
**PERFIL DE CRESCIMENTO E EXPRESSÃO GÊNICA POR UMA CEPA DE
KLEBSIELLA PNEUMONIAE MUTANTE PARA A SÍNTESE DE POLIAMINAS**
*GROWTH PROFILE AND GENE EXPRESSION BY A MUTANT KLEBSIELLA
PNEUMONIAE STRAIN FOR POLYAMINE SYNTHESIS*

BABOGHLIAN, Juliana¹; CAMPOS, Yasmin Ferreira¹; OLIVEIRA, Paloma Aparecida
Alves²; FERRAZ, Lúcio Fábio Caldas³;

¹Graduandas do Curso de Biomedicina da Universidade São Francisco; ²Mestranda do
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco; ³Professor
Orientador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade São
Francisco

juliana.ian@gmail.com; yasminferreiradecampos@gmail.com

RESUMO. *Klebsiella pneumoniae*, um bacilo Gram-negativo encapsulado, presente no trato gastrointestinal e na nasofaringe, e causador de infecções do trato urinário, pneumonia, septicemias e infecções dos tecidos moles. Poliaminas são nutrientes essenciais para diversas funções metabólicas em células bacterianas e em sua patogenicidade, influenciando a formação de biofilme, expressão de fimbrias, e comunicação intra e interespecies. As bactérias obtêm poliaminas por meio da biossíntese desse nutriente ou por ativação de receptores que captam poliaminas do meio externo. Este estudo teve como objetivo investigar o papel das poliaminas no crescimento bacteriano e na expressão gênica das vias de biossíntese e captação de poliaminas, em uma cepa de *Klebsiella pneumoniae* mutante para o gene *speA*, que codifica é uma enzima chave na biossíntese de poliaminas. As bactérias foram submetidas a condições normais de crescimento e de escassez de poliaminas, sendo esta última obtida pelo cultivo da bactéria na presença de diciclohexilamina, inibidor de uma outra enzima da via de biossíntese de poliaminas. Curvas de crescimento nas condições supracitadas indicaram prejuízo no crescimento bacteriano apenas na condição de duplo bloqueio das vias de biossíntese de poliaminas. Análises de expressão gênica mostraram aumento da expressão dos genes *potD* e *potF*, que codificam receptores de captação de poliaminas exógenas, além do aumento da expressão do gene *speC*, que codifica uma enzima de uma via alternativa de biossíntese de poliaminas. O melhor entendimento das vias metabólicas das poliaminas em *K. pneumoniae* pode ser de grande valia em futuras estratégias de controle das patologias causadas pela bactéria.

Palavras-chave: *Klebsiella pneumoniae*, poliaminas, reação em cadeia da polimerase em tempo real, expressão gênica, crescimento bacteriano.

ABSTRACT. *Klebsiella pneumoniae* is an encapsulated Gram-negative bacillus, present in the gastrointestinal tract and nasopharynx, which causes urinary tract infections, pneumonia, septicemia and soft tissue infections. Polyamines are essential nutrients for several metabolic functions in bacterial cells and their pathogenicity, influencing biofilm formation, fimbrial expression, and intra- and inter-species communications. Bacteria obtain polyamines through the biosynthesis of this nutrient or by activating receptors that capture polyamines from the external environment. This study aimed to investigate the role of polyamines in bacterial growth and in the expression of genes related to the polyamine's biosynthesis and uptake pathways, in a *Klebsiella pneumoniae* strain mutant for the *speA* gene, which encodes a key enzyme in

polyamine biosynthesis. The bacteria were subjected to normal growth conditions and conditions of polyamine scarcity, the latter being obtained by culturing the bacteria in the presence of dicyclohexylamine, an inhibitor of another enzyme of the polyamine biosynthesis pathway. Growth curves under the aforementioned conditions revealed impairment of bacterial growth only in the condition of double blockade of the polyamine biosynthesis pathways. Gene expression analyzes showed increased expression of *potD* and *potF* genes, which encode exogenous polyamine uptake receptors, and increased expression of *speC* gene, which encodes an enzyme of an alternative polyamine biosynthesis pathway. A better understanding of the metabolic pathways of polyamines in *K. pneumoniae* can be of great value in future strategies to control the pathologies caused by this bacterium.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, polyamines, real-time polymerase chain reaction, gene expression, bacterial growth.

