



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

**XHAULLA MARIA QUARIGUASI CUNHA FONSECA**

**TRANSCRIPTOMA ASSOCIADO A SOBREVIVÊNCIA DE *Klebsiella*  
*pneumoniae* COM RESISTÊNCIA ESTENDIDA SOB ESTRESSE DE MEROPENEM**

**FORTALEZA**

**2025**

XHAULLA MARIA QUARIGUASI CUNHA FONSECA

TRANSCRIPTOMA ASSOCIADO A SOBREVIVÊNCIA DE *Klebsiella pneumoniae*  
COM RESISTÊNCIA ESTENDIDA SOB ESTRESSE DE MEROPENEM

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Médicas da Universidade Federal do  
Ceará, como requisito parcial à obtenção do grau  
de Doutor em Ciências Médicas.

Área de concentração: Biomedicina

Orientador: Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima

FORTALEZA

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- F748t Fonseca, Xhaulla Maria Quariguasi Cunha.  
Transcriptoma associado a sobrevivência de *Klebsiella Pneumoniae* com resistência estendida sob estresse de meropenem / Xhaulla Maria Quariguasi Cunha Fonseca. – 2025.  
171 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2025.  
Orientação: Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima.
1. Transcritos. 2. Carbapenêmicos. 3. Metabolismo. I. Título.

CDD 610

---

XHAULLA MARIA QUARIGUASI CUNHA FONSECA

TRANSCRIPTOMA ASSOCIADO A SOBREVIVÊNCIA DE *Klebsiella pneumoniae*  
COM RESISTÊNCIA ESTENDIDA SOB ESTRESSE DE MEROPENEM

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciências Médicas.

Área de concentração: Biomedicina.

Aprovado em: 16/07/2025.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Aldo Ângelo Moreira Lima  
(Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Marco Antônio de Freitas  
Clementino  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Jonathas Sales de Oliveira  
Instituto Federal de Educação, Ciência e  
Tecnologia do Ceará (IFCE)

---

Prof. Dr. Renan Vasconcelos da Graça-  
Filho  
Universidade de São Paulo (USP)

---

Prof. Dra. Herlice do Nascimento Veras  
Universidade Estadual do Ceará (UECE)



Às forças divinas que guiaram meus passos.  
À minha mãe, pela base e exemplo de força.  
À Frida, Pagu e Jujuba, por serem amor em forma de presença.  
E a mim, por não desistir.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, às forças divinas, que me ampararam e fortaleceram em cada etapa desta jornada, renovando minha coragem mesmo nos momentos mais desafiadores.

À minha mãe, Mirian, mulher de fibra, dedicação e incansável perseverança — com ela aprendi o valor transformador do estudo e da determinação.

Ao meu pai de coração, Raimundo Silvino, por seu apoio constante, pelo cuidado silencioso e pelo afeto sempre presente.

Aos meus avós, Franco e Conceição, exemplos de honestidade, união e ternura — deles trago não apenas as mais doces lembranças, mas também os valores que me sustentam.

À Géssica, que foi muito mais do que presença ao longo desta jornada. Em cada etapa, ela foi companheira incansável, amiga leal, conselheira sábia e mentora sensível. Esteve ao meu lado nos momentos de cansaço e incerteza, escutando com paciência, encorajando com firmeza e, sobretudo, ajudando-me a reencontrar o foco quando tudo parecia desmoronar. Sua força, generosidade e fé em mim foram pilares sem os quais este doutorado simplesmente não teria sido possível. Minha gratidão é imensa e eterna.

À CAPES e ao CNPq, pelo apoio financeiro aos projetos.

Ao Laboratório de Doenças Infecciosas, ao Laboratório de Toxinologia Molecular, à Fundação Oswaldo Cruz – Ceará e à Universidade Federal do Ceará, pelo suporte que possibilitou a execução deste trabalho.

Ao professor Aldo Ângelo Moreira Lima, agradeço pelo voto de confiança ao aceitar me orientar nesta etapa tão importante da minha trajetória. Sua presença institucional e acompanhamento ao longo do percurso foram significativos para a condução formal deste trabalho. Registro aqui minha gratidão pelo espaço concedido, pela escuta nos momentos necessários e pela parceria acadêmica ao longo dos anos.

Ao professor Marco Antônio de Freitas Clementino, minha profunda gratidão por sua valiosa contribuição, mesmo de forma informal, como coorientador. Sua generosidade, atenção aos detalhes, sugestões precisas e constante disponibilidade foram essenciais para o amadurecimento deste trabalho.

Ao professor Alexandre Havt Bindá, por todo o acolhimento, apoio e enriquecimento ao trabalho com seu olhar científico.

Aos participantes da banca — Prof. Dr. Renan Vasconcelos da Graça-Filho, Prof. Dr. Jonathas Sales de Oliveira e Prof<sup>a</sup>. Dra. Herlice do Nascimento Veras — pelo tempo, disponibilidade e valiosas colaborações.

Aos professores do PPGCM, por todo o aprendizado ao longo desses anos, meu muito obrigada.

Ao LABIOTEC e às técnicas do laboratório, pelo comprometimento, atenção e generosidade com que sempre me auxiliaram.

Aos amigos, Gleiciane, Karol, Cleber, Caroline, Rafaella, Luciana que contribuíram para que este trabalho se concretizasse, minha sincera gratidão.

Aos colegas e amigos que tive a felicidade de conhecer ao longo dos últimos anos de NUBIMED, deixo meu sincero agradecimento. Dividir saberes, vivências e desafios com vocês tornou essa caminhada mais leve, acolhedora e inspiradora.

A todos vocês, meu muito obrigada por contribuírem, de tantas formas, para a construção deste trabalho.

“Ninguém é tão grande que não possa aprender,  
nem tão pequeno que não possa ensinar”.  
(Esopo)

## RESUMO

*Klebsiella pneumoniae* extensivamente resistente é um patógeno oportunista de alta relevância clínica, cuja resistência a carbapenêmicos, especialmente meropenem, compromete severamente as opções terapêuticas disponíveis. Este estudo teve por objetivo elucidar, por meio de análise transcriptômica, os mecanismos moleculares de adaptação de uma cepa produtora de carbapenemase submetida à concentração inibitória mínima (CIM) de meropenem. A cepa, isolada de aspirado traqueal de paciente em UTI e identificada por VITEK® 2, foi caracterizada quanto à sensibilidade antibacteriana por difusão em disco, microdiluição em caldo e método automatizado, revelando CIM de 64 µg/mL para ciprofloxacino, 256 µg/mL para gentamicina e 256 µg/mL para meropenem. Após exposição ao meropenem na CIM, monitorou-se a curva de crescimento até a fase log e extraiu-se RNA total para remoção de rRNA, construção de bibliotecas de cDNA e sequenciamento em plataforma Illumina. A análise diferencial com DESeq2 ( $\log_2$  FC  $\geq 1$  ou  $\leq -1$ ;  $p < 0,05$ ) identificou 312 genes modulados: destacaram-se oito transcritos superexpressos, como o inibidor associado ao ribossomo A, transposase InsK (IS150), D-ribose piranase, transglicosilase/PBP-1C e proteína Maf de septação, e quatro subexpressos, incluindo transportadores ABC e proteína de membrana UPF0118. Além disso, houve reprogramação metabólica marcante: reforço da biossíntese de lipídios e fosfolipídeos para manutenção da membrana, ativação de vias de degradação de carboidratos e flexibilidade na utilização de fontes de carbono, elevação de enzimas do metabolismo aminoacídico (alanina, glicina, glutamina), estímulo das rotas energéticas anaeróbias e aumento da geração de NADPH pela via pentose-fosfato, concomitante à repressão de rotas de síntese de DNA e sistemas de secreção. Esses achados revelam uma estratégia adaptativa multifacetada, em que *K. pneumoniae* XDR reestrutura funções metabólicas e mecanismos de defesa para sobreviver sob intensa pressão antibiótica, apontando potenciais alvos para intervenções farmacológicas.

**Palavras-chave:** Transcritos. Carbapenêmicos. Metabolismo. Morfologia.

## ABSTRACT

Extensively drug-resistant *Klebsiella pneumoniae* is an opportunistic pathogen of high clinical relevance, whose resistance to carbapenems—especially meropenem—severely compromises available therapeutic options. This study aimed to elucidate, via transcriptomic analysis, the molecular adaptation mechanisms of a carbapenemase-producing strain subjected to the minimum inhibitory concentration (MIC) of meropenem. The strain, isolated from a tracheal aspirate of an ICU patient and identified by VITEK® 2, was characterized for antibiotic susceptibility by disk diffusion, broth microdilution, and automated methods, showing MICs of 64 µg/mL for ciprofloxacin, 256 µg/mL for gentamicin, and 256 µg/mL for meropenem. After exposure to meropenem at its MIC, growth was monitored until log phase, total RNA was extracted for rRNA depletion, cDNA library preparation, and sequencing on an Illumina platform. Differential expression analysis with DESeq2 ( $\log_2$  fold change  $\geq 1$  or  $\leq -1$ ;  $p < 0.05$ ) identified 312 modulated genes: eight transcripts were significantly upregulated—including the ribosome-associated inhibitor A, InsK transposase (IS150), D-ribose pyranase, penicillin-insensitive transglycosylase/PBP-1C, and the septation protein Maf—while four were downregulated, such as ABC transporters and the membrane protein UPF0118. Moreover, marked metabolic reprogramming was observed: enhanced lipid and phospholipid biosynthesis to maintain membrane integrity; activation of carbohydrate degradation pathways and flexibility in carbon source utilization; increased expression of amino acid metabolism enzymes (alanine, glycine, glutamine); stimulation of anaerobic energy-generating pathways and elevated NADPH production via the pentose-phosphate pathway; and concurrent repression of DNA synthesis routes and secretion systems. These findings reveal a multifaceted adaptive strategy by which XDR *K. pneumoniae* restructures metabolic functions and defense mechanisms to survive intense antibiotic pressure, highlighting potential targets for pharmacological intervention.

**Keywords:** Transcripts. Carbapenems. Metabolism. Morphology.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>AI-2</i>	<i>Autoinducer-2</i>
<i>AmpC</i>	$\beta$ -lactamase AmpC
<i>blaCTX-M</i>	Gene de $\beta$ -lactamase de espectro estendido CTX-M
<i>blaIMP</i>	Gene de resistência metallo- $\beta$ -lactamase IMP
<i>blaKPC</i>	Gene de resistência a carbapenemase de <i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>blaNDM</i>	Gene de resistência a metallo- $\beta$ -lactamase New Delhi
<i>blaOXA-48</i>	Gene de resistência a carbapenemase OXA-48
<i>blaSHV</i>	Gene de $\beta$ -lactamase SHV
<i>blaTEM</i>	Gene de $\beta$ -lactamase TEM
CIM	Concentração Inibitória Mínima
cKp	Cepa clássica de <i>Klebsiella pneumoniae</i>
DG	Decil- $\beta$ -D-glucopiranosídeo
<i>EPS</i>	<i>Extracellular polymeric substances</i>
<i>ESBL</i>	<i>Extended-spectrum <math>\beta</math>-lactamases</i> ( $\beta$ -lactamases de espectro estendido)
<i>fimH</i>	Gene associado às fímbrias tipo 1
<i>hvKp</i>	Cepa hipervirulenta de <i>Klebsiella pneumoniae</i>
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de carbapenemase
<i>KpSC</i>	<i>Klebsiella pneumoniae Species Complex</i>
LPS	Lipopolissacarídeos
<i>lsrB</i>	Gene regulador de sinalização AI-2
<i>lsrD</i>	Gene regulador de sinalização AI-2
<i>MDR</i>	<i>Multidrug-resistant</i>
<i>MIC</i>	<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>
<i>mrkABCD</i>	Genes associados às fímbrias tipo 3
NDM	New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase

OXA	Oxacillinase
<i>PBPs</i>	<i>Penicillin-binding proteins</i>
PEG	Polietilenoglicol
<i>phoPQ</i>	Genes envolvidos na modificação de LPS
<i>pmrAB</i>	Genes que regulam a resistência ao polimixinas
<i>PSM</i>	<i>Polysaccharide matrix</i>
<i>RND</i>	<i>Resistance Nodulation cell Division</i>
RNA-Seq	Sequenciamento de RNA de alto rendimento
sRNA-120	RNA regulador associado à expressão de bombas de efluxo
<i>ST</i>	<i>Sequence type</i>
ST11	Clone epidêmico de <i>Klebsiella pneumoniae</i>
ST147	Clone epidêmico de <i>Klebsiella pneumoniae</i>
ST258	Clone epidêmico de <i>Klebsiella pneumoniae</i>
Tn4401	Transposon associado ao gene <i>blaKPC</i>
<i>tmexCD-toprJ</i>	Genes associados à resistência antimicrobiana plasmídica
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VITEK®	Sistema automatizado de identificação e sensibilidade antimicrobiana
<i>XDR</i>	<i>Extensively drug-resistant</i>



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Fatores de virulência de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	21
Figura 2.	Principais mecanismos de resistência de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	29
Figura 3.	Fluxograma dos experimentos realizados	35
Figura 4.	Sensibilidade de <i>Klebsiella pneumoniae</i> a meropenem, ciprofloxacino e gentamicina pelo método de disco-sifusão.	44
Figura 5.	Curva de crescimento de <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de carbapenemase em 12 horas	47
Figura 6.	Curva de crescimento de <i>Klebsiella pneumoniae</i> pós-exposição à diferentes concentrações de CIM de meropenem, gentamicina e ciprofloxacino.	48
Figura 7.	Expressão diferencial de transcritos de <i>Klebsiella pneumoniae</i> pós exposição ao meropenem.	50
Figura 8.	Expressão gênica em diferentes vias metabólicas em <i>Klebsiella pneumoniae</i> pós exposição ao Meropenem.	53
Figura 9.	Análise da expressão Gênica em <i>Klebsiella pneumoniae</i> pós exposição a CIM de Meropenem.	54
Figura 10.	Adaptações morfofuncionais em <i>Klebsiella pneumoniae</i> pós exposição a CIM de Meropenem.	56
Figura 11.	Vias metabólicas ativadas em <i>K. pneumoniae</i> após exposição a CIM de meropenem	57

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Concentração Inibitória Mínima ( $\mu\text{g/ml}$ ) de meropenem, ciprofloxacino e gentamicina frente <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de carbapenemase.....	45
Tabela 2 .	Concentração Inibitória Mínima ( $\mu\text{g/ml}$ ) de diferentes antimicrobianos por método automatizado VITEK®.....	45
Tabela 3.	Transcritos de genes expressos 2x mais em <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de carbapenemase exposta a CIM de meropenem.....	83
Tabela 4.	Transcritos de genes expressos 2x menos em <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de carbapenemase exposta a CIM de meropenem.....	98
Tabela 5.	Transcritos associados a estresse oxidativo em <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de carbapenemase exposta a CIM de meropenem.....	100
Tabela 6.	Transcritos associados a transportadores de membrana em <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de carbapenemase exposta a CIM de meropenem.....	100
Tabela 7.	Transcritos associados a fatores de transcrição em <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de carbapenemase exposta a CIM de meropenem.....	103
Tabela 8.	Transcritos associados a proteínas de função desconhecida em <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de carbapenemase exposta a CIM de meropenem.....	105
Tabela 9.	Transcritos associados à modificações em parede celular em <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de carbapenemase exposta a CIM de meropenem.....	106
Tabela 10.	Transcritos associados a conjugação e fatores plasmidiais de resistência em <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de carbapenemase exposta a CIM de meropenem.....	107
Tabela 11.	Transcritos associados a modificações em DNA de <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de carbapenemase exposta a CIM de meropenem.....	108
Tabela 12.	Transcritos associados a proteínas hipotéticas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de carbapenemase exposta a CIM de meropenem.....	108
Tabela 13.	Transcritos associados a modificações em membrana plasmática de <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de carbapenemase exposta a CIM de meropenem.....	110
Tabela 14.	Transcritos associados a motilidade de <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de carbapenemase exposta a CIM de meropenem.....	112

Tabela 15.	Transcritos associados a bomba de efluxo de <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de carbapenemase exposta a CIM de meropenem.....	112
Tabela 16.	Transcritos associados ao metabolismo de ácidos graxos e congêneres em <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de carbapenemase exposta a CIM de meropenem.....	113
Tabela 17.	Transcritos associados ao metabolismo de carboidrato e congêneres de <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de carbapenemase exposta a CIM de meropenem.....	114
Tabela 18.	Transcritos associados ao metabolismo proteico de <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de carbapenemase exposta a CIM de meropenem.....	117
Tabela 19.	Transcritos associados ao metabolismo energético de <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de carbapenemase exposta a CIM de meropenem.....	118
Tabela 20.	Transcritos associados à produção de metabólitos secundário de <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de carbapenemase exposta a CIM de meropenem.....	121
Tabela 21.	Transcritos associados ao metabolismo de ácidos nucleicos de <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de carbapenemase exposta a CIM de meropenem.....	123
Tabela 22.	Transcritos associados às vias metabólicas de vitaminas e minerais de <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de carbapenemase exposta a CIM de meropenem.....	123

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
<b>1.1</b>	<b><i>Klebsiella pneumoniae</i>.....</b>	<b>18</b>
<b>1.1.1</b>	<b><i>Morfofisiologia</i>.....</b>	<b>19</b>
<b>1.1.2</b>	<b><i>Metabolismo energético de Klebsiella pneumoniae</i>.....</b>	<b>19</b>
<b>1.1.3</b>	<b><i>Fatores de virulência de Klebsiella pneumoniae</i>.....</b>	<b>21</b>
<b>1.1.4</b>	<b><i>Antimicrobianos nas infecções por Klebsiella pneumoniae</i>.....</b>	<b>24</b>
<b>1.2</b>	<b>Mecanismos de resistência de <i>Klebsiella pneumoniae</i>.....</b>	<b>29</b>
<b>1.2.1</b>	<b><i>Produção de <math>\beta</math>-lactamases</i>.....</b>	<b>30</b>
<b>1.2.2</b>	<b><i>Bomba de efluxo</i>.....</b>	<b>31</b>
<b>1.3</b>	<b>Ciências ômicas no estudo da resistência antimicrobiana.....</b>	<b>31</b>
<b>1.4</b>	<b>Justificativa.....</b>	<b>33</b>
<b>2</b>	<b>HIPÓTESES.....</b>	<b>34</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>34</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo Geral.....</b>	<b>34</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos Específicos.....</b>	<b>34</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>35</b>
<b>4.1</b>	<b>Local do estudo.....</b>	<b>35</b>
<b>4.2</b>	<b>Fluxograma dos experimentos.....</b>	<b>35</b>
<b>4.3</b>	<b>Obtenção e identificação dos isolados bacterianos.....</b>	<b>36</b>
<b>4.4</b>	<b>Antibacterianos.....</b>	<b>37</b>
<b>4.5</b>	<b>Teste de sensibilidade aos antibacterianos.....</b>	<b>37</b>
<b>4.5.1</b>	<b><i>Disco-difusão</i>.....</b>	<b>38</b>
<b>4.5.2</b>	<b><i>Microdiluição em caldo</i>.....</b>	<b>38</b>
<b>4.5.3</b>	<b><i>Método automatizado VITEK®</i>.....</b>	<b>39</b>
<b>4.6</b>	<b>Curva de crescimento de <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de carbapenemases.....</b>	<b>39</b>
<b>4.7</b>	<b>Curva de crescimento de <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de carbapenemases expostas a diferentes concentrações de antibacterianos.....</b>	<b>40</b>
<b>4.8</b>	<b>Análise dos transcritos de <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de carbapenemases expostas a Meropenem.....</b>	<b>40</b>
<b>4.8.1</b>	<b><i>Extração de RNA e remoção de rRNA</i>.....</b>	<b>40</b>

4.8.2	<i>Avaliação da qualidade da amostra.....</i>	41
4.8.3	<i>Construção de biblioteca de cDNA e sequenciamento de RNA-seq.....</i>	42
4.8.4	<i>Processamento e análises de expressão diferencial.....</i>	42
4.8.5	<i>Agrupamento de genes e transcritos.....</i>	42
4.9	<i>Análises estatísticas.....</i>	43
5	<b>RESULTADOS.....</b>	43
5.1	<b>Ensaio de sensibilidade aos antimicrobianos.....</b>	43
5.1.1	<i>Disco-difusão.....</i>	43
5.1.2	<i>Microdiluição em caldo.....</i>	44
5.1.3	<i>Método automatizado VITEK®.....</i>	45
5.2	<b>Curva de crescimento de <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de carbapenemases.....</b>	46
5.3	<b>Curva de crescimento de <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de carbapenemases expostas a diferentes concentrações de antibacterianos.....</b>	48
5.4	<b>Modificação de transcritos de <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de carbapenemases pós-exposição a Meropenem.....</b>	49
5.5	<b>Modificação na expressão gênica de <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de carbapenemase pós-exposição a Meropenem.....</b>	52
6	<b>DISCUSSÃO.....</b>	57
7	<b>CONCLUSÃO GERAL.....</b>	68
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	69
	<b>ANEXO A – Tabelas de detalhamento do transcritos de genes expressos 2x.....</b>	83
	<b>ANEXO B – Artigo técnico submetido a Molecular Microbiology.....</b>	125
	<b>ANEXO C – Artigo técnico.....</b>	150
	<b>ANEXO D – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa ao Projeto Resistência.....</b>	170
	<b>ANEXO E – Comprovante de submissão do artigo técnico do anexo B.....</b>	171

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1 *Klebsiella pneumoniae*

O gênero *Klebsiella* foi descoberto no final do século XIX, e deriva do nome do microbiologista alemão Edwin Klebs. Inicialmente, as bactérias deste gênero foram reconhecidas como um patógeno oportunista, responsável por infecções pulmonares graves, especialmente em indivíduos imunocomprometidos, entretanto *Klebsiella* sp. tornou-se um grupo de patógenos de importância médica devido à sua capacidade de adquirir resistência a múltiplos antimicrobianos, o que dificultou o tratamento de infecções (Paczosa; Mecsas, 2016; Dong et al., 2022).

