. Dra. Thais Manzano Parisotto, pelo aceite como membros suplentes para esse trabalho.

Aos meus pais, Antonio e Ifigênia, por todo apoio e incentivo nas minhas escolhas. As minhas colegas de laboratório Juliana Baboghlian, Paloma Aparecida Alves de Oliveira, Alquiandra Stefani Ferreira Mançano, por todo auxílio na realização de experimentos e participação nesse trabalho. Ao meu colega Lucas Assoni por toda paciência em explicar funcionamento de alguns equipamentos, realização de protocolos novos e pela companhia quase diária no laboratório.

E aos demais colegas e professores do laboratório de Microbiologia Molecular e Clínica (laboratório 7).

A Universidade São Francisco e a todo o Programa de Pós-graduação Stricto Sensu em Ciências da Saúde.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento: 88887.901616/2023-00.

Esse trabalho também recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), na forma de Auxílio à Pesquisa – Regular, processo número 2018/26203-09 e 2023/17495-4.

“Nada na vida deve ser temido, apenas compreendido.”

Marie Curie

RESUMO

Klebsiella pneumoniae é um bacilo Gram-negativo de relevância crítica devido ao aumento recente de cepas resistentes aos antibióticos e elevado índice de mortalidade, tendo sido a terceira maior causa de óbitos envolvendo resistência a antimicrobianos em 2019. Além disso, é responsável por infecções hospitalares graves mesmo em pacientes sem histórico de doenças pré-existentes, tornando um problema mundial de saúde pública. As acil-homoserina lactonas (AHLs) são moléculas sinalizadoras pertencentes ao sistema de *quorum-sensing* tipo 1, sendo composta por um anel de homoserina lactona, conectado por meio de uma ligação amida a uma cadeia acil que pode variar em comprimento. Essas moléculas possuem a função de informar sobre as condições do meio colonizado, por meio de modulação e regulação dos processos metabólicos e de fatores de resistência. *K. pneumoniae* não possui o sistema de síntese de moléculas AHLs, porém capta moléculas sintetizadas por outras bactérias. Para manter níveis adequados de AHLs no meio intracelular, as bactérias ativam o processo de *quorum-quenching*, que é composto de enzimas que degradam AHLs e que é ativado quando ocorre uma “sobrecarga” de AHLs advindos do processo de captação, evitando perturbações na bactéria. É descrito que *K. pneumoniae* possui o gene *ahlK*, que codifica uma provável enzima AHLase que seria capaz de degradar as moléculas sinalizadoras do QS tipo 1. No entanto, o papel desse gene na virulência de *K. pneumoniae*, sobretudo na capacidade de formar biofilme, ainda é desconhecido. Este estudo teve o objetivo de caracterizar uma cepa de *K. pneumoniae* mutante para o gene *ahlK*, e as possíveis interferências que a ausência desse gene e a presença de AHLs exógenas podem causar na formação de biofilme pela bactéria. Para isso, foram conduzidas análises de bioinformática da proteína AhlK, ensaios de crescimento bacteriano e formação de biofilme, e procedimentos de clonagem molecular. Os resultados obtidos indicam que a enzima AHLase de *K. pneumoniae* parece ter uma funcionalidade e influência direta na virulência desta bactéria. Na presença das AHLs ocorre um estímulo maior na formação de biofilme na cepa selvagem, sobretudo AHLs de cadeia longa. O nocaute do gene *ahlK* causa uma brusca redução na formação de biofilme, independente do acréscimo de AHLs exógenas, mostrando-se essencial para o biofilme. A formação de biofilme por *K. pneumoniae* também é intensificada quando essa bactéria é cultivada em cocultura com *Acinetobacter baumannii*, ressaltando o agravamento que pode ocorrer em coinfeções por essas duas bactérias. Por fim, *A. baumannii* transformada com o gene *ahlK* de *K. pneumoniae* apresentou redução na capacidade de formar biofilme. Este estudo destaca o papel do gene *ahlK* de *K. pneumoniae* no sistema *quorum-quenching* e sua atuação como modulador na formação de biofilme nesta bactéria, evidenciando seu potencial como alvo terapêutico para o combate às infecções causadas por *K. pneumoniae*.

Palavras-chave: *Klebsiella pneumoniae*. Biofilmes. Acil-Homoserina Lactonas. Degradação de Quorum. Detecção de Quorum.

ABSTRACT

Klebsiella pneumoniae is a Gram-negative bacterium of critical relevance due to the recent increase in antibiotic-resistant strains and high mortality rate, having been the third leading cause of deaths involving antimicrobial resistance in 2019. In addition, it is responsible for serious hospital infections even in patients with no history of pre-existing diseases, making it a global public health problem. Acyl-homoserine lactones (AHLs) are signalling molecules belonging to the type 1 quorum-sensing system, composed of a homoserine lactone ring, connected by an amide bond to an acyl chain that can vary in length. These molecules have the function of providing information about conditions of the colonized environment, through modulation and regulation of metabolic processes and resistance factors. *K. pneumoniae* does not have the AHL synthesis system, but captures molecules synthesized by other bacteria. To maintain adequate levels of AHL molecules in the intracellular environment, bacteria activate the quorum-quenching process, which consists of enzymes that degrade AHLs and is activated when there is an “overload” of AHLs from the uptake process, avoiding disturbances in the bacteria. It is described that *K. pneumoniae* has the *ahlK* gene, which encodes a putative AHLase enzyme capable of degrading the autoinducer molecules of QS type 1. However, the role of this gene in the virulence of *K. pneumoniae*, specially in the ability to form biofilm, is still unknown. This study aimed to characterize a strain of *K. pneumoniae* mutant for the *ahlK* gene, and the possible interferences that the absence of this gene and the presence of exogenous AHLs may cause in the formation of biofilm by this bacterium. To this end, bioinformatics analyses of the AhlK protein, bacterial growth and biofilm formation assays, and molecular cloning procedures were conducted. The results obtained indicate that the AHLase enzyme of *K. pneumoniae* appears to have a direct function and influence on the virulence of this bacterium. In the presence of AHLs, there is a greater stimulation of biofilm formation in the wild-type strain, especially long-chain AHLs. The knockout of the *ahlK* gene causes a sharp reduction in biofilm formation, regardless of the addition of exogenous AHLs, proving to be essential for biofilm formation. Biofilm formation by *K. pneumoniae* is also intensified when this bacterium is cocultured with *Acinetobacter baumannii*, highlighting the worsening that can occur in coinfections by these two bacteria. Finally, *A. baumannii* transformed with the *ahlK* gene from *K. pneumoniae* showed a reduction in the ability to form biofilm. This study highlights the role of *ahlK* gene of *K. pneumoniae* in the quorum-quenching system and its action as a modulator in biofilm formation in this bacterium, evidencing its potential as a therapeutic target for combating infections caused by *K. pneumoniae*.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*. Biofilms. Acyl-Homoserine Lactones. Quorum sensing. Quorum quenching.