INTRODUÇÃO

Pertencente às *Enterobacteriaceae*, a *Klebsiella pneumoniae* é caracterizada como um bacilo Gram-negativo encapsulado, concentrada no trato gastrointestinal e algumas poucas na nasofaringe, onde pode entrar na circulação sanguínea ou em outros tecidos causando infecções. É responsável por algumas patologias como infecções do trato urinário adquiridas no hospital, pneumonia, septicemias e infecções dos tecidos moles. Devido a capacidade de se espalhar rapidamente, tem a tendência de causar surtos. A *K. pneumoniae* pode apresentar multirresistência a antibióticos através de mecanismos como enzimas modificadoras de drogas com atividades diversas, tais como adenilação, acetilação ou fosforilação (WANG et al., 2020).

Poliaminas são moléculas com a estrutura formada por hidrocarbonetos e múltiplos grupamentos amino, tem carga positiva em pH fisiológico, e por este motivo podem servir de pontes eletrostáticas entre as moléculas, causando interações com os ácidos nucleicos. As poliaminas mais comumente encontradas são a putrescina, espermidina, espermina e cadaverina e são essenciais para diversas funções em células eucariontes e procariontes como o crescimento celular. Além disso, nas bactérias as poliaminas contribuem para a formação de biofilme, escape de fagolisossomo, produção de bactericina, atividade de toxinas, proteção contra o estresse oxidativo, entre outras funções (SHAH & SWIATLO, 2008). Elas constituem a maior concentração de polycations juntamente com o Mg^{2+} (IGARASHI & KASHIWAGI, 2010). Existe um rigoroso controle nos processos de síntese, degradação, captação do meio extracelular e excreção de poliaminas em uma célula bacteriana, sendo que a maior concentração é encontrada em complexos RNA-proteínas. Por conta disto, há mudança na estrutura do RNA, sendo responsável assim pela modulação da expressão das proteínas (IGARASHI & KASHIWAGI, 2000).

Putrescina e espermidina são as poliaminas encontradas com mais abundância na maioria das bactérias. Poliaminas exógenas são capturadas do meio extracelular por meio de receptores especializados que fazem parte do sistema de transporte do tipo ABC (do inglês, *ATP binding cassette*). Em estudos em *Escherichia coli* e outras bactérias foram observados dois sistemas de captação de poliaminas do meio extracelular regulados pelos operons *potABCD*, preferencialmente para captação de espermidina, e *potFGHI*, específico para captação de putrescina (IGARASHI & KASHIWAGI, 2010).

As proteínas PotD e PotF, localizadas na membrana externa, funcionam como receptores para a captação de poliaminas, sendo que estudos cristalográficos mostraram que PotD possui alta afinidade por espermidina, mas também pode se ligar a putrescina, ainda que em baixa afinidade, e que PotF possui afinidade apenas à putrescina, não se ligando às outras poliaminas. PotA e PotG são proteínas de membrana associadas a ATPases citosólicas, as demais proteínas codificadas pelos operons formam canais transmembrana para o transporte de poliaminas. A Figura 1 mostra o sistema de captação de poliaminas codificado pelo operon *potABCD*. No processo de captação de poliaminas, a ligação da espermidina no PotD desencadeia mudanças em sua conformação estrutural, desencadeando mudanças também no complexo PotBC que, por sua vez, afeta a estrutura do PotA, gerando energia pela hidrólise de ATP e levando à internalização de espermidina (SHAH & SWIATLO, 2008).

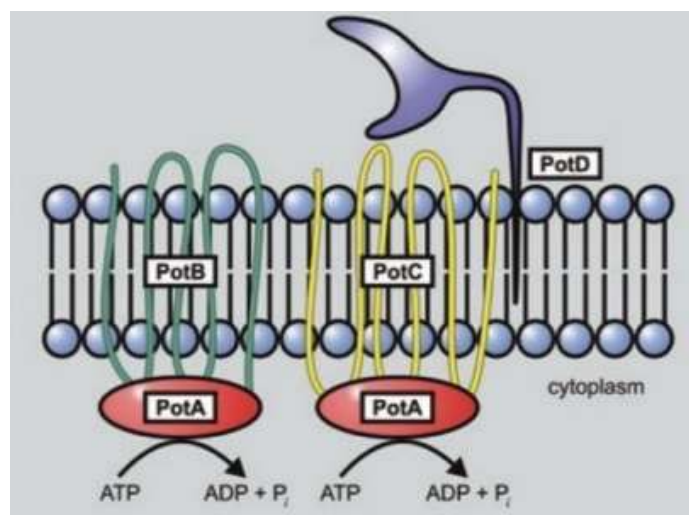


Figura 1: Esquema do sistema captação de poliaminas pelas proteínas codificadas pelo operon *potABCD* (SHAH & SWIATLO, 2008).