*Klebsiella* sp. pertencem ao filo Pseudomonadota, à classe Gammaproteobacteria, ordem Enterobacterales, e família Enterobacteriaceae. O gênero inclui diversas espécies, como *Klebsiella aerogenes*, *Klebsiella oxytoca*, entre outros, destacando-se o complexo de espécies *Klebsiella pneumoniae* (KpSC), que engloba *K. pneumoniae*, *K. variicola* e *K. quasipneumoniae*, sendo *K. pneumoniae* a mais associada a infecções nosocomiais, sendo um importante patógeno em ambientes hospitalares (Choby et al., 2020; Rodriguez-Medina et al., 2024; Prasad et al., 2022).

Morfologicamente, *Klebsiella pneumoniae* é um bacilo Gram-negativo, encapsulado e imóvel. Suas colônias apresentam uma aparência mucoviscosa e brilhante, frequentemente de coloração esbranquiçada a cinza, devido à produção abundante de cápsula polissacarídica. Essas características ajudam a diferenciá-la em meios de cultivo seletivos e diferenciais, como o *Klebsiella Blue Agar*, que facilita sua identificação (Paczosa; Mecsas, 2016; Prasad et al., 2022).

*Klebsiella pneumoniae* pode ser encontrada em diferentes habitats, incluindo solo, água e superfícies hospitalares, além de colonizar mucosas humanas e animais. Essa bactéria é responsável por uma grande parcela das infecções nosocomiais, como pneumonia, infecções do trato urinário e associadas a septicemia. Estudos epidemiológicos mostram que infecções por cepas de *K. pneumoniae* resistentes a antimicrobianos são especialmente prevalentes em ambientes hospitalares e podem levar a altos índices de mortalidade (Venezia et al., 2017; Rodriguez-Medina et al., 2024).

Para estabelecer infecção, *K. pneumoniae* é dotada de uma gama de fatores de virulência, os quais incluem cápsula polissacarídica, lipopolissacarídeos, fimbrias, produção de biofilme e sideróforos, que ajudam a bactéria a evadir o sistema imunológico e a colonizar diferentes tecidos. Além disso, plasmídeos com genes de resistência são amplamente

distribuídos, o que resulta em cepas que produzem enzimas como  $\beta$ -lactamases, em especial carbapenemases, dificultando o tratamento e tornando esta espécie uma preocupação global de saúde (Navon-Venezia et al., 2017; Dong et al., 2022).

### **1.1.1 Morfofisiologia**

*Klebsiella pneumoniae* é um bastonete e tem tamanho que varia entre 1-2  $\mu\text{m}$  de comprimento e 0,5-0,8  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Sua afinidade tintorial em Gram revela uma coloração rosa devido à sua parede celular delgada em peptidoglicano e rica em lipopolissacarídeos (LPS), sendo Gram negativa (Paczosa; Mecsas, 2016; Khadka et al., 2023).

Estruturalmente, a membrana plasmática de *K. pneumoniae* é composta por uma bicamada lipídica que contém proteínas de transporte e receptores importantes para a resistência aos antimicrobianos, enquanto a parede celular delgada é formada por peptidoglicanos e uma camada externa de lipopolissacarídeos (LPS), que atua como um fator de virulência ao proteger contra a fagocitose. Além disso, a cápsula, composta por polissacarídeos, confere uma alta mucoviscosidade, o que dificulta a ação do sistema imunológico do hospedeiro e contribui para a virulência (Khadka et al., 2023; Russo; Marr, 2019).

Para o crescimento, isolamento e identificação de *K. pneumoniae*, são utilizados meios de cultivo como ágar MacConkey, que ajuda a distinguir as colônias devido à fermentação da lactose, onde crescem colônias geralmente são grandes, úmidas e de aparência mucosa e coloração rosada (Wang et al., 2020; Russo; Marr, 2019). Além disso, *K. pneumoniae* possui diversos fatores de virulência que serão detalhados no tópico adiante.

### **1.1.2 Metabolismo energético de *Klebsiella pneumoniae***

O metabolismo energético de *Klebsiella pneumoniae* envolve a capacidade de utilizar condições aeróbias e anaeróbias, o que confere uma vantagem significativa em ambientes variados. Em condições aeróbias, a bactéria usa oxigênio como aceptor final de elétrons, facilitando a oxidação completa de substratos como glicerol e glicose, gerando uma maior quantidade de ATP. Em condições anaeróbias, no entanto, *K. pneumoniae* recorre ao metabolismo fermentativo, convertendo compostos como glicerol em produtos fermentativos como 1,3-propanodiol, lactato e etanol, produzindo menos ATP, mas garantindo a regeneração de  $\text{NAD}^+$ , essencial para a continuidade do metabolismo. Esse tipo de flexibilidade metabólica permite que a bactéria prospere em ambientes com baixo ou nenhum oxigênio, tornando-a uma

espécie com grande potencial de plasticidade metabólica e resistência antimicrobiana, principalmente sob pressão antibiótica (Kumar e Park, 2018; Celińska, 2012).

*K. pneumoniae* também possui um sistema eficiente para o metabolismo de lipídeos, o qual desempenha um papel crucial em sua sobrevivência em ambientes com variações osmóticas e de temperatura. A membrana lipídica da bactéria contém proteínas e lipídios que conferem resistência osmótica, e a inserção de moléculas como o do Decil- $\beta$ -D-glucopiranosídeo (DG) e polietileno glicol (PEG) melhora ainda mais a tolerância da membrana à osmose. Estes aditivos atuam aumentando a permeabilidade da membrana e estabilizando a estrutura lipídica, facilitando a regulação osmótica. Estudos mostraram que a manipulação da camada lipídica de *K. pneumoniae* por adição de agentes osmoprotetores pode ser uma abordagem promissora para sua adaptação em condições extremas, o que pode ser utilizada pela bactéria sob estresse (Dai et al., 2025).

O metabolismo proteico em *K. pneumoniae* envolve diversas enzimas que auxiliam na degradação e síntese de proteínas essenciais para a manutenção celular. Este processo inclui a quebra de proteínas complexas em aminoácidos que são reciclados para a síntese de novas proteínas, essenciais para o crescimento e replicação bacteriana. A regulação do metabolismo de proteínas é ajustada através de fatores de transcrição específicos, que respondem às mudanças no ambiente, como a disponibilidade de nutrientes e a presença de condições estressantes (El-Mansi, 2023). Já no metabolismo de ácidos nucleicos, *K. pneumoniae* possui vias bioquímicas que permitem a síntese e degradação de DNA e RNA para adaptação a diferentes condições ambientais. Genes responsáveis por esse processo são regulados por complexos de proteínas que detectam sinais ambientais, ativando vias de síntese de nucleotídeos para a replicação e reparo do DNA. Esse sistema é vital para a proliferação e resistência da bactéria, especialmente quando exposta a condições desfavoráveis que induzem mutações ou danos ao DNA (Halfmann et al., 2012).

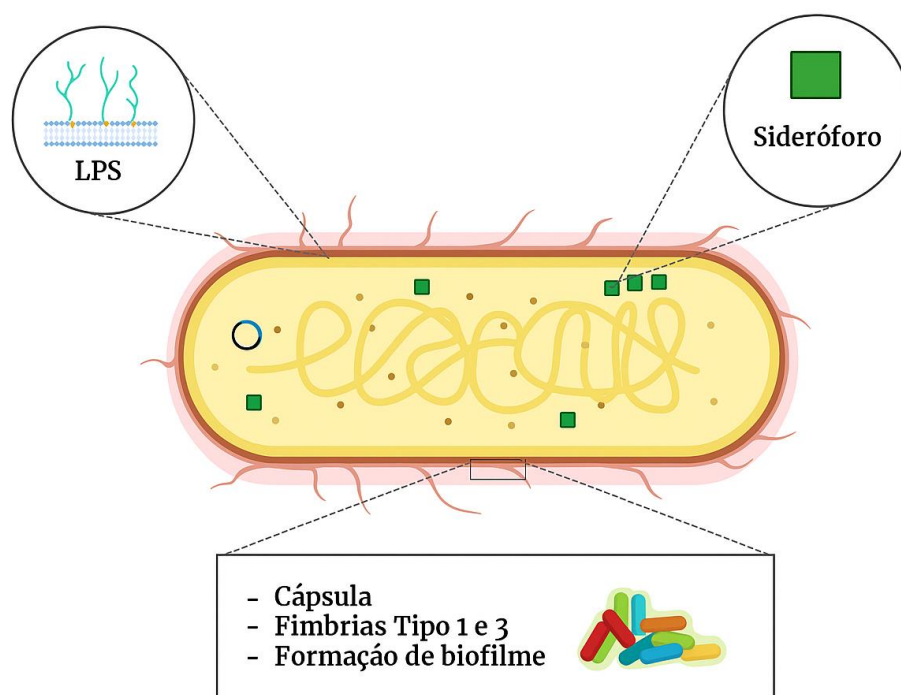
Nesse contexto geral, as principais vias metabólicas em *K. pneumoniae* incluem a glicólise, o ciclo do ácido cítrico e vias de fermentação, que são ajustadas para maximizar a produção de energia e biomassa em diferentes condições. A flexibilidade entre essas vias metabólicas oferece a *K. pneumoniae* uma vantagem competitiva em ambientes variados (Sparbier et al., 2012; Kumar e Park, 2018).



### 1.1.3 Fatores de virulência de *Klebsiella pneumoniae*

O arsenal de virulência de *K. pneumoniae* está fortemente relacionado à patogênese das infecções causadas por essa bactéria, que incluem: a cápsula polissacarídica, LPS, sideróforos e fímbrias, as quais participam da formação de biofilmes (Figura 1). A cápsula, por exemplo, protege a bactéria contra a fagocitose e os ataques do sistema imunológico, enquanto os LPS ajudam a desencadear respostas inflamatórias que podem facilitar a disseminação da bactéria. Além disso, a produção de sideróforos permite que *K. pneumoniae* adquira ferro de ambientes onde este nutriente é escasso, facilitando sua sobrevivência e proliferação (Russo; Marr, 2019; Khadka et al., 2023; Dai; Hu, 2022).

Figura 1. Fatores de virulência de *Klebsiella pneumoniae*



Legenda: Principais fatores de virulência de *K. pneumoniae*, incluindo cápsula polissacarídica, lipopolissacarídeos (LPS), fímbrias tipo 1 e 3, sideróforos e formação de biofilme. Esses elementos atuam de forma sinérgica para favorecer a colonização, evasão da resposta imune e estabelecimento de infecções invasivas, além de contribuir para a resistência antimicrobiana. Fonte: autoria própria, 2025.

Devido a esse arsenal de virulência, muitos estudos tem sido realizados acerca das cepas hipervirulentas de *K. pneumoniae* (hvKp). Nesse contexto, as cepas dessas bactérias

podem ser classificadas em duas categorias principais: as virulentas clássicas (cKp) e as hipervirulentas. As cKp são tipicamente associadas a infecções nosocomiais e acometem principalmente pacientes imunocomprometidos, causando infecções do trato urinário, pneumonia e septicemia. Em contrapartida, as hvKp possuem características que as tornam capazes de infectar indivíduos saudáveis, causando doenças mais invasivas e severas, como abscessos hepáticos e meningite. Genes que codificam sideróforos como aerobactina, salmochelina e yersiniabactina são mais comumente encontrados em cepas hvKp do que em cKp, conferindo-lhes uma maior capacidade de aquisição de ferro, o que é crucial para seu crescimento e sobrevivência (Choby et al., 2020; Dai; Hu, 2022; Staton et al., 2024).

Para além dessa classificação, características morfológicas de *K. pneumoniae* têm sido descritas como fatores de virulência, como os lipopolissacarídeos (LPS), que são componentes essenciais de sua membrana externa e são compostos por três partes principais: o lipídeo A, o núcleo polissacarídico e a cadeia O-antigênica. O lipídeo A é responsável por desencadear a resposta inflamatória no hospedeiro, muitas vezes levando a quadros de choque séptico. Além disso, a modificação de LPS pode reduzir a afinidade de antibióticos polimixinas, contribuindo para a resistência antimicrobiana (Wang et al., 2020; Russo; Marr, 2019).

A cápsula é um dos mais importantes fatores de virulência de *K. pneumoniae*. Formada por uma camada de polissacarídeos, a cápsula cria uma barreira física que protege a bactéria da fagocitose e de outros mecanismos de defesa do sistema imunológico. A presença de uma cápsula bem estruturada não só aumenta a resistência da bactéria às respostas imunes do hospedeiro, mas também melhora sua capacidade de sobreviver em ambientes hostis, o que torna a cápsula um alvo importante para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (Khadka et al., 2023; Russo; Marr, 2019). Em relação aos plasmídeos, estes também podem conter genes que aumentam a produção de cápsulas e sideróforos, o que facilita a sobrevivência e disseminação da bactéria (Hawkey et al., 2022; Yang et al., 2022).

*Klebsiella pneumoniae* é conhecida por sua capacidade de produzir uma ampla gama de enzimas que conferem resistência a antibióticos, sendo as  $\beta$ -lactamases, entre elas carbapenemase, as mais significativas. As  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBLs), como as produzidas pelos genes blaTEM, blaSHV e blaCTX-M, são responsáveis pela degradação de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, incluindo penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos. As ESBLs são particularmente preocupantes em ambientes hospitalares, onde o uso frequente de antimicrobianos facilita a seleção e proliferação de cepas resistentes, levando a surtos de infecções nosocomiais (Yang et al., 2021; Dai; Hu, 2022).

Além das ESBLs, *K. pneumoniae* também é capaz de produzir outras  $\beta$ -lactamases importantes, como AmpC. As  $\beta$ -lactamases AmpC são enzimas que conferem resistência a uma ampla gama de  $\beta$ -lactâmicos, incluindo cefalosporinas de terceira geração e inibidores de  $\beta$ -lactamase. Genes como blaAmpC podem ser encontrados em cromossomos bacterianos e plasmídeos, facilitando sua disseminação entre diferentes cepas e até outras espécies bacterianas. Ao contrário das ESBLs, que são mais prevalentes em plasmídeos, as AmpCs são geralmente cromossomais, mas também têm sido cada vez mais associadas a plasmídeos, contribuindo para a disseminação da resistência (Wang et al., 2020; Russo; Marr, 2019).

Um dos maiores desafios no combate a *K. pneumoniae* é a presença de carbapenemases, que são enzimas capazes de inativar carbapenêmicos, uma classe de antimicrobianos frequentemente utilizada como último recurso no tratamento de infecções graves. Entre as carbapenemases mais conhecidas estão a KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), NDM (New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase), OXA-48 e VIM (Verona integron-encoded metallo- $\beta$ -lactamase). O gene blaKPC foi identificado pela primeira vez nos Estados Unidos e é responsável pela produção da KPC, uma serina carbapenemase que pode hidrolisar uma ampla variedade de  $\beta$ -lactâmicos. A NDM, codificada pelo gene blaNDM, é uma metallo- $\beta$ -lactamase que requer íons de zinco para funcionar e foi descoberta inicialmente na Índia, antes de se espalhar globalmente, enquanto o gene blaOXA-48 codifica uma enzima que possui baixa afinidade para carbapenêmicos, mas é eficaz na degradação de penicilinas e cefalosporinas (Hawkey et al., 2022; Yang et al., 2021). As carbapenemases são particularmente preocupantes porque sua presença frequentemente indica resistência a múltiplas classes de antimicrobianos, caracterizando cepas como MDR (*Multidrug-Resistant*) ou XDR (*Extensively Drug-Resistant*) (Wang et al., 2020; Dai; Hu, 2022).

A formação de biofilmes é outro fator crucial para a virulência de *K. pneumoniae*, especialmente em ambientes hospitalares. Biofilmes são comunidades bacterianas que aderem a superfícies e são envolvidas por uma matriz extracelular, tornando as bactérias mais resistentes a antibióticos e à ação do sistema imunológico. *K. pneumoniae* é particularmente eficaz na formação de biofilmes em dispositivos médicos, como cateteres e ventiladores, facilitando infecções persistentes e recorrentes. Além disso, a produção de polissacarídeos extracelulares aumenta a coesão do biofilme e protege as células bacterianas das ações de agentes antimicrobianos, destacando a necessidade de estratégias terapêuticas que possam interromper a formação de biofilmes (Wang et al., 2020; Yang et al., 2021).

#### 1.1.4 Antimicrobianos nas infecções por *Klebsiella pneumoniae*

O uso de antimicrobianos para tratar infecções por *Klebsiella pneumoniae* iniciou-se com o desenvolvimento das penicilinas nas décadas de 1940 e 1950. No entanto, o surgimento da resistência fez com que, já nos anos 1960, as cefalosporinas de primeira geração fossem introduzidas para infecções por essa bactéria. Ao passo que a era de ouro dos antimicrobianos acontecia e novos fármacos chegavam ao uso clínico, a resistência continuou a aumentar, até que, em 1980, as cefalosporinas de segunda e terceira geração foram introduzidas, seguidas pelos carbapenêmicos, como o meropenem, que se tornaram essenciais para o tratamento de infecções hospitalares graves e resistentes. Entretanto, o surgimento de carbapenemases exigiu novas alternativas terapêuticas a serem percorridas neste trabalho (Kaur et al., 2024; Tian et al., 2024).

Nesse contexto, diversas classes de antimicrobianos foram utilizadas contra bactérias Gram-negativas, incluindo *K. pneumoniae*, cada uma com mecanismos de ação e alvos específicos. Dentre eles, pode-se destacar: as fluoroquinolonas, como a ciprofloxacina; os aminoglicosídeos, como a gentamicina; e os beta-lactâmicos, que incluem penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos. As polimixinas também foram utilizadas, principalmente a colistina, pois afetam a integridade da membrana celular, causando morte celular (Elken et al., 2022; Fuzi et al., 2020; Herridge et al., 2020).

As fluoroquinolonas constituem uma importante classe de antibióticos desenvolvida inicialmente na década de 1960 a partir do ácido nalidíxico, com a ciprofloxacina emergindo como uma representante central dessa classe em 1987. A ciprofloxacina destacou-se por sua atividade eficaz contra uma ampla gama de bactérias Gram-negativas e algumas Gram-positivas, revolucionando o tratamento de diversas infecções bacterianas (Zhang et al., 2024; Adebayo et al., 2025). Sua ação antimicrobiana ocorre pela inibição das enzimas bacterianas DNA girase (topoisomerase II) e topoisomerase IV, essenciais para a replicação, transcrição e reparo do DNA bacteriano, resultando em dano ao DNA e consequente morte celular (Zhang et al., 2024; Adebayo et al., 2025).

Ciprofloxacina, além de seu mecanismo clássico de inibição da DNA-girase e da topoisomerase IV, apresenta alvos farmacodinâmicos adicionais que ampliam sua eficácia bactericida. Estudos recentes demonstram que, em concentrações elevadas, essa fluoroquinolona pode causar condensação citoplasmática associada a danos estruturais na membrana celular, afetando a homeostase bacteriana mesmo em células não proliferativas. Essa atividade adicional resulta em perda de integridade da membrana, permeabilização e liberação

de conteúdo intracelular, potencializando a morte celular bacteriana. A presença desses múltiplos alvos reduz a probabilidade de desenvolvimento de resistência por mutações únicas, exigindo adaptações simultâneas por parte da bactéria. Além disso, os efeitos sobre a membrana complementam a atividade sobre as topoisomerasas, configurando um perfil multifásico de ação antimicrobiana (WONG et al., 2021; COLLINS et al., 2024).

A estrutura química da ciprofloxacina inclui um núcleo quinolônico fluorinado, responsável pela sua potente atividade antimicrobiana. A presença do átomo de flúor na posição 6 da estrutura melhora significativamente sua eficácia antimicrobiana, aumentando a permeabilidade celular e o espectro de ação contra bactérias Gram-negativas resistentes. É especialmente utilizada para tratar infecções por bactérias resistentes como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA). Entretanto, o uso intensivo e indiscriminado levou à resistência bacteriana crescente, mediada principalmente por mutações nas enzimas-alvo, efluxo ativo da droga e alterações na permeabilidade celular (Adebayo et al., 2025; El Zowalaty et al., 2025).

Farmacocineticamente, a ciprofloxacina possui boa absorção oral, com biodisponibilidade variando entre 70% e 80%. Sua distribuição tecidual é ampla, atingindo altas concentrações em tecidos como pulmão, rins, próstata, ossos e fluidos corporais, exceto no sistema nervoso central, onde sua penetração é limitada (Adebayo et al., 2025; El Zowalaty et al., 2025). A ciprofloxacina exibe moderada ligação a proteínas plasmáticas (20% a 40%) e é eliminada predominantemente por via renal, por filtração glomerular e secreção tubular, apresentando uma meia-vida média de aproximadamente 4 horas em indivíduos saudáveis (Adebayo et al., 2025; El Zowalaty et al., 2025).

Frente à crescente pressão seletiva, estratégias contra a resistência antimicrobiana envolvendo combinações medicamentosas têm sido adotadas para ampliar a eficácia clínica da ciprofloxacina. Combinações comuns incluem associação com  $\beta$ -lactâmicos, aminoglicosídeos e até colistina, visando explorar efeitos sinérgicos e reduzir a seleção de cepas resistentes. Apesar das vantagens, essas associações também apresentam riscos elevados, incluindo toxicidade renal e neurológica aumentadas, exigindo cautela clínica e monitoramento rigoroso durante o tratamento (Zhang et al., 2024; El Zowalaty et al., 2025).

Já os aminoglicosídeos são uma importante classe de antibióticos descoberta em 1944 com a estreptomicina, isolada a partir do *Streptomyces griseus* por Selman Waksman (Serio et al., 2018). Outros representantes dessa classe foram desenvolvidos posteriormente, como gentamicina, tobramicina, amicacina e neomicina, visando ampliar o espectro antimicrobiano e reduzir a resistência bacteriana emergente. A gentamicina, isolada em 1963

por Weinstein a partir de *Micromonospora purpurea*, ganhou destaque devido à sua atividade bactericida contra bactérias Gram-negativas aeróbias. Seu mecanismo de ação ocorre por meio da ligação irreversível à subunidade 30S do ribossomo, interferindo na leitura correta do RNA mensageiro e resultando na produção de proteínas defeituosas, levando à morte celular bacteriana (Serio et al., 2018; Pisani et al., 2024).

A gentamicina, tradicionalmente reconhecida por sua ligação à subunidade 30S do ribossomo e pela indução de erro de leitura durante a síntese proteica, apresenta novos alvos farmacodinâmicos além desse mecanismo clássico. Estudos recentes revelam que, além de induzir a produção de proteínas truncadas e bactericidas, ela também diminui significativamente a taxa de alongamento dos peptídeos e interfere com a reciclagem ribossômica (Thy et al., 2023).

A gentamicina possui uma estrutura química complexa, caracterizada por um núcleo aminociclitol (2-deoxiestreptamina) ligado a múltiplos açúcares amino modificados por ligações glicosídicas. Essa estrutura confere ao fármaco uma alta solubilidade em água, sendo polar e catiônica entre pH 6-8. Sua eficácia clínica é especialmente reconhecida contra infecções graves por bactérias Gram-negativas, incluindo *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*. No entanto, seu uso indiscriminado facilitou o desenvolvimento de resistência mediada por enzimas modificadoras dos aminoglicosídeos (AMEs), limitando sua eficácia (Xu et al., 2025; Serio et al., 2018).

A farmacocinética da gentamicina é marcada por uma baixa absorção gastrointestinal, exigindo administração parenteral. Distribui-se rapidamente por tecidos altamente vascularizados, como pulmões e rins, embora sua penetração na barreira hematoencefálica seja limitada. Apresenta baixa ligação às proteínas plasmáticas, o que contribui para sua rápida eliminação renal via filtração glomerular. Sua meia-vida é curta, variando de 2 a 3 horas, porém pode ser significativamente prolongada em pacientes com função renal reduzida, demandando ajustes rigorosos de dose para evitar toxicidade (Pisani et al., 2024; Xu et al., 2025). O uso clínico da gentamicina requer cuidados especiais devido à nefrotoxicidade e ototoxicidade, que podem resultar em danos permanentes (Pisani et al., 2024; Serio et al., 2018).

Por outro lado, os carbapenêmicos representam uma fundamental classe de antibióticos, inicialmente descoberta na década de 1970 por pesquisadores da empresa Merck Sharp & Dohme, derivada originalmente do composto natural tienamicina, isolado da bactéria *Streptomyces cattleya*. Os principais medicamentos dessa classe, em ordem de surgimento, são imipenem, meropenem, ertapenem e doripenem. O imipenem foi o primeiro carbapenêmico

introduzido, sendo rapidamente hidrolisado por enzimas renais como a deidropeptidase I, exigindo associação com cilastatina para proteger da degradação. Meropenem foi desenvolvido posteriormente com maior estabilidade química e resistência a  $\beta$ -lactamases, sem necessitar de associação protetora. Ertapenem destaca-se por ter meia-vida mais longa, permitindo administração diária única, enquanto doripenem possui maior atividade contra *Pseudomonas aeruginosa*. Todos atuam ligando-se irreversivelmente às proteínas ligadoras de penicilina (PBPs), impedindo a síntese do peptidoglicano, essencial à formação e manutenção da parede celular bacteriana, resultando na lise bacteriana devido à incapacidade de a bactéria manter sua integridade estrutural (Elkady et al., 2024; Katsarou et al., 2025).

Além disso, em *Klebsiella pneumoniae*, concentrações subinibitórias de meropenem podem modular a transferência de plasmídeos de resistência, inibindo esse processo em doses muito baixas ( $1/8 \times \text{MIC}$ ), mas potencializando-o em doses intermediárias ( $1/2 \times \text{MIC}$ ), o que sugere que a droga pode impactar a disseminação de genes de resistência de forma dose-dependente (Zhang et al., 2024). Há ainda evidências de que antibióticos bactericidas como o meropenem podem causar condensação citoplasmática por meio de dano de membrana, intensificando a letalidade, mesmo sem crescimento bacteriano ativo (Wong et al., 2021).

O meropenem apresenta uma estrutura química contendo um anel  $\beta$ -lactâmico fundido a um anel pirrolidínico com uma cadeia lateral metil na posição 1, proporcionando estabilidade contra a degradação por  $\beta$ -lactamases bacterianas. É amplamente empregado contra infecções por bactérias Gram-negativas, destacando-se especialmente sua escolha preferencial no tratamento de infecções causadas por *Klebsiella pneumoniae* devido à sua alta eficácia inicial contra cepas resistentes a múltiplos fármacos e sua capacidade de penetrar bem nos tecidos. Sua atividade frequentemente enfrenta resistência mediada por carbapenemases como *blaKPC*, *blaNDM* e *blaOXA-48*, que dificultam significativamente a sua aplicação clínica (Qala Nou et al., 2025; Geleta et al., 2024).

Farmacocineticamente, o meropenem é administrado principalmente por via intravenosa, com absorção rápida e distribuição ampla em tecidos e líquidos corporais, incluindo o líquido cefalorraquidiano, pulmões, fígado, rins e ossos. Possui baixa ligação a proteínas plasmáticas (cerca de 2%), biodisponibilidade oral desprezível e é eliminado predominantemente por filtração renal, sendo cerca de 70% excretado de forma ativa na urina. Sua meia-vida plasmática média é de aproximadamente uma hora em indivíduos com função renal normal, podendo ser prolongada significativamente em pacientes com insuficiência renal. Essas características justificam o uso frequente do meropenem em infusões contínuas ou

prolongadas para manter níveis terapêuticos eficazes (Kondratieva et al., 2024; Katsarou et al., 2025).

Para combater a crescente resistência bacteriana aos carbapenêmicos, estratégias como a associação de fármacos têm sido desenvolvidas. Nessas combinações, frequentemente são utilizados inibidores de  $\beta$ -lactamases, que surgiram para restaurar ou ampliar o espectro de ação dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, incluindo carbapenêmicos, frente às enzimas produzidas por bactérias resistentes (Liu et al., 2025; Lee et al., 2025). Essas combinações incluem classes como inibidores não  $\beta$ -lactâmicos (avibactam e vaborbactam) e antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (aztreonam). Combinações frequentemente usadas incluem meropenem com vaborbactam, que inibe carbapenemases serina do tipo KPC; ceftazidima com avibactam, sendo avibactam um potente inibidor das  $\beta$ -lactamases das classes A, C e algumas da classe D; e polimixina com aztreonam, onde o aztreonam possui eficácia contra metalo- $\beta$ -lactamases que normalmente não são inibidas pelos demais inibidores clássicos. Essas combinações aumentam a eficácia antimicrobiana e retardam o desenvolvimento de resistência, embora a eficácia possa variar dependendo do tipo específico de carbapenemase envolvida (Liu et al., 2025; Lee et al., 2025).

Entretanto, existem desafios importantes relacionados ao uso combinado de antimicrobianos, incluindo aumento do risco de efeitos colaterais, como nefrotoxicidade, hepatotoxicidade e reações de hipersensibilidade graves. Além disso, esses tratamentos combinados frequentemente acarretam custos financeiros elevados, devido à necessidade de múltiplos medicamentos e monitoramento laboratorial mais intenso. O uso indiscriminado dessas combinações pode selecionar cepas bacterianas ainda mais resistentes, reduzindo futuras opções terapêuticas e complicando significativamente o manejo clínico, aumentando ainda mais a complexidade das infecções por bactérias multirresistentes (Liu et al., 2025; Strukova et al., 2024).

O uso de todos esses antimicrobianos levou a seleção de cepas de *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes, já sendo descritos diversos mecanismos de resistência aos antimicrobianos (Patro e Rathinavelan, 2019; Kubota et al., 2019), por isso compreender os aspectos que envolvem a pressão seletiva causada por meropenem é fundamental, pois plasmídeos que carregam genes de resistência podem ser transmitidos entre bactérias sob influência do antibiótico, intensificando o problema da resistência bacteriana. O conhecimento aprofundado desse processo é essencial para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas eficazes (Kondratieva et al., 2024).

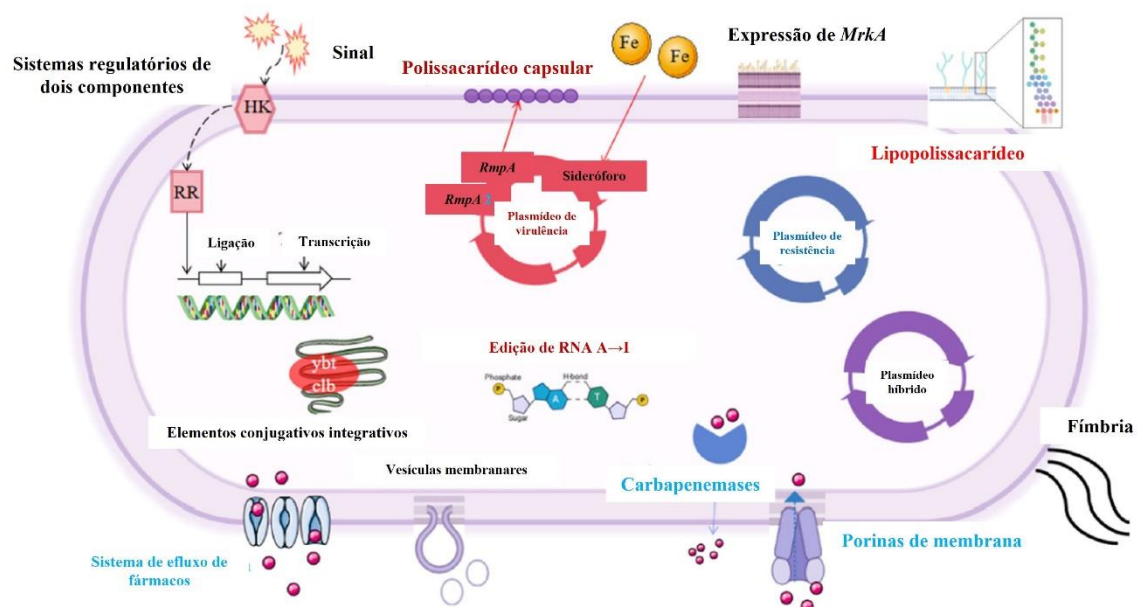


## 1.2 Mecanismos de resistência de *Klebsiella pneumoniae*

A resistência antimicrobiana em *Klebsiella pneumoniae* representa um grave impacto na mortalidade hospitalar, particularmente em ambientes de terapia intensiva, com a mortalidade associada a cepas produtoras de carbapenemase (KPC) acima de 50% em hospitais, sendo aproximadamente 62% dos isolados em unidades de terapia intensiva (UTI) Gram-negativos, com *K. pneumoniae* ocupando o topo da lista como organismo multirresistente mais prevalente (Prestinaci et al., 2015; Kerneis et al., 2021; Adams et al., 2018).

Em termos de resistência, cepas de *K. pneumoniae* podem ser classificadas como MDR (*Multidrug-Resistant*), quando possuem resistência a pelo menos três classes de antimicrobianos, e XDR (*Extensively Drug-Resistant*), quando são resistentes a quase todas as classes de antibióticos, exceto uma ou duas opções de última linha. Entre os mecanismos de resistência em *K. pneumoniae*, destacam-se as modificações enzimáticas, as bombas de efluxo e a formação de biofilme (Figura 2). O surgimento e o impacto metabólico desses mecanismos serão aprofundados adiante.

Figura 2. Principais mecanismos de resistência de *Klebsiella pneumoniae*



Legenda: Principais mecanismos moleculares envolvidos na resistência antimicrobiana e na adaptação de *Klebsiella pneumoniae* em ambientes sob pressão seletiva: sistemas regulatórios de dois componentes (HK/RR) detectam estímulos ambientais e ativam a transcrição de genes relacionados à virulência e à resistência; polissacarídeo capsular atua como uma barreira protetora, conferindo resistência à fagocitose, ao ataque do sistema imune e à ação de antimicrobianos; sideróforos, regulados por plasmídeos de virulência, capturam ferro essencial para o crescimento e sobrevivência bacteriana, favorecendo a colonização de tecidos; expressão do gene *MrkA* está associada à formação de fímbrias do tipo 3, importantes para a adesão a superfícies, biofilme e invasão

tecidual; lipopolissacarídeos (LPS), componentes da membrana externa, funcionam como barreira física e podem ser modificados para reduzir a afinidade de antimicrobianos; plasmídeos de virulência e de resistência contribuem para a disseminação de genes que codificam fatores de virulência; carbapenemases, responsáveis pela degradação de carbapenêmicos e comprometimento da eficácia de antimicrobianos de última linha; porinas de membrana reduzem a entrada de antibióticos hidrofílicos, enquanto os sistemas de efluxo de fármacos, como as bombas expulsam ativamente antimicrobianos; elementos conjugativos integrativos e vesículas de membrana favorecem a transferência horizontal de genes e a disseminação rápida de determinantes de resistência. Fonte: Traduzido de Lei et al., 2024.

### 1.2.1 Produção de $\beta$ -lactamases

O primeiro mecanismo de resistência significativo em *K. pneumoniae* foi a produção de beta-lactamase SHV-1, uma penicilinase que conferia resistência a penicilinas. Com a pressão seletiva causada pelo uso intensivo de antimicrobianos, surgiram as beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs), seguidas pela produção de carbapenemases, como KPC e NDM, que inativam carbapenêmicos (Stojowska-Swedrzynska et al., 2021; Adams et al., 2018).

Desde sua primeira identificação na Alemanha, em 1985, a emergência de *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenêmicos começou a se manifestar globalmente, marcando um período crítico na microbiologia clínica. Em 1996, nos Estados Unidos, foi identificado o gene *blaKPC* em uma cepa resistente a imipenem, que logo se tornaria um dos mecanismos mais preocupantes de resistência bacteriana. Os genes de carbapenemases, como *blaIMP-1*, descrito no Japão em 1991, e *blaVIM-1*, detectado posteriormente na Itália, contribuíram para a disseminação dessa resistência. Essa plasticidade genética em conjunto a capacidade de transmissão horizontal e evolução dos plasmídeos coloca *K. pneumoniae* no centro da crise de resistência antimicrobiana mundial (Chen et al., 2014; Yang et al., 2020; Campos et al., 2016).

Do ponto de vista epidemiológico, *K. pneumoniae* produtora de KPC foi relatada em diversas regiões, incluindo Américas, Europa e Ásia. Nos Estados Unidos, o clone ST258 domina, enquanto no Brasil e na China, o ST11 é prevalente. Em um estudo envolvendo 638 pacientes em uma UTI na China, foi identificado que 88,5% das cepas isoladas pertenciam ao genótipo ST11 e 97,1% carregavam o gene *blaKPC-2*. Esses dados reforçam a necessidade de vigilância global e implementação de políticas de controle rigorosas para evitar a propagação transnacional dessas cepas (Chen et al., 2014; Liu et al., 2022; Campos et al., 2016).

### 1.2.2 Bomba de efluxo

As bombas de efluxo são proteínas transmembranares que desempenham um papel crucial na expulsão de compostos tóxicos, incluindo antimicrobianos, para fora da célula bacteriana. Essas estruturas utilizam gradientes de prótons ou energia derivada de ATP para transportar moléculas contra gradientes de concentração, reduzindo a concentração intracelular de antibióticos e, consequentemente, a sua eficácia. Em *Klebsiella pneumoniae*, as bombas de efluxo mais relevantes incluem aquelas pertencentes à família de resistência-nodulação-divisão (RND), como AcrAB-TolC e OqxAB, responsáveis pela resistência a antibióticos como tigeciclina, quinolonas e cloranfenicol (Dawson et al., 2024; Tian et al., 2024; Hussein et al., 2024).

Diversos estudos destacaram a prevalência de *Klebsiella pneumoniae* produtora de bombas de efluxo em casos clínicos (Guo et al., 2024; Hirabayashi et al., 2024; Swedan e Aldakhily, 2024). Em *Klebsiella pneumoniae*, as principais bombas de efluxo incluem AcrAB-TolC, OqxAB e MdtABC, pertencentes à família RND, bem como bombas das famílias MATE e MFS, como MdtK e KpsrMFS. Essas bombas desempenham papéis distintos, sendo algumas constitutivamente expressas para exportar metabólitos secundários, enquanto outras, como OqxAB, são induzidas por estímulos externos, como exposição a antibióticos. Além disso, a presença de variantes genéticas, como *tmexCD-toprJ*, em plasmídeos móveis amplia o espectro de resistência das cepas, destacando o papel adaptativo dessas bombas no ambiente clínico e comunitário (Han et al., 2024; He et al., 2024).

A funcionalidade das bombas de efluxo é regulada por genes específicos, como *acrAB*, *tolC*, *oqxAB* e *tmexCD*, e mutações nesses genes podem levar à sua sobreexpressão, modulando a resistência antimicrobiana em resposta a estímulos ambientais (Dawson et al., 2024; Lee et al., 2024; Salama et al., 2024).

### 1.3 Ciências ômicas no estudo da resistência antimicrobiana

No contexto dos diversos mecanismos de resistência de *K. pneumoniae* apresentados acima, a compreensão da capacidade de remodelação genética diante de estímulos estressantes se faz promissora. Por isso, a pesquisa sobre a resistência antimicrobiana em *K. pneumoniae* evoluiu significativamente com a introdução de técnicas moleculares avançadas, como as abordagens ômicas, que permitem um entendimento detalhado dos mecanismos de resistência em nível molecular. A genômica e o transcriptoma são especialmente úteis para identificar genes associados à resistência e para mapear vias metabólicas críticas que sustentam

a sobrevivência da bactéria em presença de antibióticos (Avci, 2024; Beig et al., 2024). O transcriptoma permite mapear alterações na expressão gênica em resposta a estímulos antimicrobianos, identificando metabólitos-chave e vias afetadas (Avci, 2024; Adams et al., 2018).

A genômica, por exemplo, investiga a sequência completa do DNA de um organismo, oferecendo *insights* sobre genes, mutações e elementos regulatórios. O transcriptoma, por sua vez, examina o conjunto de RNA mensageiro (mRNA) expresso em uma célula ou tecido em um determinado momento diante de uma determinada condição, refletindo a atividade funcional do genoma sob condições específicas. O metaboloma explora os metabólitos pequenos presentes em um organismo, indicando respostas bioquímicas e fisiológicas às alterações do ambiente. Outras abordagens incluem a proteômica, que estuda proteínas e suas interações, e a epigenômica, que analisa modificações químicas no DNA que regulam a expressão gênica sem alterar a sequência de nucleotídeos. Essas abordagens ômicas trabalham de forma integrada, possibilitando avanços em áreas como diagnóstico de doenças, descoberta de alvos terapêuticos e desenvolvimento de novos medicamentos (Tavares et al., 2013; Sundaresan et al., 2024).

O transcriptoma é uma ferramenta poderosa para entender os mecanismos de resistência antimicrobiana, especialmente em patógenos multirresistentes como *Klebsiella pneumoniae*. Estudos utilizando RNA-Seq revelaram alterações na expressão de genes relacionados a bombas de efluxo, modificação de lipopolissacarídeos (LPS) e produção de enzimas como carbapenemase (Brennan-Krohn et al., 2022; Bruchmann et al., 2015; Cain et al., 2018).

Sob pressão de antibióticos como a colistina, há regulação diferencial de genes associados à resistência, como *phoPQ*, *pmrAB* e *mgrB*, que alteram a estrutura do LPS para reduzir a ligação do antibiótico. Além disso, transcriptomas analisados em combinações sinérgicas de antibióticos, como colistina e minociclina, mostram como as bactérias ajustam seus perfis de expressão para resistir ou sucumbir ao tratamento. Esses estudos são fundamentais para identificar novos alvos terapêuticos e otimizar protocolos terapêuticos (Brennan-Krohn et al., 2022; Bruchmann et al., 2015; Cain et al., 2018). Diversos outros estudos de transcriptômica mostraram que cepas resistentes exibem regulação diferencial de genes relacionados à biossíntese de cápsulas, formação de biofilmes e adaptação metabólica, permitindo sua persistência em ambientes hospitalares (Long et al., 2019; Liu et al., 2024; Martin e Bachman, 2018).

Na análise de transcriptômica global, utilizando RNA-Seq, foram identificados 3.346 genes conservados no transcriptoma central de *K. pneumoniae* (Bruchmann et al., 2015; Long et al., 2019). Uma outra análise global envolvendo 16.537 genomas de *K. pneumoniae* revelou que a maioria das cepas associadas à resistência eram dominadas por clones de alto risco, como *ST258*, *ST231* e *ST307*, responsáveis por surtos hospitalares em países como Colômbia, Índia e Nigéria. Esses clones apresentaram uma alta prevalência de genes de resistência, como *blaNDM* e *mcr-I*, que conferem resistência a carbapenêmicos e colistina, respectivamente (Liu et al., 2024).