Na ausência de poliaminas exógenas, as bactérias ativam vias de síntese destas moléculas. Como mostra a Figura 2, a putrescina pode ser sintetizada por duas vias: 1) a partir da descarboxilação da ornitina pela ornitina descarboxilase, codificada pelo gene *speC*, ou 2) pela descarboxilação da arginina pela arginina descarboxilase (codificada por *speA*) formando a agmatina, seguida da conversão desta em putrescina e ureia pela agmatina ureohidrolase (gene *speB*). Para a biossíntese de espermidina (Figura 2), a enzima metionina adenosiltransferase, codificada pelo gene *metK*, converte metionina em S-adenosil metionina (SAM), e posteriormente a enzima SAM descarboxilase (gene *speD*), converte SAM em SAM descarboxilada. Por fim, a SAM descarboxilada atua como cofator da enzima espermidina sintase (gene *speE*) para a conversão da putrescina em espermidina (SHAH & SWIATLO, 2008).

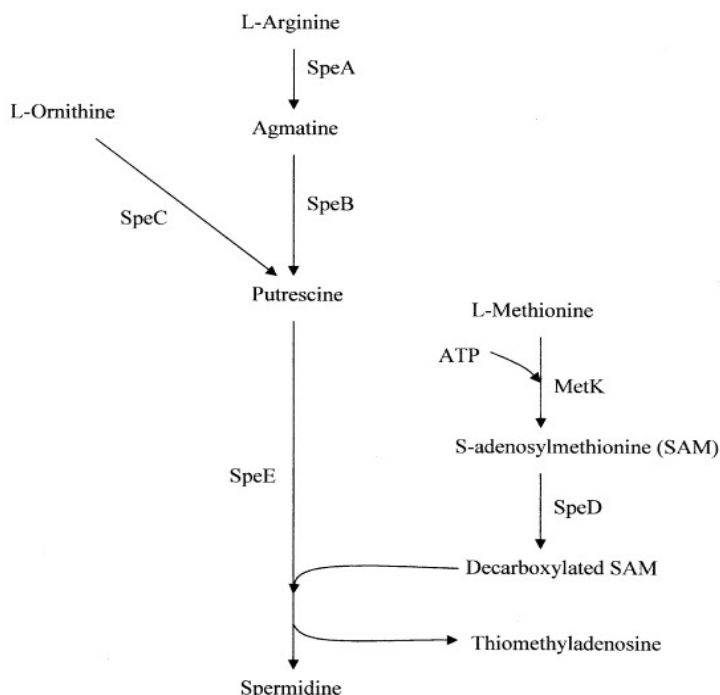


Figura 2: Vias de síntese de poliaminas (SHAH & SWIATLO, 2008).

Em experimentos com a bactéria *Yersinia pestis* com o gene *speA* deletado, Patel e colegas (2006) constataram, em análise pelo método HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência), a redução de aproximadamente 95% na concentração de putrescina na bactéria mutante *speA* em relação à cepa selvagem. Os autores também demonstraram que não houve alteração da curva de crescimento nem na formação de biofilmes num intervalo de tempo de 16 a 18 horas pela cepa mutante, em comparação com a cepa selvagem. Por outro lado, Mattila, Honkanen-Buzalski e Pösö (1984) investigaram a atuação da diciclohexilamina no padrão de crescimento bacteriano. A diciclohexilamina atua como inibidora da enzima espermidina sintetase (SpeE), que converte a putrescina em espermidina (Figura 2). Os autores mostraram que *K. pneumoniae* cresce mesmo na presença de 10 mM de diciclohexilamina, apesar da taxa de crescimento ser levemente afetada. Os autores mostraram também que *E. coli* crescidas na presença de 5 mM de diciclohexilamina tem a concentração intracelular de espermidina reduzida em 70%, e uma discreta redução na concentração de putrescina.