#### 1.4 Justificativa

A caracterização do transcriptoma de *Klebsiella pneumoniae* é fundamental para elucidar mecanismos moleculares de resistência e virulência, subsidiando novas abordagens terapêuticas. Bruchmann et al. (2015) empregaram RNA-seq em 37 isolados clínicos de linhagens diversas, revelando um core-transcriptoma de aproximadamente 3 346 RNAs ubiquitários – desses, cerca de 60% corresponderam a genes envolvidos em manutenção de parede celular, homeostase *redox* e maquinaria de replicação e reparo de DNA, enquanto o terço remanescente apresentou variações interlinhagens relacionadas a adesinas.

Mais recentemente, Bhowmik et al. (2024) mostraram que a exposição de cepas *XDR* a N-acetilcisteína promove *downregulation* de vias de biossíntese proteica e de transporte de elétrons, revelando mecanismos de fragilização do biofilme. No entanto, a resposta transcriptômica de cepas *XDR* à concentração inibitória mínima de carbapenêmicos ainda não foi explorada de forma integrada.

Considerando que os carbapenêmicos, como meropenem, são drogas de escolha para infecções por cepas *XDR*, é imprescindível entender como essas bactérias reprogramam seu perfil de expressão gênica diante do desafio antimicrobiano, a fim de identificar genes essenciais à tolerância ao fármaco, revelar vias metabólicas compensatórias que sustentam a viabilidade celular e apontar possíveis coadjuvantes terapêuticos capazes de reverter ou atenuar a resistência.

## 2 HIPÓTESES

- a) A exposição de *K. pneumoniae* XDR a concentrações inibitórias mínimas de antimicrobianos estimulam uma reprogramação do perfil de expressão gênica com mudanças consistentes em diversas categorias funcionais;
- b) Sob estresse de antimicrobianos, *K. pneumoniae* ajusta vias metabólicas relacionadas à resistência a antimicrobianos;
- c) A exposição a antimicrobianos induz respostas de estresse concomitantemente com um redirecionamento das vias metabólicas em *K. pneumoniae*.

## 3 OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo Geral

Avaliação do perfil de transcritos de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase pós exposição a concentração inibitória mínima de antimicrobianos afim de compreender as modificações biológicas do transcriptoma que contribuem para resistência aos antimicrobianos e potenciais abordagens farmacológicas.

### 3.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliação da susceptibilidade antimicrobiana de *Klebsiella pneumoniae* por diferentes métodos fenotípicos;
- b) Determinação do impacto de antimicrobianos na curva de crescimento de *K. pneumoniae*, em diferentes concentrações;
- c) Análise do transcriptoma de *K. pneumoniae* através de RNA-seq e ferramentas de bioinformática, objetivando delinear a resposta desta bactéria a exposição a antibiótico.
- d) Identificação de módulos de expressão correlacionados que possam servir como uma assinatura molecular da resistência a antimicrobianos.
- e) Reconstrução *in silico* das vias metabólicas de *K. pneumoniae* associadas a resistência aos antimicrobianos.
- f) Análise das modificações metabólicas que geram alterações morfofuncionais de *K. pneumoniae* induzidas pela exposição a antimicrobianos;

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

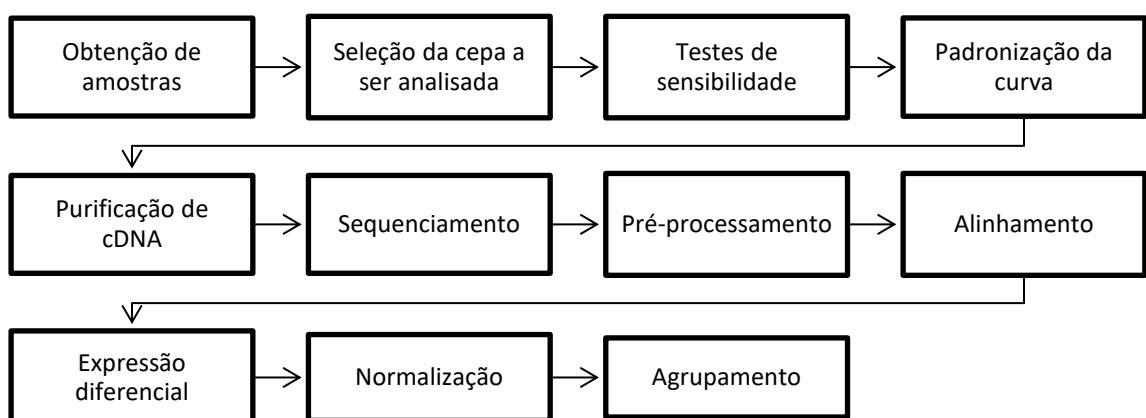
### 4.1 Local do estudo

As pesquisas foram realizadas Núcleo de Biomedicina (NUBIMED), nos Laboratórios de Doenças Infecciosas (LDI) e no Laboratório de Toxinologia Molecular (LTM), da Universidade Federal do Ceará (UFC), bem como na Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), sede Eusébio, Ceará, Brasil.

### 4.2 Fluxograma dos experimentos

A metodologia deste estudo está estruturada em três seções principais. A primeira aborda a coleta das amostras biológicas e sua preparação para os experimentos; segunda é subdividida em duas partes: teste de sensibilidade e análise da curva de crescimento. A terceira seção é composta por três etapas: extração de cDNA, preparação da biblioteca e processamento e análise dos transcritos. Abaixo, apresenta-se um fluxograma que ilustra a execução das atividades descritas (Figura 3).

Figura 3. Fluxograma dos experimentos realizados



Fonte: Autoria própria.

### 4.3 Obtenção e identificação dos isolados bacterianos

As cepas utilizadas neste estudo fazem parte do acervo do Projeto “Resistência ATBs – Mecanismos de Resistência aos Antimicrobianos de Cepas Bacterianas Gram-negativas Isoladas de Pacientes em Unidades de Terapia Intensiva de Hospitais em Fortaleza, Ceará, Brasil”, aprovado pelo CNPq (Processo nº 408549/2022-0). Este projeto teve como objetivo investigar os mecanismos moleculares de resistência em bactérias gram-negativas multirresistentes (MDR) e extensivamente resistentes (XDR), isoladas de pacientes internados em hospitais sentinelas da rede pública da capital cearense. O projeto foi aprovado por Comitê de Ética conforme mostrado no Anexo D.

Os isolados clínicos utilizados foram inicialmente coletados e caracterizados pelo no Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC) em Fortaleza-CE. As cepas selecionadas apresentavam perfis fenotípicos de resistência compatíveis com os critérios de multirresistência e foram conservadas sob condições apropriadas até sua utilização nas análises transcriptômicas. A seleção das amostras para o presente trabalho considerou a representação de fenótipos resistentes de interesse clínico, incluindo a produção de carbapenemase.

O projeto coletou 122 cepas de bactérias Gram-negativas (BGNs). Nas amostras coletadas, observou-se elevada prevalência de resistência a penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos, entre os isolados provenientes de pacientes internados na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) clínica do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC), em Fortaleza-CE. Os pacientes apresentavam quadros infecciosos em diferentes sítios anatômicos, e os agentes etiológicos foram identificados por meio de técnicas de microbiologia clássica, no período de 23 de abril de 2019 a 29 de maio de 2021.

Os isolados bacterianos foram identificados e submetidos a testes de sensibilidade antimicrobiana no Laboratório de Microbiologia do HUWC, utilizando o método automatizado VITEK® 2 Compact (BioMérieux, Marcy l’Etoile, França), conforme as recomendações do fabricante. A produção de carbapenemase foi confirmada pelo teste Ng-Test Carba 5®, conforme recomendações do fabricante. As concentrações inibitórias mínimas (CIMs) foram interpretadas com base nos critérios estabelecidos pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2018) e pelo comitê brasileiro para testes de sensibilidade antimicrobiana (BRCAST, 2020; 2021). Para garantir a qualidade dos testes de sensibilidade, foram utilizadas cepas de controle da *American Type Culture Collection* (ATCC).

No estudo, foram utilizados isolados de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a um ou mais grupos de antimicrobianos, incluindo  $\beta$ -lactâmicos, fluoroquinolonas, aminoglicosídeos,



polimixinas e/ou glicilciclinas. A classificação de resistência seguiu os critérios para MDR (multirresistentes), aplicados aos isolados que apresentaram resistência a pelo menos um agente de três ou mais classes de antimicrobianos. Já os isolados *XDR* (extensivamente resistentes) foram definidos como aqueles resistentes a pelo menos um agente de todas as classes testadas, com exceção de, no máximo, duas classes.

Para este estudo, a cepa de *Klebsiella pneumoniae* (código 202) foi selecionada dentre os 122 isolados identificados no âmbito do Projeto Resistência (408549-2022.0). Este isolado foi obtido em 2021 a partir de aspirado traqueal de um paciente internado na UTI do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC), em Fortaleza-CE.

#### 4.4 Antibacterianos

As soluções-estoque dos antibacterianos foram produzidas na concentração de 5000 µg/ml para ciprofloxacina; 50.000 µg/ml para gentamicina e 250.000 µg/ml para meropenem. Ciprofloxacina (Medley farmacêutica, São Paulo, Brasil) foi diluída em 0,1M de ácido clorídrico; Gentamicina (Medley farmacêutica, São Paulo, Brasil) foi diluída em água deionizada estéril, bem como Meropenem (Medley farmacêutica, São Paulo, Brasil). As drogas foram preparadas com base no documento M100 do CLSI (CLSI, 2018). As soluções-estoque de Ciprofloxacina, Gentamicina e Meropenem ficaram estocados a – 20°C até o uso.

#### 4.5 Teste de sensibilidade aos antibacterianos

A cepa 202 foi enumerada de acordo com a data de chegada e identificadas por meio da utilização da plataforma *VITEK-2®* (bioMérieux, França). Após isolamento, cada linhagem foi cultivada durante 18 horas em meio LB (Sigma-Aldrich, EUA) a 37°C e armazenadas em freezer -80°C em LB 50% Glicerol (v/v: 500uL/500uL). A cepa foi identificada como *Klebsiella pneumoniae* e foi armazenada no Biobanco da Universidade Federal do Ceará. A cepa foi então utilizada para realizar os testes de sensibilidade aos antimicrobianos por 3 técnicas diferentes: disco difusão, microdiluição em caldo e método automatizado *VITEK-2®*.

#### 4.5.1 Disco-difusão

Após a identificação e o cultivo inicial da cepa *Klebsiella pneumoniae* 202 em 5 mL de meio LB (Sigma-Aldrich, EUA), foram transferidos 100 µL da suspensão bacteriana para placas contendo ágar Muller Hinton (KASVI, Brasil), utilizando uma alça de Drigalski para espalhamento uniforme. Sobre o inóculo, foram posicionados discos impregnados com os antibióticos selecionados para o estudo: Ciprofloxacino, Gentamicina e Meropenem (Sensidisc DME – Diagnósticos Microbiológicos Especializados).

Após 24 horas de incubação a 37°C, os halos de inibição formados ao redor dos discos foram medidos, e os resultados foram interpretados conforme os critérios estabelecidos pelo fabricante dos discos e interpretados de acordo com CLSI (2018) e BRCast. O perfil de resistência bacteriana foi categorizado como sensível, resistente, e ainda classificado em multirresistente e extensivamente resistente. A classificação detalhada dos perfis de resistência (MDR: multirresistente; R: resistente; XDR: extensivamente resistente; PDR: pan-resistente) seguiu as definições propostas por Magiorakos et al. (2012).

#### 4.5.2 Microdiluição em caldo

Os testes de sensibilidade foram realizados em microplacas de 96 poços, utilizando-se a técnica de microdiluição em caldo, conforme o documento M100 do CLSI (M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing). A faixa de concentração testada foi de 4 a 2048 µg/mL para Meropenem, de 2 a 1024 µg/mL para Ciprofloxacino e para Gentamicina. Foi utilizada uma droga controle com uma cepa ATCC para controle de qualidade do experimento. Meropenem foi utilizado na concentração de 4 a 0,008 µg/mL. Os inóculos foram preparados em solução salina a 0,9% e em seguida ajustados para uma concentração final de  $5 \times 10^5$  UFC/mL em meio caldo Muller Hinton Cátion ajustado. A cepa de *Klebsiella pneumoniae* foi cultivada em ágar Muller Hinton e posteriormente ajustada em solução salina estéril para atingir uma densidade correspondente a 0,5 na escala de McFarland. O mesmo procedimento foi realizado para a cepa de controle *E. coli* ATCC 25922. A placa foi então incubada a 37°C por 16 a 20 horas. A leitura da Concentração Inibitória Mínima foi realizada pelo método visual, onde foi determinada a CIM como a concentração capaz de inibir 100% de crescimento em relação ao controle.

#### 4.5.3 Método automatizado VITEK 2®

Para o teste de sensibilidade por VITEK 2®, inicialmente foi obtida uma cultura pura em meio MH, após incubação a 37°C por 18 a 24 horas. Posteriormente, preparou-se uma suspensão bacteriana em solução salina estéril a 0,45% (NaCl), ajustando-se a densidade óptica para um valor 0,5 na escala de McFarland, equivalente a aproximadamente  $1-2 \times 10^8$  UFC/mL.

Após o preparo da suspensão, procedeu-se à inoculação dos cartões específicos para o VITEK 2®. Para os testes de identificação (ID), a suspensão ajustada foi transferida para o tubo de inoculação apropriado, ao qual o cartão de identificação foi acoplado. Da mesma forma, para o teste de sensibilidade, foi utilizado um cartão contendo diferentes antimicrobianos em concentrações variadas. Os cartões, ao serem introduzidos nos tubos, foram preparados para carregamento automático no equipamento, que realiza o preenchimento dos poços com a suspensão bacteriana e o selamento dos cartões. Por fim, os tubos inoculados com os cartões foram colocados no carrossel de carga do VITEK 2®. O equipamento, de forma automatizada, detectou os cartões, realizou a leitura inicial e monitorou o crescimento bacteriano ou as reações bioquímicas ao longo do tempo.

#### 4.6 Curva de crescimento de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemases

A curva de crescimento foi traçada para definição do tempo de incubação para obtenção de massa o qual foi definido dentro da fase exponencial de crescimento. A fase de crescimento exponencial é o período de maior atividade metabólica da célula e, portanto, o estágio ideal para utilização das células nos ensaios. O método utilizado para definição da curva de crescimento foi o cultivo em meio líquido, com amostragens de alíquotas ao longo do tempo.

Para a definição da curva de crescimento o ensaio foi repetido 3 vezes. Primeiramente foi preparado um pré-inóculo: 5 colônias isoladas de *Klebsiella pneumoniae* foram cultivadas em ágar Mueller Hinton à 37°C, durante 24h, em seguida foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 10 mL de caldo previamente autoclavado. O pré-inóculo foi mantido a 37°C, 180 RPM durante 24h. Após esse período, uma alíquota de 100 µL de inóculo 0,5 McF ( $\sim 10^8$  células) do pré inóculo foi inoculada assepticamente em 8 tubos de ensaio contendo 10 mL de caldo Mueller Hinton autoclavado. A cada tempo determinado de 2 horas contando do tempo 0 a 12 horas, uma alíquota de 1mL foi analisada em espectrofotômetro de absorção para determinação da densidade ótica (DO) em 600nm (Hussein et al., 2024)). Os resultados foram expressos em valor de DO  $\pm$  desvio padrão.

#### 4.7 Curva de crescimento de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemases expostas a diferentes concentrações de antibacterianos

Para avaliar a resposta de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemases sob diferentes concentrações de antibióticos, culturas bacterianas foram preparadas em meio Mueller-Hinton (MH). Inicialmente, 10 mL de MH foram adicionados a tubos experimentais e 5 mL a tubos controle sem adição de drogas. O inóculo bacteriano foi ajustado a 0,5 na escala de McFarland (cerca de  $\sim 10^8$  células/mL), e 100  $\mu$ L da suspensão foram transferidos para cada tubo (Hussein et al., 2024).

As culturas foram incubadas a 37°C sob agitação constante de 180 RPM até atingirem uma OD600 entre 0,5 e 0,6, indicando a fase exponencial de crescimento. Nesse ponto, antibióticos foram adicionados às culturas experimentais em concentrações correspondentes a MIC, 2x MIC e 4x MIC. As culturas foram reincubadas sob as mesmas condições. Aliquotas de 1 mL foram coletadas em intervalos de 1, 3 e 6 horas, e a OD600 foi medida para monitorar o crescimento bacteriano. O volume restante foi imediatamente resfriado em gelo por 30 segundos, seguido por centrifugação a 3220 g a 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado, e os *pellets* celulares foram armazenados a -80°C para posterior extração de RNA (Hussein et al., 2024).

#### 4.8 Análise dos transcritos de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemases expostas a Meropenem

##### 4.8.1 Extração de RNA e remoção de rRNA

Para isolar RNA de alta qualidade, o *pellet* bacteriano foi inicialmente homogeneizado em TRIzol™, garantindo a inibição da atividade de RNase. A homogeneização foi realizada utilizando 1 mL de TRIzol™ para cada 50-100 mg de amostra. Após a homogeneização, a amostra foi incubada por 5 minutos à temperatura ambiente, seguida pela adição de 0,2 mL de clorofórmio por mL de TRIzol™ utilizado. A mistura foi agitada vigorosamente e incubada por 2 a 3 minutos, permitindo a separação de fases após centrifugação a 12.000 g e a 4°C por 15 minutos. Resultando na formação de uma fase aquosa superior (contendo o RNA), uma interfase e uma fase orgânica inferior (Han et al., 2024).

A fase aquosa foi cuidadosamente transferida para um novo tubo, evitando a contaminação pelas outras fases. Para precipitar o RNA, adicionou-se 0,5 mL de isopropanol por mL de TRIzol™, seguido de uma incubação de 10 minutos e centrifugação a 12.000g por

10 minutos a 4°C, o que formou um *pellet* de RNA em forma de gel branco. O *pellet* de RNA foi lavado com 1 mL de etanol 75%, seguido por centrifugação a 7.500g por 5 minutos a 4°C. Após a remoção do etanol, o *pellet* foi seco ao ar por 5-10 minutos, após o RNA foi ressuspensionado em água livre de RNase, com aquecimento a 55-60°C por 10-15 minutos para garantir a solubilização completa. A qualidade e concentração do RNA foi avaliada por espectrofotometria ou fluorometria, considerando-se um índice A260/A280 próximo a 2 como indicativo de alta pureza (Han et al., 2024).

#### 4.8.2 Avaliação da qualidade da amostra

Após a extração de RNA para preparação da biblioteca de cDNA, o sistema *Agilent D1000 ScreenTape*, integrado ao instrumento *2200 TapeStation*, foi utilizado para análise da qualidade do RNA extraído. Seguindo as recomendações do fabricante, o procedimento foi otimizado para garantir a integridade e precisão das análises. A avaliação da qualidade foi realizada assegurando que todas as amostras apresentassem um índice de integridade do RNA (RIN) igual ou superior a 7. Inicialmente, o equipamento foi configurado utilizando o software *Agilent TapeStation Controller*, e os dispositivos necessários, incluindo o *ScreenTape* e os reagentes, foram inseridos no instrumento após estabilização à temperatura ambiente por 30 minutos (Hay et al., 2020).

Para a preparação das amostras de RNA, 3 µL de *Sample Buffer* foram misturados com 1 µL de RNA previamente purificado. O controle de qualidade do ensaio foi assegurado pela inclusão de um controle padrão, preparado pela mistura de 3 µL de *Sample Buffer* com 1 µL do *RNA Ladder* fornecido no kit. As misturas foram homogeneizadas em um agitador a 2000 rpm durante 1 minuto, seguidas de uma centrifugação breve para posicionar o conteúdo no fundo dos tubos. As amostras preparadas foram então carregadas no dispositivo *D1000 ScreenTape*. Os resultados foram gerados e analisados utilizando o software *Agilent TapeStation Analysis*. A sensibilidade do sistema permitiu a detecção de RNA em concentrações tão baixas quanto 0,1 ng/µL, enquanto a precisão de quantificação foi mantida em até 10% de variação nos intervalos de concentração especificados (Hay et al., 2020).

Todos os reagentes, incluindo o dispositivo *ScreenTape*, foram armazenados a 2–8 °C, e cuidados rigorosos foram seguidos durante a manipulação das amostras para prevenir degradação do RNA e evitar contaminações.

#### 4.8.3 Construção de biblioteca de cDNA e sequenciamento de RNA-seq

Para cada condição experimental foi extraído RNA usando o kit *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) com tratamento usando DNase (Qiagen). Enriquecimento para mRNA foi feito utilizando o kit *MICROBExpress Bacterial mRNA purification* (Ambion), e a remoção de rRNA foi feita usando o kit Ribo-Zero (Epicentre). A partir desta amostra purificada e enriquecida foram feitas as construções de biblioteca de cDNA de duas réplicas biológicas por condição, e o sequenciamento destas foi realizado em plataforma Illumina HiSeq 2500 (Fasteris, Genebra, Suíça). Os dados obtidos foram expressos através de gráfico de vulcão (Han et al., 2024).