As poliaminas são nutrientes fundamentais tanto para a fisiologia quanto para a patogenicidade bacteriana. Como as poliaminas são importantes para a expressão de fatores de expressão, compreender as vias de síntese e de captação de poliaminas é de suma importância para melhor entendermos a patogenicidade bacteriana. Alguns estudos têm investido em meios de intervir nas vias de síntese de poliaminas, e como estas interferências podem impactar na patogenicidade bacteriana (SHAH & SWIATLO, 2008). No entanto, no que concerne à *K. pneumoniae*, poucos trabalhos têm se dedicado a compreender as consequências da escassez de poliaminas no crescimento e na expressão gênica em nesta bactéria. Neste sentido, o presente estudo teve o objetivo de investigar o papel das poliaminas no crescimento de *Klebsiella pneumoniae* e no padrão de expressão de genes das vias de síntese e de captação de poliaminas, por meio da caracterização da cepa selvagem e de uma cepa mutante para o gene *speA*, em condições normais de cultivo e na presença do inibidor da enzima SpeE, a diciclohexilamina.

O melhor entendimento das vias metabólicas das poliaminas nesta bactéria pode ser de grande valia em futuras estratégias de controle das patologias causadas por ela.

METODOLOGIA

Através de pesquisa bibliográfica, principalmente nas bases de dados PubMed e SciELO, foram levantados artigos científicos e de revisão para o embasamento teórico deste estudo. Além disso, por ser de caráter experimental, o presente estudo foi realizado no Laboratório de Microbiologia Molecular e Clínica do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde, no campus de Bragança Paulista da Universidade São Francisco, sob orientação do Prof. Dr. Lúcio Fábio Caldas Ferraz.

Cepas de K. pneumoniae selvagem e mutante para speA

Para este estudo foram utilizadas cepas de *K. pneumoniae* selvagem e mutante para o gene *speA*. A cepa mutante foi adquirida do Laboratório do Prof. Colin Manoil, da *University of Washington*, em Seattle/EUA (disponível em <<https://www.gs.washington.edu/labs/manoil/libraries.htm>>), e foi gerada por meio da técnica de mutagenese por transposon com a inserção, dentro do gene *speA*, de um gene que confere resistência ao antibiótico cloranfenicol.

Curvas de crescimento

Para as curvas de crescimento, foram feitos pré-inóculos das cepas selvagem e mutante *speA* em meio LB e incubação das culturas em temperatura de 37°C e 200 r.p.m. de agitação por 16 horas. Após este período foram feitos os inóculos em erlenmeyers, em triplicata, da seguinte forma: três amostras contendo 50 mL de LB com 500 µL do pré-inóculo da cepa selvagem; três amostras contendo 50 mL de LB com 500 µL do pré-inóculo da cepa mutante *speA*; e três amostras contendo 50 mL de LB, 500 µL do pré-inóculo da cepa mutante *speA* e 5 mM do inibidor diciclohexilamina (concentração final). Esta concentração do inibidor foi estabelecida em experimentos anteriores da nossa equipe de trabalho (MEDEIROS, 2020). O crescimento bacteriano foi monitorado por meio da densidade ótica do cultivo medido em espectrofotômetro no comprimento de onda de 600 nanômetros (D.O._{600nm}), em intervalos de tempo pré-determinadas para caracterização das fases de crescimento.

Cultivo bacteriano para extração de RNA e conversão em cDNA

Com a finalidade de se obter amostras para o RT-qPCR, foram preparadas culturas bacterianas. Os pré-inóculos foram feitos da mesma forma descrita para o experimento de curva de crescimento. Foram feitos nove inóculos, com o volume de 50 mL de LB cada um; nos três primeiros foram adicionados apenas 333 µL do pré-inóculo da cepa de *K. pneumoniae* selvagem, e nos outros 6 inóculos foram adicionadas 333 µL do pré-inóculo da cepa mutante *speA*. Após todos os inóculos atingirem D.O._{600nm} de 0,5, foram adicionados 5 mM de diciclohexilamina (concentração final) em 3 inóculos que continham a cepa mutante. Após a adição do inibidor, os 9 inóculos foram devolvidos para a incubadora, e deixadas por mais 1 hora de incubação. Após este período, os pellets de bactérias foram isolados dos inóculos por meio de centrifugação e submetidos à extração de RNA total.

A extração de RNA foi efetuada com o kit *TRIzolTM MaxTM Bacterial RNA Isolation Kit* (Invitrogen/ThermoFisher Scientific), conforme as instruções do fabricante. Após a extração, o RNA extraído foi mensurado em espectrofotômetro, para checar a qualidade do RNA extraído e para quantificar a sua concentração. Em seguida, o RNA foi submetido ao tratamento com DNase e, depois, convertido em cDNA pelo kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit* (Applied BiosystemsTM/ThermoFisher Scientific), conforme instruções do fabricante.