#### 4.8.4 Processamento e análises de expressão diferencial

Para realizar a análise transcriptômica de *Klebsiella pneumoniae* e identificar genes diferencialmente expressos (DEGs) sob condições específicas, o primeiro passo foi o pré-processamento dos dados de RNA-seq, que envolveu a remoção de sequências de baixa qualidade, adaptadores e contaminantes. O controle de qualidade foi feito utilizando ferramentas como FastQC para garantir que as leituras de RNA-seq estivessem livres de erros, com boa cobertura e qualidade de sequência. Além disso, foi realizado o alinhamento das sequências contra o genoma de referência de *Klebsiella pneumoniae* utilizando sistema BV-BRC (*Bacterial And Viral Bioinformatics Resource Center*) (Olson et al., 2023). Após o alinhamento, os dados foram normalizados para corrigir discrepâncias de profundidade de sequenciamento e expressão gênica, utilizando métodos como TPM (Transcripts Per Million).

A análise de expressão diferencial foi realizada com o pacote DESeq2. Através dessa análise, foi possível identificar genes que apresentaram variações significativas na expressão, associando essas mudanças a processos biológicos específicos ou mudanças fenotípicas em *Klebsiella pneumoniae*.

#### 4.8.5 Agrupamentos de genes e transcritos

O agrupamento de genes, realizado manualmente, foi conduzido com base na classificação funcional, níveis de expressão diferencial e envolvimento em vias metabólicas críticas. Os genes foram agrupados em categorias funcionais específicas, como, mecanismos de resistência (bomba de efluxo, modificações de permeabilidade membranar, inativação

enzimática de antimicrobianos, respostas ao estresse oxidativo, biossíntese de polissacarídeo, formação de biofilmes, sistemas de aquisição de Ferro e metabolismo secundário).

Esse agrupamento manual ofereceu um panorama funcional detalhado, destacando os genes e vias mais relevantes na resistência antimicrobiana. A integração dessas informações permite priorizar alvos para intervenções terapêuticas e para o desenvolvimento de estratégias de controle da disseminação de cepas resistentes de *Klebsiella pneumoniae*.

#### 4.9 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram conduzidas utilizando os softwares GraphPad Prism 9 e R com RStudio (versão 4.2.2). Para a determinação da sensibilidade antimicrobiana, os valores de MIC foram analisados por ANOVA unidirecional, seguida do teste de Tukey. A curva de crescimento bacteriano foi ajustada a um modelo sigmoidal e analisada por ANOVA de medidas repetidas com correção de Greenhouse-Geisser.

O crescimento de *Klebsiella pneumoniae* na presença de meropenem, gentamicina e ciprofloxacina foi avaliado por ANOVA fatorial de duas vias, seguido de correção de Sidak. A análise do transcriptoma foi conduzida com DESeq2, considerando genes diferencialmente expressos com  $\log_2$  fold-change  $\geq 1$  ou  $\leq -1$ , corrigido pelo método de Benjamini-Hochberg.

As imagens foram analisadas estatisticamente: nas curvas de crescimento, utilizou-se ANOVA de medidas repetidas com correção de Bonferroni; nos gráficos de violino, o teste de Mann-Whitney U comparou a expressão gênica entre grupos controle e tratados. No volcano plot, a análise de dispersão gênica foi realizada pelo teste de Wald, com correção de Bonferroni para múltiplas comparações. Para todos os testes, foi adotado um nível de significância de  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Ensaio de sensibilidade aos antimicrobianos

#### 5.1.1 Disco-difusão

Os dados de sensibilidade de *K. pneumoniae* aos antimicrobianos ciprofloxacino, gentamicina e meropenem estão expressos na Figura 4.

Figura 4. Sensibilidade de *Klebsiella pneumoniae* a meropenem, ciprofloxacino e gentamicina pelo método de disco-sifusão.



Legenda: Tesde de disco-difusão realizado com três antimicrobianos: meropenem (MER), ciprofloxacino (CIP) e gentamicina (GEN), aplicados em discos padronizados. Observa-se a ausência de halos de inibição ao redor de todos os discos, indicando resistência da cepa aos antimicrobianos testados. Fonte: Laboratório de Doenças Infecciosas – LDI/UFC.

Ao redor de cada disco, é possível observar a ausência de halos de inibição de crescimento bacteriano, indicando resistência aos antimicrobianos utilizados e, em associação aos dados de sensibilidade automatizada avaliada por VITEK®, a cepa pode ser classificada como XDR (*Extensively Drug-Resistant*).

### 5.1.2 Microdiluição em caldo

As concentrações inibitórias mínimas (CIM) de meropenem, ciprofloxacino e gentamicina frente a *Klebsiella pseudomoniae* e do controle de crescimento *Escherichia coli* ATCC estão descritas na Tabela 1.



Tabela 1. Concentração Inibitória Mínima ( $\mu\text{g/ml}$ ) de Meropenem, Ciprofloxacino e Gentamicina frente *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase.

Espécie	Ciprofloxacina	Gentamicina	Meropenem
<i>Klebsiella pneumoniae</i>			
Faixa de concentrações	2- 1024	2- 1024	4- 2048
CIM	64	256	256
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922			
Faixa de concentrações	-	-	0.008 - 4
CIM	-	-	0.06

Legenda: CIM:Concentração Inibitória Mínima; ATCC: American Type Culture Collection.  
Fonte: Laboratório de Doenças Infecciosas – LDI/UFC.

Para ciprofloxacino e gentamicina, *Klebsiella pseudomoniae* foi testada em faixa valores de concentração com valores variando entre 2 a 1024  $\mu\text{g/ml}$ , tendo obtido CIM de 64  $\mu\text{g/ml}$  para ciprofloxacino e 256  $\mu\text{g/ml}$  para gentamicina. No caso do meropenem, *Klebsiella pseudomoniae* foi testada em concentrações que variaram de 4 a 2048  $\mu\text{g/ml}$ , o qual apresentou CIM de 256  $\mu\text{g/ml}$ . Como controle de validação do teste, foi incluída a cepa de *E. coli* ATCC 25922, a qual exposta a concentrações de 0,008 a 4  $\mu\text{g/ml}$  e ela apresentou um perfil de sensibilidade com CIM de 0,06  $\mu\text{g/ml}$ , valor correspondente aos padrões preconizados pelo CLSI.

### 5.1.3 Método automatizado VITEK®

A sensibilidade aos antimicrobianos por método automatizado VITEK® estão descritas na Tabela 2. O método foi utilizado para confirmação de identificação da cepa e avaliação da sensibilidade aos antimicrobianos clínicos usados isoladamente e em combinação.

Tabela 2. Concentração Inibitória Mínima ( $\mu\text{g/ml}$ ) de diferentes antimicrobianos por método automatizado VITEK®

Antibiótico	CIM	Interpretação
Amoxicilina/Ácido clavulânico		

Urina	$\geq 32$	R
Outro	$\geq 32$	R
Piperacillina/Tazobactam	$\geq 128$	R
Cefuroxima	$\geq 64$	R
Cefuroxima Axetil	$\geq 64$	R
Ceftazidima	32	R
Ceftriaxona		
Meningite	$\geq 64$	R
Outro	$\geq 64$	R
Ceftazidima/Avibactam	1	S
Ceftolozana/Tazobactam	$\geq 32$	R
Cefepima	$\geq 32$	R
Aztreonam	$\geq 64$	R
Ertapenem	$\geq 8$	R
Meropenem		
Meningite	$\geq 16$	R
Outro	$\geq 16$	R
Amicacina	32	R
Gentamicina	$\geq 16$	R
Ciprofloxacina	$\geq 4$	R
Tigeciclina	1	R

Legenda: CIM:Concentração Inibitória Mínima; R: Resistente; S: Sensível.

A cepa identificada por este método como *Klebsiella pneumoniae* apresentou resistência a grande maioria dos antimicrobianos testados, apresentando sensibilidade apenas a combinação de Ceftazidime/Avibactam, sendo a CIM de 1 µg/ml. Ao meropenem, a cepa apresentou resistência com CIM de  $\geq 16$  µg/ml para gentamicina.

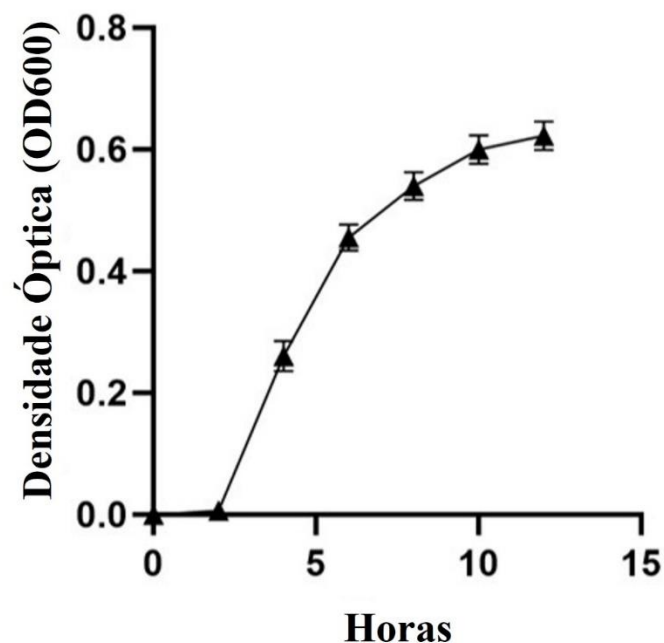
## 5.2 Curva de crescimento de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase

A curva de crescimento de *K. pneumoniae* é apresentada no gráfico da Figura 5. A curva apresentada segue um padrão sigmoidal, que pode ser dividido em três fases distintas. A fase lag, entre 0 e 1 hora, é marcada pela ausência de crescimento significativo, com valores de

OD600 próximos de zero. Nesta etapa, as células estavam se adaptando ao meio de cultura, sintetizando enzimas e ajustando-se às condições para iniciar a divisão celular.

A partir de 1 hora tem início a fase exponencial, que se estende até aproximadamente 5 a 6 horas. Durante essa etapa, observa-se um rápido aumento da densidade óptica, que atinge valores superiores a 0.4. Por volta das 5-6 horas, inicia-se a fase estacionária, que se estende até cerca de 12 horas. Nesta etapa, o crescimento desacelera progressivamente e atinge um platô, com valores de OD600 estabilizados em torno de 0.6 a 0.65. No geral, a curva apresentou uma inclinação inicial íngreme na fase exponencial, seguida de uma estabilização gradual durante a fase estacionária.

Figura 5. Curva de crescimento de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase em 12 horas

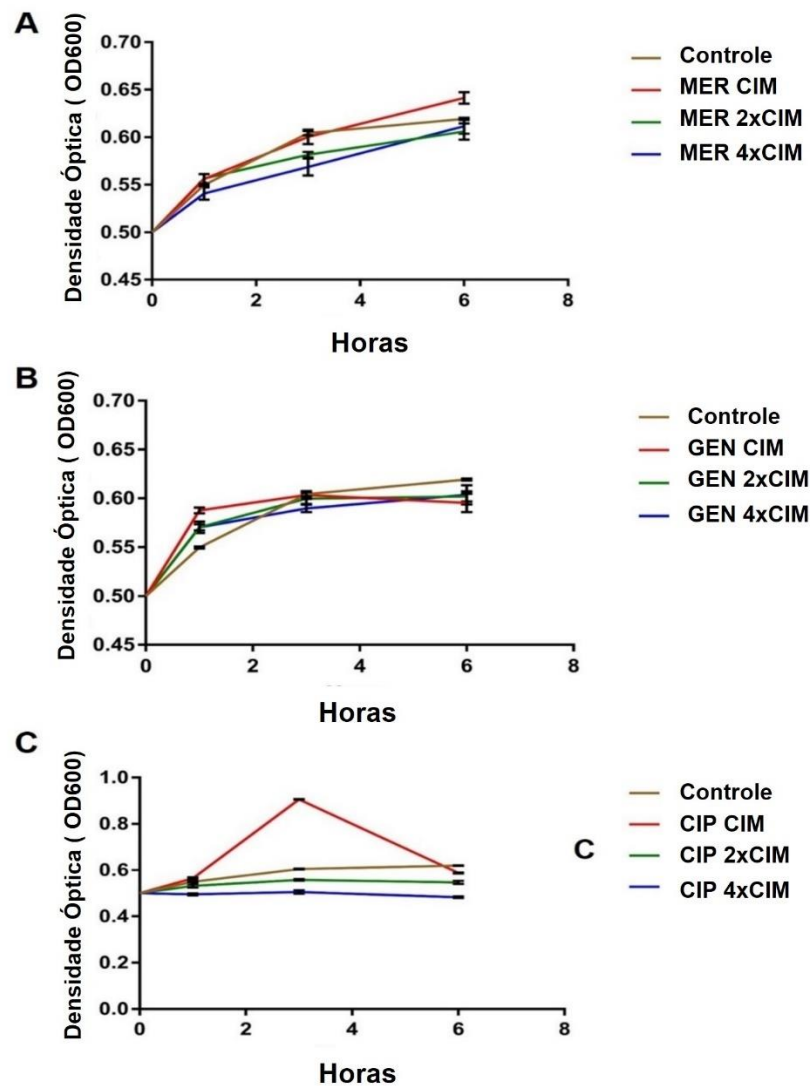


Legenda: A curva de crescimento de *K. pneumoniae* obtida por meio da leitura da densidade óptica (OD600) em intervalos regulares de tempo, durante 12 horas, demonstra uma fase inicial de lag (0 a 1 hora), seguida por uma fase exponencial rápida entre aproximadamente 2 e 6 horas, caracterizada por aumento expressivo da densidade celular. A partir de 7 horas, nota-se a transição para a fase estacionária, com valores médios de OD600 estabilizando entre 0,6 e 0,65. Os pontos representam a média de três experimentos independentes, e as barras de erro indicam o desvio-padrão. Fonte: Laboratório de Doenças Infecciosas – LDI/UFC.

### 5.3 Curva de crescimento de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemases expostas a diferentes concentrações de antibacterianos

Quanto à curva de crescimento de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemases expostas a diferentes concentrações de antibacterianos, a Figura 6 apresenta os gráficos distintos que mostram o crescimento bacteriano, ao longo de 8 horas, em condições de controle e sob diferentes concentrações de três antimicrobianos: meropenem (MER), gentamicina (GEN) e ciprofloxacino (CIP). Foram testadas três concentrações em crescimento logarítmico de 2: CIM, 2xCIM e 4xCIM.

Figura 6. Curva de crescimento de *Klebsiella pneumoniae* pós-exposição à diferentes concentrações de CIM de meropenem, gentamicina e ciprofloxacino.



Legenda: Crescimento de *K. pneumoniae* avaliado pela densidade óptica (OD600) ao longo de 6 horas de incubação, na ausência e presença de diferentes concentrações de antimicrobianos. Em (A), o meropenem (MER) demonstra discreta redução da taxa de crescimento apenas nas concentrações mais elevadas (2xCIM e 4xCIM); em (B), a gentamicina (GEN) não promove diferença significativa em relação ao controle, mesmo em concentrações elevadas; em (C), a ciprofloxacino (CIP) apresenta um aumento transitório da densidade óptica

seguido de estabilização na CIM, enquanto em 2xCIM e 4xCIM o crescimento se mantém próximo ao controle. Cada ponto representa a média de três experimentos independentes, e as barras correspondem ao desvio-padrão. Control: Controle; MER: Meropenem; GEN: Gentamicina; CIP: Ciprofloxacino. Fonte: Laboratório de Doenças Infecciosas – LDI/UFC.

Referente ao meropenem, observa-se que ao longo do tempo, mesmo as concentrações mais altas (2xCIM e 4xCIM) estimulam significativamente o crescimento bacteriano, aumentando a OD ao longo de 6 horas. No entanto, na concentração de CIM, o crescimento bacteriano é estimulado acima dos valores de controle após 6 horas de exposição. Esse comportamento sugere que *K. pneumoniae* consiga se adaptar a concentrações iguais ou superiores à CIM, exigindo concentrações acima de 4xCIM para um efeito bactericida contra a *K. pneumoniae*.

O gráfico B (Figura 6B), relacionado à gentamicina, revela um padrão diferente. A concentração CIM tem um impacto maior no crescimento bacteriano em comparação às concentrações 2xCIM e 4xCIM, que apresentam uma redução menos evidente na densidade óptica. Entretanto, mesmo nessas concentrações elevadas, o crescimento bacteriano é visível, sugerindo que a bactéria possui alguma resistência intrínseca ou adaptativa ao antimicrobiano, exigindo concentrações maiores para controle efetivo.

Por fim, o gráfico C (Figura 6C), que avalia a exposição de *K. pneumoniae* a ciprofloxacino, apresenta um comportamento distinto dos outros dois antimicrobianos, com pouca estimulação de crescimento em relação aos demais antimicrobianos testados. Entretanto, na concentração CIM, há um pico de densidade óptica em 2 horas, seguido por uma redução acentuada, indicando que o antimicrobiano exerce um efeito estimulatório rápido inicial, mas que pode ser revertido posteriormente. As concentrações 2xCIM e 4xCIM mantêm a bactéria com densidades ópticas consistentemente baixas ao longo do tempo, mostrando eficácia significativa em inibir o crescimento.

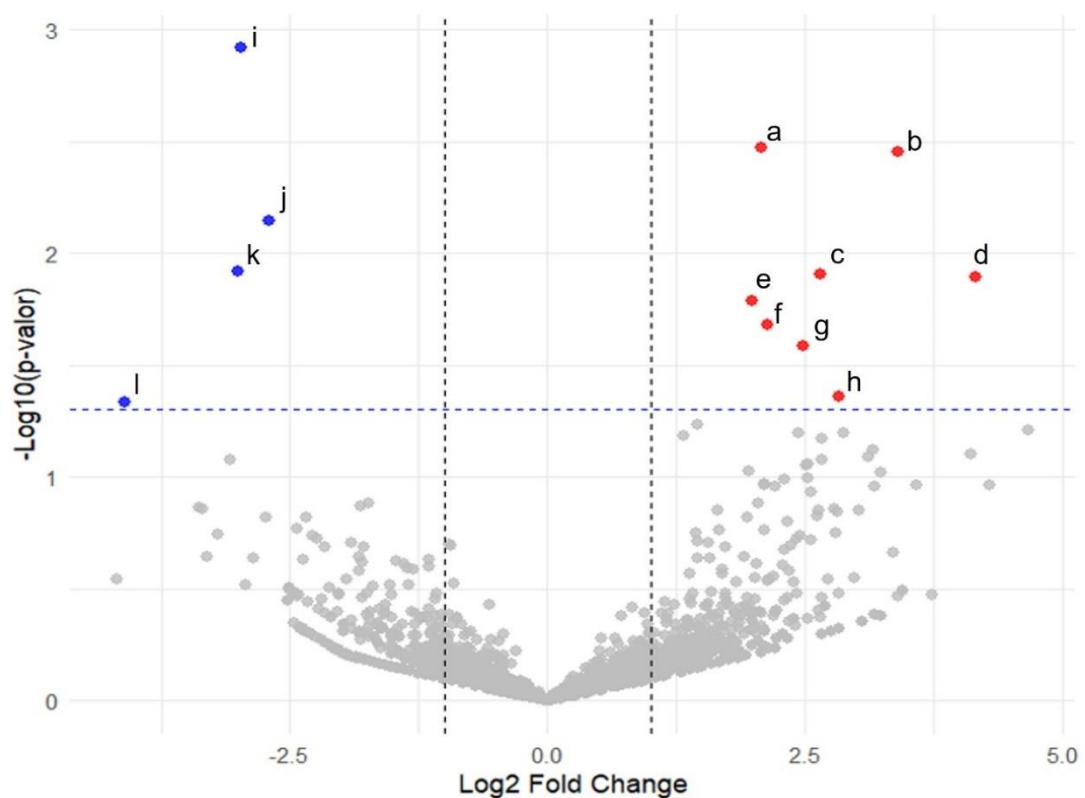
#### **5.4 Modificação de transcritos de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemases pós-exposição a Meropenem**

Os dados obtidos a partir das análises de RNA-seq foram organizados em um conjunto de 18 tabelas que compõe o ANEXO A. A tabela 3 apresenta uma lista completa de genes de *Klebsiella pneumoniae* expressos 2x mais após exposição a CIM de meropenem, sendo identificados por seus códigos de locus (Refseq Locus Tag e Alt Locus Tag) e os produtos associados. Os 312 genes identificados desempenham papéis variados, desde a regulação

transcricional até a participação em vias metabólicas e de transporte. Já os dados organizados na tabela 4 indicam que *Klebsiella pneumoniae*, após exposição à concentração inibitória mínima (CIM) de meropenem, apresentou redução de duas vezes na expressão de vários genes, incluindo aqueles relacionados à montagem de sistemas de secreção, metabolismo e respiração celular.

Diante dos 312 transcritos identificados de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase pós-exposição a meropenem, a Figura 7 apresenta a expressão diferencial desses transcritos em gráfico vulcão plot. Os pontos vermelhos foram transcritos que foram regulados positivamente, os azuis foram reguladores negativos, e os não significantes em cinza ( $p < 0,05$ ). Ao todo, 8 transcritos regularam positivamente e 4 negativamente.

Figura 7. Expressão diferencial de transcritos de *Klebsiella pneumoniae* pós exposição ao meropenem.



**Legenda:** Oito genes significativamente superexpressos ( $p < 0,05$ ) são mostrados à direita (vermelho), enquanto quatro genes significativamente subexpressos ( $p < 0,05$ ) estão à esquerda (azul). Genes não significativos estão agrupados próximos ao centro (cinza). a: inibidor associado ao ribossomo A; b: proteína hipotética; c: transposase putativa InsK para o elemento de sequência de inserção IS150; d: D-ribose piranase; e: transglicosilase insensível à penicilina e da transpeptidase PBP-1C; f: proteína de formação de septo Maf; g: proteína hipotética; h:

proteína UPF0306 YhbP; i: proteína hipotética; j: proteína de membrana não caracterizada UPF0118; k: proteína hipotética; l: proteína hipotética.