RT-qPCR

O cDNA sintetizado foi quantificado em espectrofotômetro, sendo utilizados 100 ng nas reações de PCR em tempo real, utilizando-se o kit *Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG* (Applied Biosystems) no equipamento *Real-Time PCR System 7300 Applied Biosystems*. Foram investigados os genes *potD*, *potF*, *speE*, e *speC*, sendo utilizado como controle endógeno o gene *rho* de *K. pneumoniae*, que codifica um fator de terminação da transcrição (GOMES et al., 2018).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As poliaminas são de suma importância e estão envolvidas em diversas funções nas células bacterianas como na expressão gênica, crescimento celular, resposta ao estresse, e divisão celular. A concentração de poliaminas na célula bacteriana é delicadamente equilibrada pelos sistemas de captação do meio extracelular e pelas vias de biossíntese deste nutriente. Por este motivo, estes mecanismos são excelentes alvos para a compreensão do papel das poliaminas (GEVREKCI, 2017).

Estudos de Mattila e colaboradores (1984) mostraram que a diciclohexilamina inibiu o crescimento de diferentes bactérias, provocando a redução da concentração de espermidina pela inibição da enzima espermidina sintase, e que o crescimento pode ser retomado com a suplementação desta poliamina. Esta inibição também pode apresentar diferenças de sensibilidade por distintas bactérias, sugerindo o bloqueio parcial da espermidina sintase nas bactérias mais resistentes à droga.

Como demonstra a Figura 3, em *K. pneumoniae* não houve diferença significativa no crescimento bacteriano das cepas parental e mutante *speA*. Porém, quando a cepa mutante foi cultivada na presença do inibidor diciclohexilamina – isto é, quando a via de biossíntese de poliaminas é inibida em dois pontos distintos da via (mutação do gene *speA* com adição de diciclohexilamina) houve prejuízo expressivo de crescimento da bactéria, mostrando que as poliaminas são necessárias para o crescimento celular em *K. pneumoniae*.

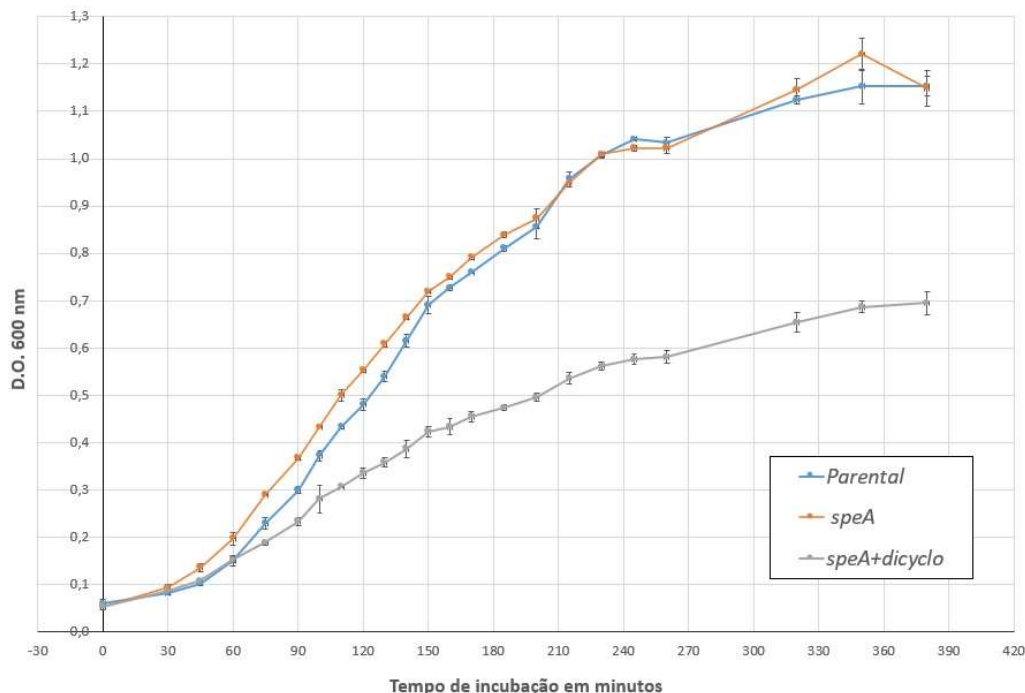


Figura 3: Curva de crescimento das condições LB, mutante *speA* e mutante *speA* com adição de d ciclohexilamina em *K. pneumoniae*.