O aumento do transcrito ( $p < 0,05$ ) de *Refseq Locus Tag* KPHS\_39890, que está relacionado ao inibidor A associado ao ribossomo (Figura 7 – a) pode estar associada ao mecanismo de adaptação ao estresse antibiótico, promovendo supressão da síntese proteica e possível indução de um estado de persistência ou dormência bacteriana, que pode contribuir para a tolerância ao antibiótico.

Além desse, alguns transcritos classificados como hipotéticos, como os de *Refseq Locus Tag* KPHS\_21930, KPHS\_30290 e KPHS\_39420 (Figura 7 – b,g), cujas funções ainda não foram caracterizadas, também tiveram expressão significativamente aumentada ( $p < 0,05$ ). Esses genes representam áreas potenciais de pesquisa que podem revelar novas vias metabólicas ou fatores de virulência bacteriana.

O *Refseq Locus Tag* KPHS\_50590 codifica o transcrito nomeado transposase InsK (Figura 7 – c) também aumentou significativamente expressão ( $p < 0,05$ ), o que sugere a ativação de elementos genéticos móveis que podem influenciar a variabilidade genômica e a adaptação bacteriana. Já o transcrito de *Refseq Locus Tag* KPHS\_00070 codifica uma D-ribose piranase (Figura 7 – d), uma enzima envolvida na degradação de carboidratos, que pode proporcionar fontes diversificadas de energia para *K. pneumoniae*, e também demonstrou um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na expressão após exposição ao meropenem.

Ainda sobre o aumento da expressão gênica, KPHS\_39210 que codifica o transcrito transglicosilase insensível à penicilina e da transpeptidase PBP-1C (Figura 7 – e) em *K. pneumoniae* também apresentou aumento, o que sugere que a bactéria pode estar ativando mecanismos compensatórios para manter a biossíntese da parede celular mesmo sob pressão do meropenem. Isso pode indicar uma via alternativa de tolerância, potencialmente associada a resistência por PBP modificadas ou superexpressas.

O aumento da expressão do transcrito associado a KPHS\_47870, que codifica a proteína Maf de formação do septo (Figura 7 – f), sugere um possível aumento na divisão celular sob estresse antimicrobiano. Além desse, outros genes relacionados à adaptação bacteriana foram positivamente regulados ( $p < 0,05$ ), como o gene KPHS\_46990, que codifica a proteína UPF0306 YhbP (Figura 7 – h), a qual pode estar envolvido em funções estruturais ou interações proteína-proteína dentro da célula bacteriana.

Por outro lado, outro grupo de transcritos que geram proteínas de função desconhecida como aqueles de *Refseq Locus Tag* KPHS\_13360, KPHS\_02850 e KPHS\_31530

(Figura 7 – i, k, l), classificadas como produtores de proteínas hipotéticas tiveram expressão reduzida ( $p < 0,05$ ). A presença desses genes na lista de genes suprimidos destaca a necessidade de estudos adicionais para caracterizar suas funções.

Além desses, o *Refseq Locus Tag* KPHS\_36920, que codifica uma proteína de membrana UPF0118 não caracterizada (Figura 7 – j ) também teve expressão reduzida ( $p < 0,05$ ), o que pode estar associado a funções estruturais ou de transporte, embora seu papel específico permaneça indeterminado. Sua regulação negativa sugere um possível ajuste na composição da membrana em resposta ao estresse induzido pelo meropeném.

### **5.5 Modificação na expressão gênica de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemases pós-exposição a Meropenem**

A Figura 8 mostra a expressão gênica em diversas categorias metabólicas modificadas. De maneira geral, os dados indicam que a maioria dos processos metabólicos fundamentais da bactéria permanece estável. Essa estabilidade é evidente em categorias como metabolismo de carboidratos, aminoácidos, lipídeos e energia, que são essenciais para a sobrevivência celular.



Figura 8. Expressão gênica em diferentes vias metabólicas em *Klebsiella pneumoniae* pós exposição ao Meropenem.

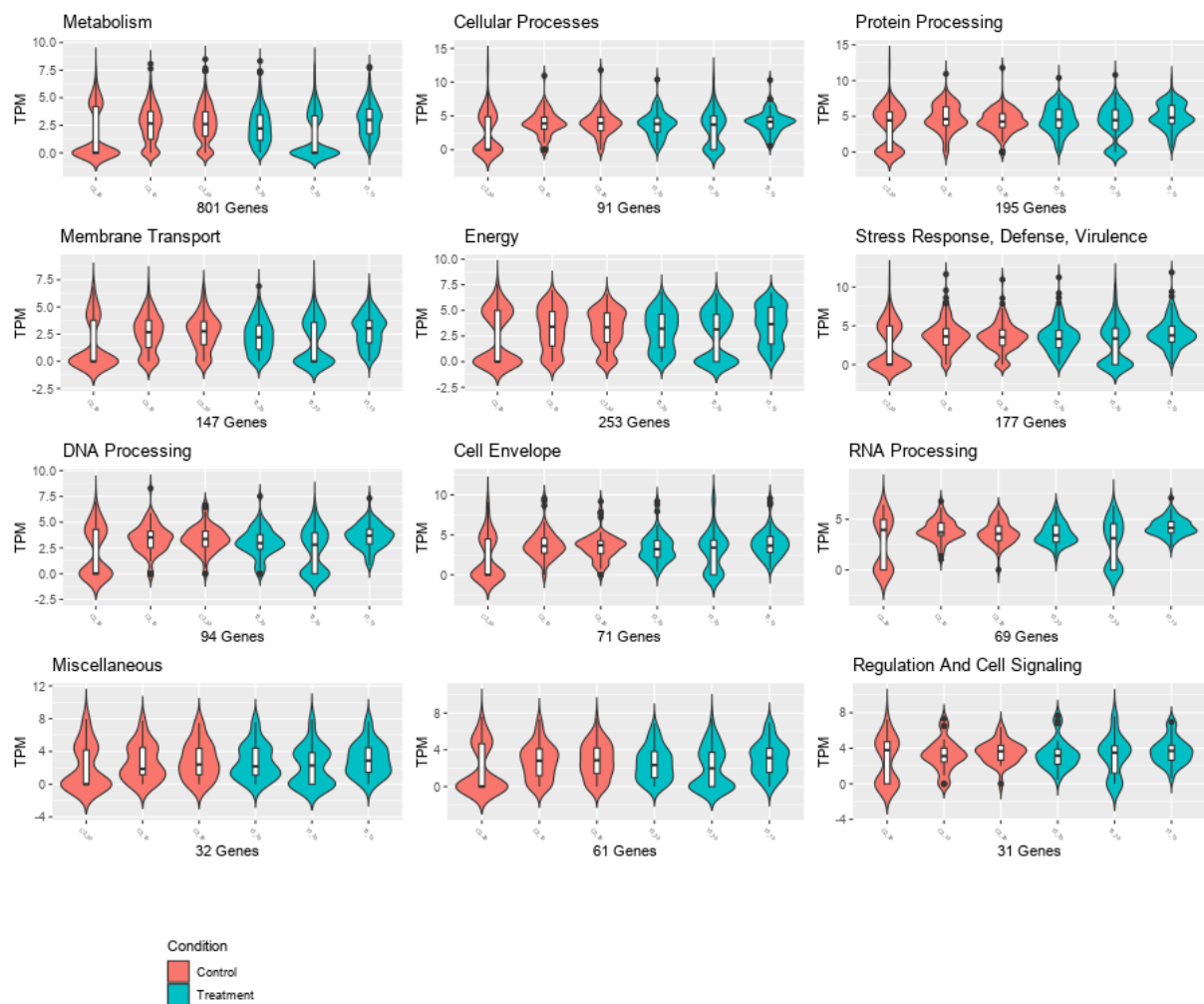


Legenda: A análise do transcriptoma de *K. pneumoniae* exposta ao meropenem em comparação com controle livre de drogas, evidenciando a variação na expressão gênica (TPM — *Transcripts Per Million*) em diferentes vias metabólicas e funcionais. Cada painel representa um conjunto específico de genes, e cada violino ilustra a distribuição dos níveis de expressão para os genes associados à respectiva via. Foram identificadas alterações significativas em vias relacionadas ao metabolismo central da bactéria, incluindo metabolismo de carboidratos (340 genes), aminoácidos (256 genes), nucleotídeos (117 genes), lipídios (105 genes), energia (157 genes) e cofatores/vitaminas (181 genes), biossíntese de metabólitos secundários (107 genes), xenobióticos (106 genes), compostos não ribossomais (47 genes), bem como no metabolismo de outros aminoácidos (82 genes); ajustes adaptativos em processos de tradução (21 genes), transdução de sinal (5 genes) e resposta imunológica bacteriana (1 gene).

De todas as categorias avaliadas, houve uma leve alteração em genes relacionados à tradução (21 genes) e transdução de sinal (5 genes), possivelmente indicando que a exposição ao meropenem desencadeia respostas adaptativas sutis, reguladas por mecanismos de sinalização celular e síntese proteica. Por outro lado, a estabilidade geral observada em quase todas as categorias metabólicas sugere que *Klebsiella pneumoniae* consegue manter suas funções metabólicas e estruturais mesmo sob pressão do meropenem. Esse comportamento reflete a capacidade de adaptação da bactéria, possivelmente por meio de mecanismos regulatórios que minimizam o impacto do antimicrobiano em suas vias centrais.

Quanto às mudanças morfofuncionais, a Figura 9 mostra a análise da expressão gênica em diversas categorias morfofuncionais.

Figura 9. Análise da expressão gênica em *Klebsiella pneumoniae* pós exposição a CIM de Meropenem.

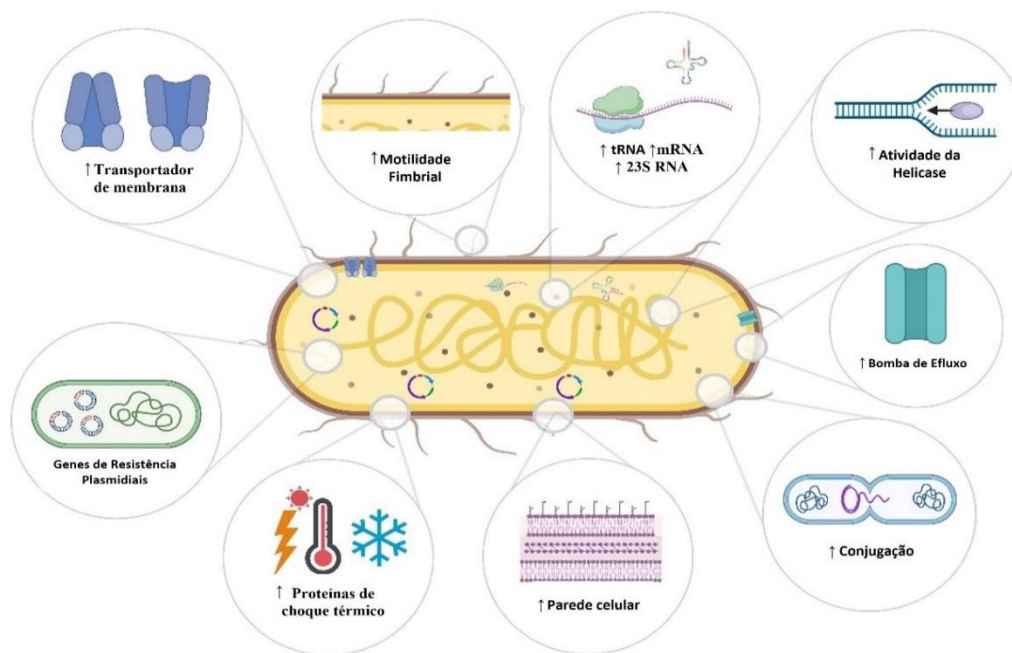


Legenda: Análise diferencial de expressão gênica (TPM — *Transcripts Per Million*) de *K. pneumoniae* exposta ao meropenem comparada ao controle livre de drogas, destacando as vias e processos biológicos mais modulados. Cada painel representa um agrupamento funcional de genes, com distribuição dos níveis de expressão em cada categoria. Observa-se impacto significativo no metabolismo global (801 genes), incluindo processos celulares (91 genes), processamento de proteínas (195 genes), transporte de membrana (147 genes) e metabolismo energético (253 genes), bem como em genes relacionados à resposta ao estresse, defesa e virulência (177 genes), no processamento de DNA (94 genes), formação e manutenção do envelope celular (71 genes), processamento de RNA (69 genes), sinalização e regulação celular (31 genes), genes diversos (32 genes).

Os genes associados à categoria de resposta ao estresse, defesa e virulência (177 genes) apresentaram diferença entre a cepa exposta ao Meropenem e a cepa não exposta, indicando uma possível indução de genes relacionados a mecanismos de defesa ou adaptação celular em resposta à exposição ao meropenem. Assim, os dados sugerem que, embora a maioria das funções celulares permaneça inalterada entre controle e exposição ao meropenem, há uma ativação de genes associados à defesa e virulência, o que pode indicar uma resposta adaptativa ao antimicrobiano. Essas observações apontam para uma estabilidade geral dos processos celulares, com respostas localizadas a estímulos externos na categoria de estresse e defesa.

A exposição de *Klebsiella pneumoniae* ao meropenem induziu diversas modificações morfofuncionais que refletiram a adaptação da bactéria ao estresse antimicrobiano. Visando o detalhamento das tabelas 3 e 4, neste trabalho, essas alterações estão listadas nas tabelas 5 a 15 anexadas (ANEXO A). Ademais, diante do grande volume de dados de transcritos gerados das análises realizadas, e a fim de promover a compreensão das principais alterações encontradas, a Figura 10 foi construída para destacar os principais fatores relacionados à resistência antimicrobiana e remodelação funcional à adaptação ao ambiente encontrada neste trabalho.

Figura 10. Adaptações morfofuncionais em *Klebsiella pneumoniae* pós exposição a CIM de meropenem.

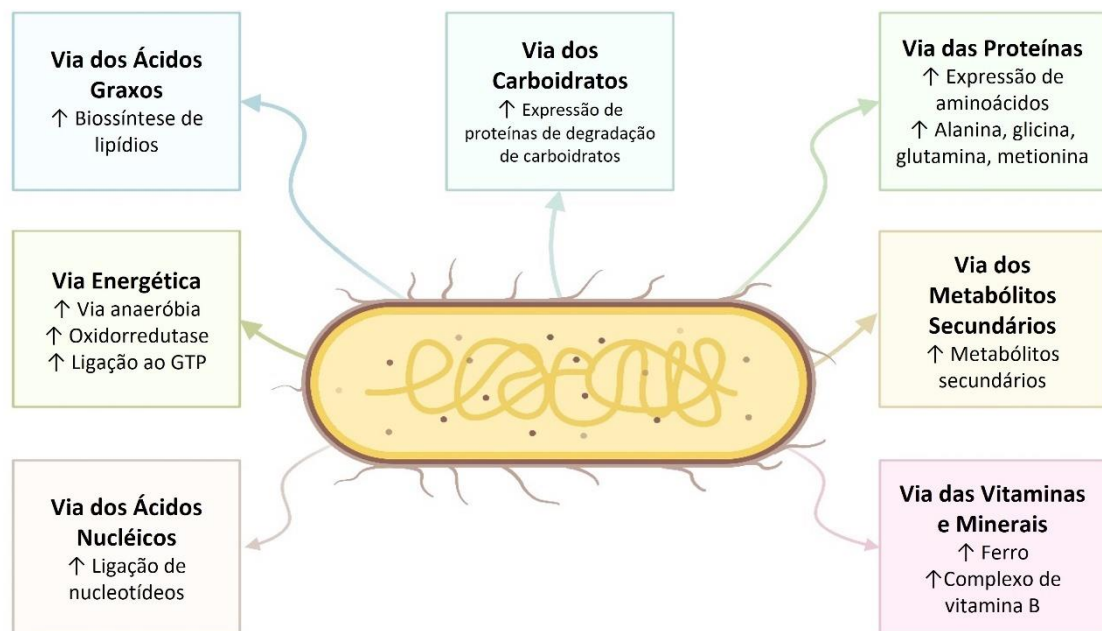


Legenda: Os principais mecanismos moleculares e celulares ativados por *K. pneumoniae* durante a exposição ao antibiótico meropenem: aumento do transporte de membrana, motilidade fimbrial, na expressão de tRNA, mRNA e 23S rRNA, e da atividade de helicases; ativação de bombas de efluxo, a intensificação da transferência horizontal de genes por conjugação; há o aumento da expressão de proteínas de choque térmico, e o reforço da parede celular. Fonte: autoria própria, 2025.

A exposição de *Klebsiella pneumoniae* ao meropenem desencadeou alterações significativas na expressão de genes associados ao metabolismo. A fim de detalhar e relacionar os transcritos com as diferentes vias metabólicas, as Tabelas 16 a 22 trazem os transcritos envolvidos no metabolismo de ácidos graxos, carboidratos, proteínas, energético, metabólitos secundários, ácidos nucleicos e de vitaminas e minerais, respectivamente.

Em resumo, quanto às vias metabólicas, a Figura 11 apresenta um esquema que detalha as principais vias ativadas em *K. pneumoniae* após exposição a CIM de meropenem, destacando diferentes vias que contribuem para sua sobrevivência e adaptação a condições específicas. Cada uma dessas vias está associada a processos essenciais, como produção de energia, biossíntese de macromoléculas e aquisição de nutrientes, que permitiram à bactéria sustentar sua viabilidade após exposição ao meropenem.

Figura 11. Vias metabólicas ativadas em *K. pneumoniae* pós exposição a CIM de meropenem



Legenda: A análise integrada da expressão gênica e a reorganização metabólica de *Klebsiella pneumoniae* exposta ao antibiótico meropenem evidenciaram múltiplas adaptações para garantir a sobrevivência celular, tais como: aumento na biossíntese de lipídios; maior expressão de proteínas relacionadas à degradação e utilização de açúcares na via dos carboidratos, favorecendo a obtenção de energia para sustentar os processos adaptativos; aumento na expressão de aminoácidos essenciais, como alanina, glicina, glutamina e metionina na via das proteínas, fundamentais para reparo e síntese proteica; a ativação de rotas anaeróbias, maior atividade de oxidorredutases e elevação do consumo de GTP na via energética, o que indica a adoção de um metabolismo alternativo capaz de manter a viabilidade celular em condições de estresse; produção aumentada de moléculas protetoras na via dos metabólitos secundários; elevação na síntese e ligação de nucleotídeos na via dos ácidos nucleicos, promovendo a replicação e reparo do DNA danificado; maior captação e utilização de ferro e vitaminas do complexo B na via das vitaminas e minerais, elementos essenciais para reações enzimáticas e manutenção do metabolismo celular. Esses ajustes são acompanhados por aumento da motilidade fimbrial, ativação de transportadores de membrana, incremento de bombas de efluxo, expressão de genes de resistência plasmidial e produção de proteínas de choque térmico, mecanismos que, em conjunto, fortalecem a resistência bacteriana. Fonte: autoria própria, 2025.

## 6 DISCUSSÃO

A resistência antimicrobiana de *Klebsiella pneumoniae* representa um desafio crescente em ambientes nosocomiais, especialmente devido à sua capacidade de adquirir mecanismos de resistência que limitam as opções terapêuticas (Prestinaci et al., 2015). Entre os antibióticos frequentemente utilizados nas infecções causadas por essa bactéria, destacaram-se a gentamicina, a ciprofloxacina e o meropenem. A gentamicina pertence à classe dos aminoglicosídeos e é frequentemente utilizada para o tratamento de infecções graves por *K.*

*pneumoniae*, apesar do risco de nefrotoxicidade e ototoxicidade (Thy et al., 2023). Já a ciprofloxacina, um fluoroquinolona, apresenta eficácia contra infecções urinárias e sistêmicas, mas o uso excessivo tem levado à disseminação de clones resistentes globalmente (Fuzi et al., 2020). O meropenem, um carbapenêmico, é considerado um dos principais antibióticos para o tratamento de infecções por *K. pneumoniae* produtora de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido e carbapenemases (Elkady et al., 2024). No presente estudo, esses três antimicrobianos foram selecionados para avaliação da resistência da cepa de *K. pneumoniae* devido ao seu amplo uso clínico e à necessidade de entender sua eficácia frente a cepas multirresistentes, para isso foram realizados ensaios de sensibilidade por 3 métodos diferentes.

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) é fundamental para avaliar a resistência de *K. pneumoniae* em contextos laboratoriais e clínicos, permitindo a adequação da terapia antimicrobiana e evitando falhas terapêuticas (Kerneis et al., 2021). Os resultados obtidos neste estudo classificaram a cepa analisada como XDR (extensivamente resistente a medicamentos), uma condição preocupante que reduz significativamente as opções terapêuticas disponíveis. A resistência extensiva às drogas antibacterianas está associada a altas taxas de mortalidade, especialmente em pacientes imunocomprometidos ou em unidades de terapia intensiva (Li et al., 2024). A disseminação de cepas XDR está diretamente relacionada ao uso inapropriado de antibióticos, destacando a importância do monitoramento da resistência e do desenvolvimento de estratégias para contenção de sua propagação (Shettar et al., 2025). Assim, a detecção precoce dessas cepas e a correta interpretação da CIM são essenciais para a compreensão da biologia de *K. pneumoniae* visando possibilidades de implementação de estratégias de controle.

As CIM foram obtidas por 3 métodos diferentes: difusão em disco, microdiluição em caldo e automatizado através de uso do VITEK®. Em todos os métodos, a cepa demonstrou resistência a todos os antibióticos testados. Entre esses métodos, a difusão em disco é qualitativo e permitiu uma avaliação rápida da sensibilidade bacteriana, enquanto a microdiluição em caldo e o VITEK® são métodos quantitativos, fornecendo valores exatos de MIC (Findlay et al., 2012).

No presente estudo, os valores de CIM obtidos foram  $\geq 16$   $\mu\text{g/mL}$  para meropenem,  $\geq 4$   $\mu\text{g/mL}$  para ciprofloxacina e  $\geq 16$   $\mu\text{g/mL}$  para gentamicina, classificando a cepa como resistente a todos os antibióticos testados. De acordo com os critérios do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2018), os pontos de corte para resistência em *K. pneumoniae* são  $\geq 4$   $\mu\text{g/mL}$  para meropenem,  $\geq 1$   $\mu\text{g/mL}$  para ciprofloxacina e  $\geq 8$   $\mu\text{g/mL}$  para gentamicina. Já os critérios do *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

(BRcast, 2024) estabelecem  $\geq 8$   $\mu\text{g/mL}$  para meropenem,  $\geq 1$   $\mu\text{g/mL}$  para ciprofloxacina e  $\geq 4$   $\mu\text{g/mL}$  para gentamicina como limites de resistência. Comparando os valores obtidos com esses padrões, observa-se que a CIM da cepa estudada está acima dos pontos de corte definidos por ambas as diretrizes, confirmando um fenótipo altamente resistente.

O estudo de Elkady et al. (2024) identificou valores de CIM para meropenem variando entre 8 e 32  $\mu\text{g/mL}$  em isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae*, avaliando a disseminação de mecanismos de resistência gênica entre essas cepas. Comparando com os resultados do presente estudo, no qual a CIM para meropenem foi  $\geq 16$   $\mu\text{g/mL}$ , observa-se que o valor encontrado corrobora com a faixa reportada por Elkady et al. (2024), reforçando a gravidade da resistência a carbapenêmicos em diferentes contextos. Esses achados indicam que a resistência ao meropenem pode atingir níveis elevados independentemente da origem do isolado, sugerindo um padrão global de disseminação da resistência. Além disso, a alta CIM observada no presente estudo (256  $\mu\text{g/mL}$ ) sugere que a resistência pode estar associada à presença de carbapenemases e alterações na permeabilidade da membrana bacteriana, conforme descrito por Elkady et al. (2024). Neste trabalho, a produção de carbapenemase foi comprovada por ensaio imunocromatográfico Ng-Test Carba 5®.

A partir dos dados de sensibilidade, com a determinação da CIM, foi realizada a curva de crescimento de *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase para reconhecimento da fase log e análise comparativa da curva de crescimento da cepa após exposição aos antibacterianos selecionados, a fim de selecionar o antibacteriano que estimulasse maior adaptação metabólica para análises transcriptômicas.

O crescimento bacteriano ocorre em diferentes fases que refletem a adaptação do microrganismo ao meio e suas condições fisiológicas. No presente estudo, a curva de crescimento da *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase apresentou três fases bem definidas: fase de latência (*lag phase*), fase exponencial (*log phase*) e fase estacionária (*stationary phase*). A fase de latência foi caracterizada por um período inicial de adaptação ao meio (~1 hora), no qual as células ajustam seu metabolismo antes de iniciarem a divisão celular ativa. Esse comportamento é comum em *K. pneumoniae* e está associado à necessidade de ativação de sistemas metabólicos específicos para sobrevivência e crescimento, incluindo modulação de proteínas de membrana e mecanismos de detoxificação (Kerneis et al., 2021; Marzouk et al., 2024; Mehrota et al., 2023).

Em seguida, a bactéria entrou na fase exponencial (~5–6 horas), na qual houve um rápido aumento da densidade celular, demonstrando alta capacidade replicativa. Esse crescimento acelerado sugere um metabolismo altamente ativo e eficiente na captação de

nutrientes, favorecendo a disseminação da bactéria no hospedeiro e aumentando sua virulência (Findlay et al., 2012; Yao et al., 2023; Fan et al., 2024). Por isso, este período foi selecionado para os testes de exposição aos antibacterianos.

Após determinação da fase log (exponencial), a cepa foi exposta a concentrações de CIM, 2xCIM e 4xCIM de gentamicina, ciprofloxacina e meropenem. A exposição à gentamicina impactou a curva de crescimento da *K. pneumoniae* através da fase de latência, a qual foi ligeiramente prolongada, porém a redução na taxa de crescimento na fase exponencial foi mais acentuada em comparação ao meropenem. Isso pode ser explicado pelo mecanismo de ação da gentamicina, que interfere diretamente na síntese proteica ao se ligar à subunidade 30S do ribossomo, resultando em proteínas defeituosas e na interrupção do crescimento bacteriano (Thy et al., 2023). Contudo, a sobrevivência das células na fase estacionária sugere que *K. pneumoniae* pode apresentar mecanismos de resistência enzimática e modificação de alvos ribossomais, reduzindo a eficácia da droga (Marzouk et al., 2024). Estudos indicam que modificações em enzimas aminoglicosídeo-acetiltransferases (AACs) e bombas de efluxo reduzem significativamente a penetração da gentamicina na célula bacteriana, conferindo resistência clínica significativa (Findlay et al., 2012; Mehrota et al., 2023).

A exposição à ciprofloxacina, por sua vez, causou uma fase de latência prolongada e uma redução drástica na fase exponencial, indicando que a bactéria enfrenta um grande desafio na replicação sob a ação desse antibiótico, possivelmente porque a ciprofloxacina atua inibindo as enzimas DNA girase e topoisomerase IV, fundamentais para a replicação do DNA bacteriano (Fuzi et al., 2020). No entanto, mesmo com essa inibição, a bactéria foi capaz de atingir a fase estacionária, o que pode estar associado a possíveis mutações em genes de DNA girase (*gyrA*, *gyrB*) e topoisomerase (*parC*, *parE*), bem como o envolvimento de bombas de efluxo na eliminação do antibiótico (Findlay et al., 2012; Yao et al., 2023; Fan et al., 2024). A literatura aponta que cepas resistentes a fluoroquinolonas frequentemente apresentam um conjunto de mutações que reduzem a afinidade do antibiótico pelas enzimas-alvo, permitindo que a bactéria continue sua replicação mesmo sob pressão seletiva do fármaco (Fuzi et al., 2020).

Já o meropenem impactou significativamente a taxa de crescimento da *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase. Nos ensaios realizados, a curva de crescimento apresentou um prolongamento da fase de latência, sugerindo que a bactéria necessita de um período maior de adaptação quando exposta ao antibiótico. Esse efeito pode estar relacionado à indução de mecanismos de resistência, como a hiperprodução de bombas de efluxo ou a modulação da expressão de porinas de membrana, estratégias já descritas para *K. pneumoniae*



resistente a carbapenêmicos (Elkady et al., 2024; Fan et al., 2024; Yao et al., 2023). Durante a fase exponencial, observou-se uma redução na taxa de crescimento, indicando que, apesar da resistência, o meropenem ainda exerce um efeito inibitório sobre a bactéria. Esse fenômeno pode estar relacionado ao custo metabólico da resistência, uma vez que a produção de carbapenemases e a ativação de mecanismos de adaptação podem comprometer a eficiência do metabolismo bacteriano (Li et al., 2024; Marzouk et al., 2024).

Ao atingir a fase estacionária, a densidade celular foi comparável à das culturas não expostas ao antibiótico, demonstrando que a bactéria consegue contornar o efeito do meropenem e manter sua viabilidade a longo prazo. Esse comportamento demonstra uma modulação morfofuncional e metabólica, pois sugere que, mesmo em presença de um carbapenêmico, a bactéria pode persistir no organismo e favorecer o desenvolvimento de infecções crônicas ou recidivas (Shettar et al., 2025; Mehrota et al., 2023). Diante desse comportamento, o meropenem foi escolhido como droga alvo dos testes seguintes, no qual foi avaliado o transcriptoma dessa cepa após exposição a CIM de meropenem.

Os achados deste estudo estão alinhados com aqueles relatados na literatura, onde a resistência a aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e carbapenêmicos em *K. pneumoniae* tem sido associada à modulação do metabolismo bacteriano, indução de vesículas de membrana externa (OMVs) e à capacidade de adaptação ao estresse imposto pelos antibióticos (Fan et al., 2024; Yao et al., 2023). Elkady et al. (2024) descreveram que isolados resistentes apresentam aumento da expressão de genes envolvidos na biossíntese de biofilme e na produção de proteínas de membrana, mecanismos que contribuem para a manutenção do crescimento em ambientes adversos. Além disso, Findlay et al. (2012) relataram que a resistência adquirida ao meropenem pode ser rápida e favorecer a seleção de subpopulações altamente resistentes.

A avaliação de transcritos demonstrou um aumento na expressão de genes associados ao metabolismo energético e à resposta ao estresse oxidativo após a exposição ao meropenem (Figuras 10 e 11). Entre os transcritos encontrados, destacaram-se aqueles relacionados à biossíntese de aminoácidos e à regulação do metabolismo de carboidratos, um padrão que também foi identificado por Liu et al. (2024) e Wright et al. (2014).

Em particular, os transcritos associados ao gene *soxS* (*KPHS\_17670*) foi altamente produzido, indicando uma ativação da via SoxRS, que está diretamente envolvida na proteção contra danos oxidativos. Esse achado está em consonância com Cain et al. (2018), que demonstraram que a adaptação a antibióticos muitas vezes envolve mecanismos de detoxificação celular para minimizar danos ao DNA e à membrana. Além disso, os transcritos associados ao gene *katG* (*KPHS\_09820*), codificador da catalase, também apresentou regulação

positiva, o que confirma a ativação de mecanismos antioxidantes para lidar com o estresse induzido pelo meropenem (Sundaresan et al., 2024).

Outro aspecto relevante foi o aumento da presença de transcritos associados ao gene *putA* (*KPHS\_16550*), envolvido ao metabolismo da prolina, um aminoácido que desempenha um papel fundamental na geração de energia em condições de estresse. Esse achado sugere que *K. pneumoniae* pode modificar suas vias metabólicas para garantir a produção eficiente de ATP, mesmo sob estresse antimicrobiano (Wyres et al., 2019). Além disso, verificou-se um aumento na expressão dos transcritos associados aos genes *pfkA* e *pykF* (*KPHS\_42060*), envolvidos na glicólise, reforçando a hipótese de que a bactéria ajusta seu metabolismo central para maximizar a eficiência energética diante da exposição ao meropenem. Esse comportamento foi semelhante ao descrito por Wyres et al. (2019), que relataram que *K. pneumoniae* pode reprogramar seu metabolismo para garantir energia suficiente para processos de resistência e sobrevivência.

Em relação às adaptações estruturais, os resultados deste estudo mostraram uma redução na expressão das porinas *OmpK35* e *OmpK36*, mecanismo amplamente descrito na literatura como uma das principais estratégias de *K. pneumoniae* para evitar a entrada de carbapenêmicos (Martin e Bachman, 2018; Wright et al., 2014). A redução na expressão dos transcritos associados ao gene *ompK35* (*KPHS\_211107*) corroborou com os relatos de Lee et al. (2019), que demonstraram que a supressão desse gene reduz significativamente a permeabilidade da membrana externa aos antibióticos. Diante desses achados, é possível subsidiar pesquisas alvo para supressão gênica a fim de permitir o retorno da sensibilidade da bactéria aos carbapenêmicos.

Outro achado relevante foi o aumento dos transcritos associados aos genes *acrA* e *tolC*, que codificam componentes da bomba de efluxo *AcrAB-TolC*. No presente estudo, *acrA* (*KPHS\_29820*) e *tolC* (*KPHS\_39650*) apresentaram regulação positiva, o que confirma a ativação desse sistema para expulsão de meropenem. Esse resultado está em concordância com os estudos de Sundaresan et al. (2024) e Wright et al. (2014), que descreveram o papel dessas bombas na eliminação de carbapenêmicos e na adaptação de cepas resistentes.

A análise transcriptômica revelou que a exposição ao meropenem induziu a superexpressão de genes associados ao transporte de nutrientes, especialmente transportadores do tipo ABC envolvidos na captação de compostos como maltose, nitrato e ferro, destacando-se o transcritos associado ao gene de *Refseq Locus Tag* *KPHS\_05330*. Esse achado indica uma reprogramação metabólica voltada à manutenção da viabilidade celular sob estresse, favorecendo a adaptação bacteriana por meio do aumento da aquisição de micronutrientes essenciais (Figura 9). O estudo de Polani et al. (2025) sustenta essa observação ao demonstrar

que a presença do sistema de transporte de citrato férrico codificado por plasmídeo (*fecABCDE*) em *K. pneumoniae* contribui para a maior resistência ao cefiderocol, ao reprimir a expressão de receptores endógenos de sideróforos e promover uma via alternativa de captação de ferro. Esses dados convergem para a compreensão de que a modulação da aquisição de ferro, seja por mecanismos endógenos ou mediados por plasmídeos, é um determinante chave na resposta adaptativa bacteriana. Destaca-se ainda que estratégias terapêuticas que combinam carbapenêmicos com quelantes de ferro vêm sendo exploradas como alternativas contra cepas XDR, com o objetivo de limitar a disponibilidade de ferro e prejudicar o metabolismo bacteriano. No entanto, os dados obtidos neste estudo indicam que *K. pneumoniae* pode ativar vias compensatórias de transporte de ferro sob estresse antimicrobiano, o que pode comprometer a eficácia dessas combinações terapêuticas. Assim, a compreensão detalhada dos mecanismos de captação e regulação de ferro oferece subsídios valiosos para o desenvolvimento de novas abordagens contra isolados multirresistentes.

A análise do transcriptoma de *Klebsiella pneumoniae* resistente ao meropenem revelou um padrão complexo de regulação diferencial dos transcritos, refletindo as estratégias moleculares utilizadas pela bactéria para sobreviver sob pressão antimicrobiana. O gráfico de vulcão (Figura 7) evidenciou transcritos significativamente regulados ( $p < 0,05$ ), agrupados em transcritos superexpressos (*upregulated*) e reprimidos (*downregulated*), indicando alterações metabólicas, estruturais e de mobilidade genética (Zhou et al., 2023).

A regulação positiva de transcritos críticos sugere que a exposição ao meropenem desencadeia uma resposta adaptativa ativa, direcionada principalmente para a modulação da tradução proteica, manutenção da integridade celular e mobilidade genética. A superexpressão do transcrito KPHS\_39890, que codifica a proteína inibidor associado ao ribossomo A (*Ribosome-associated inhibitor A*), sugere uma regulação precisa na tradução (Figura 8), possivelmente reduzindo a síntese proteica para evitar o acúmulo de proteínas mal dobradas, um efeito de ajuste metabólico sob estresse antimicrobiano. Essa estratégia já foi descrita em outras bactérias resistentes, onde a regulação da maquinaria ribossomal permite uma melhor alocação de energia para vias críticas de sobrevivência (Singh et al., 2022).

Outro aspecto relevante foi a regulação positiva do transcrito KPHS\_50590, uma transposase InsK associada ao elemento IS150, um indício de que *K. pneumoniae* pode estar ativando mecanismos de mobilidade genética para reconfigurar seu genoma em resposta ao meropenem (Souza et al., 2024). A capacidade de rearranjar elementos genéticos, incluindo a possível disseminação de genes de resistência em plasmídios conjugativos, é um dos principais fatores responsáveis pela emergência de linhagens altamente resistentes (Wyres et al., 2024).

A superexpressão da transposase InsK, associada à IS150, após exposição ao meropenem, sugere que *Klebsiella pneumoniae* ativa elementos genéticos móveis como estratégia adaptativa. Segundo Razavi et al. (2020), as sequências de inserção (IS), como a IS150, são elementos genéticos móveis capazes de mediar reorganizações genômicas, ativar genes adjacentes e facilitar a aquisição de determinantes de resistência a antimicrobianos. ISs estão frequentemente associadas a genes de resistência e atuam como vetores para mobilização.

Além disso, estudos recentes também demonstram que antibióticos  $\beta$ -lactâmicos em concentrações subinibitórias estimulam a transposição e a transferência plasmidial de resistência, com isso a ativação de ISs sob pressão antimicrobiana favorece tanto a reorganização genômica quanto a ativação de genes adjacentes contribuindo para a plasticidade genômica e evolução de perfis multirresistentes em ambientes clínicos (Chen et al., 2024).

A superexpressão do transcrito KPHS\_00070, codificante da D-ribose piranase, após exposição ao meropenem, indica que *Klebsiella pneumoniae* pode estar ativando rotas metabólicas alternativas para manter sua viabilidade sob estresse antimicrobiano. A D-ribose piranase facilita a interconversão da ribose, favorecendo sua utilização na via da pentose-fosfato, essencial para a geração de NADPH, nucleotídeos e intermediários biossintéticos. Estudos demonstram que o acréscimo de D-ribose exógena aumenta a eficácia de aminoglicosídeos em cepas multirresistentes, por intensificar o metabolismo central e a produção de energia celular (Zhou et al., 2022; Stokes et al., 2019). Além disso, análises metabolômicas revelam que o meropenem altera profundamente o perfil metabólico de *K. pneumoniae*, especialmente na via da pentose-fosfato (Miccoli et al., 2018). Essas alterações refletem a capacidade de reprogramação metabólica dos patógenos, mecanismo descrito como chave na sobrevivência sob pressão antimicrobiana (Acierno et al., 2025). Assim, a superexpressão da D-ribose piranase pode conferir vantagem metabólica para biossíntese, manutenção redox e tolerância frente ao antibiótico.

O aumento do transcrito transglicosilase insensível à penicilina e da transpeptidase PBP-1C (KPHS\_39210) em *K. pneumoniae* é outro achado relevante nesta pesquisa, pois a transglicosilase e a transpeptidase desempenham papel essencial na síntese da parede celular bacteriana, catalisando respectivamente a formação das cadeias de glicano e a reticulação dos peptídeos. A exposição a carbapenêmicos como o meropenem pode resultar em pressão seletiva que favorece a superexpressão de genes codificadores dessas enzimas, como estratégia compensatória para manter a integridade da parede celular frente à inibição da atividade enzimática pelas  $\beta$ -lactamas. Essa modulação da expressão já foi associada à persistência bacteriana e à tolerância ao tratamento antibiótico (Sethuvel et al., 2023; Yao et al., 2022).

A enzima PBP-1C, por exemplo, tem sido identificada como uma das PBPs com mutações ou modificações estruturais que reduzem a afinidade por  $\beta$ -lactâmicos, além de exibir perfis funcionais que favorecem a manutenção do peptidoglicano mesmo sob estresse antibiótico. A *upregulação* dessas PBPs tem sido observada em linhagens resistentes após exposição prolongada a meropenem, sugerindo um mecanismo adaptativo (SETHUVEL et al., 2023), o que favorece a perspectiva de utilizar sistemas de interferência gênica como *CRISPRi* para inibir a expressão de genes envolvidos na resistência, incluindo PBPs, como foi demonstrada experimentalmente por YAO et al. (2022), que conseguiram reduzir drasticamente os níveis de resistência a meropenem em cepas de *K. pneumoniae* ao silenciar genes de resistência plasmidiais. Isso sugere um futuro promissor para abordagens que explorem o bloqueio específico da expressão de PBPs resistentes como uma estratégia terapêutica adjunta.

Além disso, tais achados abrem caminho para estudos precursores voltados ao bloqueio gênico seletivo e à modulação da resposta farmacológica por meio da engenharia da expressão de PBPs, como parte de uma abordagem personalizada no tratamento de infecções por enterobactérias resistentes.

A ativação do transcrito KPHS\_47870, que codifica a proteína Maf formadora de septo (*Septum formation protein Maf*), pode indicar uma adaptação da bactéria para reorganizar seu processo de divisão celular, possivelmente como resposta ao estresse causado pelo antibiótico, um fenômeno descrito em cepas resistentes de *Acinetobacter baumannii* e *Escherichia coli* (Omeersshffudin et al., 2022).

Além disso, a superexpressão da proteína UPF0306 (KPHS\_46990), pertencente a uma família de proteínas conservadas sem função bem definida, reforça a ideia de que *K. pneumoniae* pode empregar mecanismos desconhecidos para se adaptar a ambientes hostis (Souza et al., 2024). Assim como, a presença de aumento de transcritos associados a proteínas hipotéticas reforça a existência de mecanismos ainda desconhecidos de resistência, que podem representar novos alvos farmacológicos (Souza et al., 2024).

Em contrapartida, os transcritos *downregulated* revelaram processos celulares que foram suprimidos, possivelmente como parte de uma estratégia de economia metabólica ou ajuste estrutural da bactéria (Janssen et al., 2024). Um dos achados mais relevantes foi a repressão do transcrito KPHS\_36920, que codifica uma proteína de membrana da família UPF0118. Embora sua função exata não seja completamente elucidada, proteínas dessa família já foram associadas a processos de transporte e homeostase celular em outras bactérias gram-negativas (Diab et al., 2024).

A presença de transcritos associados a múltiplas proteínas hipotéticas diferencialmente expressas reforça a complexidade da resposta bacteriana ao meropenem (Souza et al., 2024). Transcritos como KPHS\_13360, KPHS\_02850 e KPHS\_31530, que codificam proteínas sem função conhecida, foram significativamente reprimidos, enquanto KPHS\_21520 e KPHS\_31170 foram superexpressos. Embora não haja descrições detalhadas sobre essas proteínas, a regulação diferencial indica que elas desempenham papéis fundamentais na adaptação ao antibiótico (Lee et al., 2019; Dumigan et al., 2022). Estudos recentes mostram que muitas proteínas inicialmente classificadas como "hipotéticas" acabam desempenhando funções essenciais na resistência antimicrobiana, seja como modificadores de parede celular, reguladores metabólicos ou ativadores de vias de defesa (Lee et al., 2019; Souza et al., 2024).