A redução da concentração de poliaminas, por mutação em genes de sua via de biossíntese, causa a redução da taxa de crescimento em diversas espécies bacterianas (GEVREKCI, 2017). Porém, no presente estudo, apenas a mutação do gene *speA* não foi suficiente para causar alteração no padrão de crescimento bacteriana. Os resultados aqui apresentados confirmam a similaridade com o experimento de Patel e colaboradores (2006) com a bactéria *Yersinia pestis*, na qual não houve prejuízo do crescimento bacteriano de uma cepa mutante para o gene *speA*. Com base neste resultado, pode-se sugerir a compensação deste bloqueio na enzima SpeA por uma via alternativa de síntese de poliaminas e/ou aumento da captação dessas moléculas do meio extracelular.

O nocaute do gene *potD* em pneumococo do tipo 3 reduziu a virulência da bactéria em ensaios in vivo. Além disso, a imunização de camundongos com a proteína PotD conferiu proteção aos animais contra colonização, pneumonia pneumocócica e sepse (RAI et al., 2016).

Estudos de Shah e colaboradores (2008) mostraram que os níveis de RNA mensageiro do receptor de poliaminas PotD aumentou de 2 a 4 vezes quando a bactéria *Streptococcus pneumoniae* foi submetida a condições adversas como o crescimento na temperatura de 34°C e 42°C. Além disso, análises de citometria de fluxo comprovaram que o aumento da transcrição de *potD* resultou em aumento da proteína PotD na superfície celular bacteriana durante esta parte do experimento, o que pode indicar que o aumento da captação de poliaminas contribui para a resposta a estas condições de estresse.

Antognoni et al. (1999) demonstraram que em *E. coli* a espermidina é um regulador negativo do operon *potABC*. Na presença de 8 mM de espermidina, ocorreu uma inibição de 50% da transcrição do gene *potD*, porém não afetando a transcrição de *potA* ou *potF*.

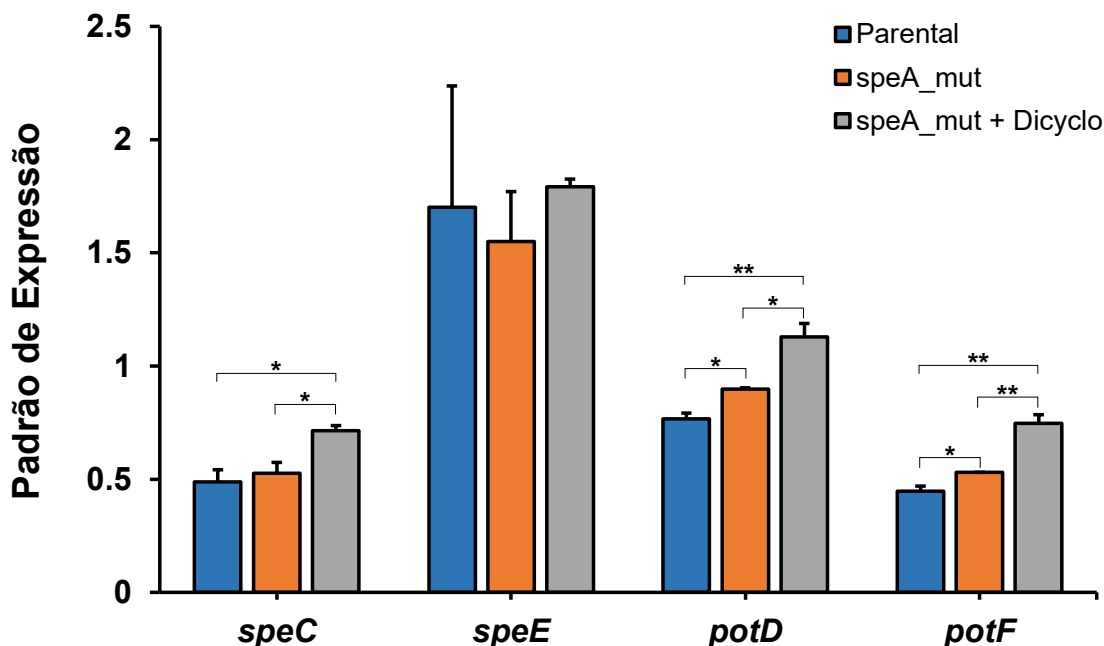


Figura 4: Padrão de expressão dos genes *speC* e *speE*, das vias de síntese de poliaminas, e *potD* e *potF*, das vias de captação de poliaminas, nas cepas de *K. pneumoniae* selvagem (parental), mutante para o gene *speA* (*speA_mut*), e cepa mutante *speA* cultivada na presença do inibidor diciclohexilamina. Os asteriscos indicam valores estatisticamente significativos (* = p -value < 0.05; ** = p -value ≤ 0.01).

A Figura 4 mostra os resultados dos experimentos de expressão gênica com a bactéria *K. pneumoniae* realizados no presente estudo. Os resultados mostram que não há diferenças estatisticamente significativas na expressão do gene *speE* nas cepas de *K. pneumoniae* selvagem (parental), mutante *speA*, e mutante *speA* cultivada na presença de diciclohexilamina.

Analisando a expressão do gene *speC*, observa-se que houve diferença estatística quando a cepa parental é comparada com a cepa mutante *speA* cultivada na presença de diciclohexilamina (p -value de 0.043), e da cepa mutante *speA* comparada com a mutante *speA* cultivada na presença de diciclohexilamina (p -value de 0.048). Este resultado indica uma maior indução do gene *speC* quando há duplo bloqueio na via de biossíntese de poliaminas, atingindo níveis onde há prejuízo mais proeminente ao crescimento celular, desencadeando assim um aumento da produção de putrescina.

Com relação aos genes que codificam receptores de captação de poliaminas exógenas, observa-se aumento estatisticamente significativo da expressão dos genes *potD* e *potF* na cepa mutante, tanto na ausência (p -value de 0.0231 para o gene *potD* e p -value de 0,0413 para o gene *potF*) quanto na presença do inibidor diciclohexilamina (p -value de 0.0128 para o gene *potD* e p -value de 0,0096 para o gene *potF*) quando comparadas ao resultado observado na cepa parental.

Também houve aumento significativo na expressão dos genes *potD* e *potF* na cepa mutante *speA* cultivada com diciclohexilamina, quando compara à cepa mutante (p -value de 0.0256 para o gene *potD* e 0,0108 para o gene *potF*). Constata-se, também, que o gene *potD*,

que codifica o receptor específico para captação de espermidina, tem a expressão mais induzida que o gene *potF*, que codifica o receptor de putrescina, em todas as condições investigadas.

Estes resultados permitem sugerir uma autorregulação da *K. pneumoniae* em situações de escassez de poliaminas, em que há um aumento da expressão dos sistemas de captação de poliaminas exógenas para tentar manter a homeostase desta molécula no ambiente intracelular das bactérias. Pode-se também teorizar ao analisar os dados obtidos nas análises de expressão gênica que a bactéria pode ter aumentado a expressão de *speC*, gene responsável pela produção da enzima ornitina descarboxilase, para compensar o bloqueio da enzima arginina descarboxilase juntamente com o bloqueio da enzima espermidina sintase na cepa mutante com adição de diciclohexilamina. Assim, a escassez de poliaminas em diferentes graus pode ter estimulado a superexpressão do sistema de captação pelos receptores PotD e PotF.

De acordo com estudos anteriores, o receptor PotF seria específico para captação de putrescina, porém estes resultados mostraram que quando a enzima espermidina sintase é bloqueada a cepa mutante, inesperadamente, tem uma maior expressão também do *potF*. Neste caso, pode-se supor que a putrescina se apresentaria com concentração constante em relação à cepa mutante sem o mesmo tratamento, o que sugeriria estudos mais aprofundados para explicar este aumento de expressão. Por outro lado, houve o aumento progressivo da expressão de *potD* com o bloqueio da via principal de biossíntese de espermidina (arginina descarboxilase), e maior ainda quando feito o bloqueio duplo.

CONCLUSÃO

Com resultados obtidos nestes experimentos pode-se sugerir que, assim como em *Yersinia pestis*, a *Klebsiella pneumoniae* mantém suas funções biológicas com quantidades de poliaminas reduzidas, apenas ativando mecanismos compensatórios – como a via alternativa de conversão da L-ornitina em putrescina – quando estão em concentrações críticas. Esta manutenção de atividades biológicas na condição da cepa mutante sem adição de diciclohexilamina pode ocorrer pelo aumento da expressão gênica dos receptores dos sistemas de captação de poliaminas, na tentativa de suprir o déficit causado pela inibição da enzima arginina descarboxilase, capturando as moléculas que podem estar presentes no meio de cultura. Para a maior compreensão destes mecanismos, pode-se sugerir a quantificação de poliaminas nas cepas analisadas e em situações que remetem aos mecanismos de patogenicidade bacteriana, como por exemplo no biofilme e no sistema de comunicação bacteriana conhecido como *quorum-sensing*. Uma melhor compreensão das vias tanto de síntese quanto de captação de poliaminas pode ser de grande valia, para encontrar novos mecanismos que possam num futuro próximo controlar o crescimento de *K. pneumoniae*, assim como intervir na modulação de suas proteínas, ou até para a geração de candidato vacinal que reduza o grande número de casos de morte e prejuízo à saúde humana e animal.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos são devidos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) por concederem bolsas respectivamente de Iniciação Científica PIBIC/CNPQ à aluna Juliana Baboghlian (Processo número: 118388/2022-3) e de Mestrado à aluna Paloma Aparecida Alves Oliveira (número do processo 88887.642808/2021-00). Agradecimentos

também são devidos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa ao qual este trabalho esteve vinculado (Auxílio Regular à Pesquisa – processo nº 2018/26203-9).

REFERÊNCIAS

ANTOIGNONI, F., DEL DUCA, S., KURAISHI, A., KAWABE, E., FUKUCHI-SHIMOGORI, T., KASHIWAGI, K., & IGARASHI, K. (1999). Transcriptional Inhibition of the Operon for the Spermidine Uptake System by the Substrate-binding Protein PotD. **Journal of Biological Chemistry**, 274(4), 1942–1948. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.4.1942>

GEVREKCI, A. Ö. (2017). The roles of polyamines in microorganisms. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 33(11), 204. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2370-y>

GOMES, A. E. I.; STUCHI, L. P.; SIQUEIRA, N. M. G.; HENRIQUE, J. B.; VICENTINI, R.; RIBEIRO, M. L.; DARRIEUX, M.; FERRAZ, L. F. C. (2018) Selection and validation of reference genes for gene expression studies in *Klebsiella pneumoniae* using Reverse Transcription Quantitative real-time PCR. **Scientific Reports**, 8(1), 9001. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27420-2>

IGARASHI, Kazuei; KASHIWAGI, Keiko. Characteristics of cellular polyamine transport in prokaryotes and eukaryotes. **Plant Physiology and Biochemistry**, [S.L.], v. 48, n. 7, p. 506-512, jul. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.01.017>

IGARASHI, Kazuei; KASHIWAGI, Keiko. Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S.L.], v. 271, n. 3, p. 559-564, maio 2000. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.2000.2601>

MATTILA, T; HONKANEN-BUZALSKI, T; PÖSÖ, H. Reversible inhibition of bacterial growth after specific inhibition of spermidine synthase by dicyclohexylamine. **Biochemical Journal**, [S.L.], v. 223, n. 3, p. 823-830, 1 nov. 1984. Portland Press Ltd. <http://dx.doi.org/10.1042/bj2230823>.

MEDEIROS, A.P. **Estudo do papel das poliaminas na formação de biofilme em *Klebsiella pneumoniae***. 10 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Biomedicina) – Universidade São Francisco, Bragança Paulista, 2020.

PATEL, Chandra N.; WORTHAM, Brian W.; LINES, J. Louise; FETHERSTON, Jacqueline D.; PERRY, Robert D.; OLIVEIRA, Marcos A. Polyamines are essential for the formation of plague biofilm. **Journal of Bacteriology**, [S.L.], v. 188, n. 7, p. 2355-2363, abr. 2006. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.188.7.2355-2363.2006>

RAI, A. N., THORNTON, J. A., STOKES, J., SUNESARA, I., SWIATLO, E., & NANDURI, B. (2016). Polyamine transporter in *Streptococcus pneumoniae* is essential for evading early innate immune responses in pneumococcal pneumonia. **Scientific Reports**, 6(1), 26964. <https://doi.org/10.1038/srep26964>



<http://ensaios.usf.edu.br>

SHAH, P.; SWIATLO, E. A multifaceted role for polyamines in bacterial pathogens. **Molecular Microbiology**, [S.L.], v. 68, n. 1, p. 4-16, abr. 2008. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06126.x>

SHAH, P., ROMERO, D. G., & SWIATLO, E. (2008). Role of polyamine transport in *Streptococcus pneumoniae* response to physiological stress and murine septicemia. **Microbial Pathogenesis**, 45(3), 167–172. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2008.05.001>

WANG, G.; ZHAO, G.; CHAO, X.; XIE, L.; WANG, H. The characteristic of virulence, biofilm and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae*. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, [S.L.], v. 17, n. 17, p. 6278, 28 ago. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph17176278>