No presente estudo, observou-se que *Klebsiella pneumoniae* extensivamente resistente (XDR), sob exposição ao meropenem, apresentou reprogramação transcriptômica ampla, envolvendo vias metabólicas, mecanismos de reparo celular e ativação de genes de resistência. Esses achados estão de acordo com Dai et al. (2025), que demonstraram que cepas co-produtoras de KPC-2 e NDM-5 ativam bombas de efluxo, proteínas de choque térmico e sistemas antioxidantes para enfrentar o estresse por carbapenêmicos. Enquanto Dai et al. (2025), destacam maior modulação de genes relacionados à biossíntese de polissacarídeos capsulares, nossos resultados apontam alterações mais pronunciadas nas vias lipídicas e no consumo energético alternativo, sugerindo estratégias adaptativas distintas entre as cepas. A integração desses dados reforça que a resistência e persistência de *K. pneumoniae* XDR envolvem não apenas genes de resistência clássicos, mas também reorganização metabólica e homeostática, o que amplia os desafios terapêuticos e destaca a importância de estudos transcriptômicos comparativos.

A importância do transcriptoma para a compreensão da resistência ao meropenem fica evidente ao observar que as respostas bacterianas são dinâmicas e envolvem desde ajustes na síntese proteica e remodelação estrutural da membrana até a mobilização de elementos genéticos móveis (Vornhagen et al., 2022; Janssen et al., 2024). Esse conhecimento é essencial para a identificação de novos alvos farmacológicos, uma vez que transcritos até então não relacionados à resistência, como aqueles pertencentes à família UPF, podem desempenhar papéis centrais na sobrevivência da bactéria (Zhou et al., 2023). Além disso, a descoberta de proteínas hipotéticas diferencialmente expressas ressalta a necessidade de investigações mais detalhadas, incluindo abordagens funcionais que possam validar seu envolvimento na resistência antimicrobiana (Dumigan et al., 2022). Dessa forma, a análise da expressão

diferencial de transcritos em *K. pneumoniae* exposta ao meropenem não apenas confirma a presença de mecanismos clássicos de resistência, como bombas de efluxo e modulação da parede celular, mas também sugere a existência de novas estratégias adaptativas, ainda pouco compreendidas.

## 7 CONCLUSÃO GERAL

- A cepa testada foi confirmada como XDR, apresentando CIM de 256 µg/mL para meropenem, 64 µg/mL para ciprofloxacino e 256 µg/mL para gentamicina, segundo disco-difusão, microdiluição em caldo e VITEK®;
- A exposição à CIM de meropenem retardou significativamente a fase log de crescimento, indicando uma adaptação bacteriana que minimiza o efeito bactericida inicial;
- Foram identificados 312 genes diferencialmente expressos após exposição ao meropenem, com oito transcritos superexpressos e quatro subexpressos relacionados a mecanismos de resistência clássicos e novos elementos adaptativos;
- Agrupamentos funcionais destacaram vias de estresse oxidativo, bombas de efluxo, biossíntese lipídica e rotas de degradação de carboidratos, sugerindo uma assinatura molecular da resistência a carbapenêmicos;
- Foi evidenciada modificação metabólica com ativação da via pentose-fosfato, aumento na biossíntese de lipídios/fosfolipídeos e flexibilidade no uso de fontes de carbono, sustentando a integridade celular sob estresse antimicrobiano;
- Foram observadas alterações na expressão de genes de defesa, fatores de virulência e remodelação da parede celular e membrana plasmática, reforçando a plasticidade adaptativa de *K. pneumoniae*.



## REFERÊNCIAS

ADEBAYO, A. S.; JANKIE, S.; JOHNSON, J.; PEREIRA, L. P.; A GBAJE, K.; ADESINA, S. K. Pharmacokinetics of Levofloxacin Entrapped in Non-Ionic Surfactant Vesicles (Niosomes) in Sprague Dawley Rats. **Pharmaceutics**, Basel, v. 17, art. 275, 18 fev. 2025. DOI: 10.3390/pharmaceutics17020275

ADEBAYO, A. S.; JANKIE, S.; JOHNSON, J.; PEREIRA, L. P.; AGBAJE, K.; ADESINA, S. K. Pharmacokinetics of Levofloxacin Entrapped in Non-Ionic Surfactant Vesicles (Niosomes) in Sprague Dawley Rats. **Pharmaceutics**, v. 17, p. 275, 2025.

ALI, S.; KUMAR, S.; SINGH, S.; KUMAR, V. Potential therapeutic targets of *Klebsiella pneumoniae*: a multi-omics review perspective. **Briefings in Functional Genomics**, v. 21, n. 2, p. 63–77, 2022. DOI: 10.1093/bfpg/elab038.

AVCI, F.G. Unraveling bacterial stress responses: implications for nextgeneration antimicrobial solutions. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 2024, 40, 285.

AVCI, Fatma Gizem. Unraveling bacterial stress responses: implications for next-generation antimicrobial solutions. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v. 40, art. 285, 29 jul. 2024. DOI: 10.1007/s11274-024-04090-z

BEIG, M., AGHAMOHAMMAD, S., MAJIDZADEH, N., et al. Antibiotic resistance rates in hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* strains: A systematic review and metaanalysis. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, 2024, 38, 376–388.

BEIG, M.; AGHAMOHAMMAD, S.; MAJIDZADEH, N.; KHAZANI ASFOROOSHANI, M.; REZAIE, N.; ABED, S.; HAJAGHA GHOLIZADEH KHIAMI, E.; SHOLEH, M. Antibiotic resistance rates in hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* strains: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, [S.l.], v. 38, p. 376–388, 2024. DOI: 10.1016/j.jgar.2024.06.018

BRENNANKROHN, T., GROTE, A., RODRIGUEZ, S., et al. Transcriptomics reveals how minocyclinecolistin synergy overcomes antibiotic resistance in multidrugresistant *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 2022, v. 66, p. e0196921.

BRUCHMANN, S., MUTHUKUMARASAMY, U., POHL, S., et al. Deep transcriptome profiling of clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates reveals strain and sequence typespecific adaptation. **Environ. Microbiol.**, 2015, v. 17, p. 4690–4710.

CAIN, A. K. et al. Adaptive responses of *Klebsiella pneumoniae* to antimicrobial stress. **Microbial Genomics**, v. 4, n. 6, p. e000210, 2018. DOI: 10.1099/mgen.0.000210.

CAMPOS, A. C., ALBIERO, J., ECKER, A. B., KURODA, C. M., MEIRELLES, L. E. F., POLATO, A., TOGNIM, M. C. B., WINGETER, M. A., & TEIXEIRA, J. J. V. (2016). Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase–producing *K. pneumoniae*: A systematic review. **American Journal of Infection Control**, 2016, 115.

CAMPOS, Anaelís C. et al. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase–producing *K. pneumoniae*: a systematic review. **American Journal of Infection Control**, [S.l.], v. 44, n. 11, p. 1374–1380, Nov. 2016. DOI: 10.1016/j.ajic.2016.03.022 [pmc.ncbi.nlm.nih.gov](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26811111/)

CHEN, L., MATHEMA, B., CHAVDA, K. D., DELEO, F. R., BONOMO, R. A., & KREISWIRTH, B. N. (2014). Carbapenemaseproducing *Klebsiella pneumoniae*: Molecular and genetic decoding. **Trends in Microbiology**, 22(12), 686–696.

CHOBY, J. E.; HOWARD-ANDERSON, J.; WEISS, D. S. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* – clinical and molecular perspectives. **Journal of Internal Medicine**, v. 287, p. 283-300, 2020.

**CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE – CLSI.** *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 28. ed., suplemento M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018.

COLLINS, J. A.; OVIATT, A. A.; CHAN, P. F.; OSHEROFF, N. Target-mediated fluoroquinolone resistance in *Neisseria gonorrhoeae*: actions of ciprofloxacin against gyrase and topoisomerase IV. **ACS Infectious Diseases**, v. 10, n. 41, 2024. DOI: 10.1021/acsinfecdis.4c00041.

**COMITÊ BRASILEIRO DE TESTES DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS** – BrCAST. Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos de inibição. Versão válida a partir de 20-05-2020. Rio de Janeiro: BrCAST, 2020. Disponível em:

<https://brcast.org.br/wp-content/uploads/2022/07/Tabela-pontos-de-corte-clinicos-BrCAST-2020-V2-20-maio-2020-4.pdf>. Acesso em: 04 maio 2025.

## COMITÊ BRASILEIRO DE TESTES DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

– BrCAST. Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos de inibição. Versão válida a partir de 15-03-2021. Rio de Janeiro: BrCAST, 2021. Disponível em: <https://brcast.org.br/wp-content/uploads/2022/07/Tabela-pontos-de-corte-clinicos-BrCAST-v1-mar-2021.pdf>. Acesso em: 04 maio 2025.

DAI, P.; HU, D. The making of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 36, e24743, 2022.

DAI, C.; WANG, C.; ZHANG, Y.; LI, H.; ZHAO, M.; ZHANG, R.; CHEN, S. Transcriptomic insights into adaptive strategies of *Klebsiella pneumoniae* co-producing KPC-2 and NDM-5 carbapenemases under meropenem stress. **Infection and Drug Resistance**, 2025. v.18, p.3383-3398.

DAS, S.; KALEDHONKAR, S. Physiochemical characterization of a potential *Klebsiella* phage MKP1 and analysis of its application in reducing biofilm formation. **Front. Microbiol.**, 2024, v. 15, p. 1397447.

DAWSON, C. J.; BARTCZAK, A.; HASSAN, K. A. Mutations in the efflux regulator gene *oqxR* provide a simple genetic switch for antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*. **Microbiology**, 2024, v. 170, p. 001499.

DAWSON, C. J.; BARTCZAK, A.; HASSAN, K. A. Mutations in the efflux regulator gene *oqxR* provide a simple genetic switch for antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*. **Microbiology**, [S.l.], v. 170, art. 001499, 04 set. 2024. DOI: 10.1099/mic.0.001499

DIAB, H.; RAHY, K.; JISR, T.; EL CHAAR, M.; ABBOUD, E.; TOKAJIAN, S. Phenotypic and molecular characterization of multi-drug resistant *Klebsiella* spp. isolates recovered from clinical settings. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 119, p. 105583, 2024.

DIAB, H.; RAHY, K.; JISR, T.; EL CHAAR, M.; ABBOUD, E.; TOKAJIAN, S. Phenotypic and molecular characterization of multi-drug resistant *Klebsiella* spp. isolates recovered from clinical

settings. **Infection, Genetics and Evolution**, [S.l.], v. 119, p. 105583, 2024. DOI: 10.1016/j.meegid.2024.105583

DONG, N.; YANG, X.; CHAN, E. W.-C.; ZHANG, R.; CHEN, S. *Klebsiella* species: Taxonomy, hypervirulence and multidrug resistance. **eBioMedicine**, [S.l.], v. 79, art. 103998, 8 abr. 2022. DOI: 10.1016/j.ebiom.2022.103998

DONG, Ning; YANG, Xuemei; CHAN, Edward Wai-Chi; ZHANG, Rong; CHEN, Sheng. *Klebsiella* species: Taxonomy, hypervirulence and multidrug resistance. **BioMedicine**, v.79, p.103998, 2022.

DUMIGAN, A.; CAPPAS, O.; MORRIS, B.; PESSOA, J. S.; CALDERON-GONZALEZ, R.; MILLS, G.; LANCASTER, R.; SIMPSON, D.; KISSENPFENNIG, A.; BENGOCHEA, J. A. In vivo single-cell transcriptomics reveal *Klebsiella pneumoniae* skews lung macrophages to promote infection. **EMBO Molecular Medicine**, v. 14, e16888, 2022.

EL ZOWALATY, M. E.; AL THANI, A. A.; WEBSTER, T. J.; EL ZOWALATY, A. E. Current trends and future perspectives on fluoroquinolone resistance: A critical review. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 271, 2025.

EL ZOWALATY, M. E.; AL THANI, A. A.; WEBSTER, T. J.; EL ZOWALATY, A. E. Current trends and future perspectives on fluoroquinolone resistance: A critical review. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 271, 2025.

ELKADY, F. M.; BADR, B. M.; ALFEKY, A.-A. E.; ABDULRAHMAN, M. S.; HASHEM, A. H.; AL-ASKAR, A. A.; ABDELGAYED, G.; HASHEM, H. R. Genetic Insights on Meropenem Resistance Concerning *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates. **Life**, v. 14, p. 1408, 2024.

ELKEN, E. M., TAN, Z., WANG, Q., et al. Impact of Sub-MIC Eugenol on *Klebsiella pneumoniae* Biofilm Formation via Upregulation of rcsB. **Frontiers in Veterinary Science**, 2022, 9:945491.

ELMANZI, M. Control of central metabolism's architecture in *Escherichia coli*: An overview. **Microbiological Research**, 2023, 266, 127224.

FAN, Fangfang; CHEN, Guangzhang; DENG, Siqian; WEI, Li. Proteomic analysis of meropenem-induced outer membrane vesicles released by carbapenem-resistant *Klebsiella*

pneumoniae. **Clinical Microbiology Spectrum**, [S.l.], v. 12, n. 2, art. e02917-23, 18 jan. 2024. DOI: 10.1128/spectrum.02917-23

FINDLAY, J., HAMOUDA, A., DANCER, S. J., et al. Rapid acquisition of decreased carbapenem susceptibility in a strain of *Klebsiella pneumoniae* arising during meropenem therapy. **Clinical Microbiology and Infection**, 2012, 18:140–146.

FUZI, M.; RODRIGUEZ BAÑO, J.; TOTH, A. Global Evolution of Pathogenic Bacteria With Extensive Use of Fluoroquinolone Agents. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 271, 2020.

GELETA, D. et al. Molecular and clinical insights into extended-spectrum  $\beta$ -lactamase genes of *Klebsiella pneumoniae* isolated from neonatal sepsis in Ethiopia. **BMC Infectious Diseases**, v. 24, p. 1442, 2024.

GUO, H. et al. Global genomic epidemiology and transmission dynamics of plasmidborne *tmexCDtoprJ* carrying *Klebsiella pneumoniae* in a one health context. **Science of the Total Environment**, 2024, v. 953, p. 176065.

HALFMANN, A., HEINZEL, E., KAASE, M., PETIT, C., GÄRTNER, B., MEISER, A., HERRMANN, M., & VON MÜLLER, L. Outbreak of Carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* in a University Hospital. 2012.

HAN, Y. et al. Small RNA regulated expression of efflux pump affects tigecycline resistance and heteroresistance in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. **Microbiological Research**, 2024, v. 287, p. 127825.

HAWKEY, J.; COTTINGHAM, H.; TOKOLYI, A.; et al. Linear plasmids in *Klebsiella* and other Enterobacteriaceae. **Microbial Genomics**, v. 8, 000807, 2022.

HAY, A.; LAPOINTE, J.M.; LEWIS, A.; MORENO-QUINN, C.; MIRANDA, E. Optimization of RNA extraction from laser captured microdissected glomeruli from formalin-fixed paraffin-embedded mouse kidney samples for Nanostring analysis. **Histology and Histopathology**, v. 35, n. 1, p. 57–68, 2020.

HE, W. et al. Identification of the Major Facilitator Superfamily Efflux Pump KpsrMFS in *Klebsiella pneumoniae*. **International Journal of Molecular Sciences**, 2024, v. 25, p. 1466.

HERRIDGE, W. P., SHIBU, P., O'SHEA, J., et al. Bacteriophages of *Klebsiella* spp., their diversity and potential therapeutic uses. **Journal of Medical Microbiology**, 2020, 69:176–194.

HIRABAYASHI, A. et al. Emergence of the mobile RNDtype efflux pump gene cluster *tmexCD1toprJ1* in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in Japan. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2024, DOI: 10.1093/jac/dkae395.

HUSSEIN, R. A. et al. The influence of efflux pump, outer membrane permeability and  $\beta$ lactamase production on the resistance profile of *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Infection and Public Health**, 2024, v. 17, p. 102544.

JANSSEN, A. B.; DE BAKKER, V.; APRIANTO, R.; TREBOSC, V.; KEMMER, C.; PIEREN, M.; VEENING, J. W. *Klebsiella pneumoniae* OmpR facilitates lung infection through transcriptional regulation of key virulence factors. **Microbiology Spectrum**, v. 12, n. 1, e03966-23, 2024.

JIN, X., et al. (2021). Resistance evolution of hypervirulent carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* ST11 during treatment. **Therapeutic Advances in Infectious Disease**, 10, 1129–1136.

KATSAROU, A.; STATHOPOULOS, P.; TZVETANOVA, I. D.; ASIMOTOU, C.-M.; FALAGAS, M. E.  $\beta$ -Lactam/ $\beta$ -Lactamase Inhibitor Combination Antibiotics Under Development. **Pathogens**, v. 14, p. 168, 2025.

KAUR, J. N., SINGH, N., SMITH, N. M., et al. Next generation antibiotic combinations to combat pan-drug resistant *Klebsiella pneumoniae*. **Scientific Reports**, 2024, 14:3148.

KERNEIS, S., LUCET, J.C., SANTORO, A., & MESCHIARI, M. Individual and collective impact of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)producing *K. pneumoniae* in patients admitted to the ICU. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2021, 76(Suppl 1), i19–i26.

KHADKA, S.; RING, B. E.; PARISEAU, D. A.; MIKE, L. A. Characterization of *Klebsiella pneumoniae* extracellular polysaccharides. **Current Protocols** , v. 3, e937, 2023.

KONDRATIEVA, D. A.; SAVELIEVA, J. R.; GOLIKOVA, M. V. Effect of Meropenem on Conjugative Plasmid Transfer in *Klebsiella pneumoniae*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, p. 13193, 2024.

KUBOTA, H., SUZUKI, Y., OKUNO, R., et al. IMP-68, a novel IMP-type metallo- $\beta$ -lactamase in imipenem-susceptible *Klebsiella pneumoniae*. **mSphere**, 2019, 4.

KUMAR, V., & PARK, S. Potential and limitations of *Klebsiella pneumoniae* as a microbial cell factory utilizing glycerol as the carbon source. **Biotechnology Advances**, 2018, 36, 150–167.

LEE, M. et al. Network integrative genomic and transcriptomic analysis of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains identifies genes for antibiotic resistance and virulence. **mSystems**, v. 4, n. 4, p. e00202-19, 2019. DOI: 10.1128/mSystems.00202-19.

LEE, Y. L. et al. Antimicrobial resistance among imipenem-non-susceptible *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, 2025.

LEE, Y. Q. et al. Investigation on the mechanisms of carbapenem resistance among the noncarbapenemase-producing carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 2024, v. 14, DOI: 10.3389/fcimb.2024.1464816.

LEE, Y.-L.; LIU, C.-E.; WANG, W.-Y.; TAN, M.-C.; CHEN, P.-J.; SHIAU, Y.-R.; WANG, H.-Y.; LAI, J.-F.; HUANG, I.-W.; YANG, Y.-S.; KUO, S.-C. Antimicrobial resistance among imipenem-non-susceptible *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates, with an emphasis on novel  $\beta$ -lactam/ $\beta$ -lactamase inhibitor combinations and tetracycline derivatives: The Taiwan surveillance of antimicrobial resistance program, 2020–2022. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, [S.l.], ahead of print, 6 fev. 2025. DOI: 10.1016/j.jmii.2025.01.006

LEI, T.Y.; LIAO, B.-B.; YANG, L.-R.; WANG, Y.; CHEN, X.-B. Hypervirulent and carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: a global public health threat. **Microbiological Research**, v. 288, art. 127839, 2024. doi:10.1016/j.micres.2024.127839&#x20;

LI, D., RAO, H., XU, Y., et al. Monotherapy vs combination therapy in patients with *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Infection and Chemotherapy**, 2024, 30:372–378.

LI, Y. et al. Changes of PK/PD of meropenem in patients with abdominal septic shock and exploration of clinical rational administration plan: a prospective exploratory study. **Scientific Reports**, v. 14, p. 10173, 2024. DOI: 10.1038/s41598-024-60909-7.

LIU, C. et al. Effectiveness of antimicrobial agent combinations against carbapenem-producing *Klebsiella pneumoniae* with KPC variants in China. **Frontiers in Microbiology**, 2025.

LIU, M., WU, J., ZHAO, J., et al. Global epidemiology and genetic diversity of mcr-positive *Klebsiella pneumoniae*: A systematic review and genomic analysis. **Environ. Res.**, 2024, v. 259, p. 119516.

LIU, Y. et al. Mechanisms of resistance and metabolic adaptations in *Klebsiella pneumoniae* under carbapenem stress conditions. **Frontiers in Microbiology**, v. 15, p. 10762, 2024. DOI: 10.3389/fmicb.2024.10762.

LIU, Y., ZHU, S., WEI, L., FENG, Y., CAI, L., DUNN, S., MCNALLY, A., & ZONG, Z. (2022). Arm race among closely related carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* clones. **ISME Communications**, 2, 110.

LONG, D., ZHU, L., DU, F., et al. Phenotypical profile and global transcriptomic profile of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* due to carbapenemase-encoding plasmid acquisition. **BMC Genomics**, 2019, v. 20, p. 480.

MAGIORAKOS, A. P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R. B.; CARMELI, Y.; FALAGAS, M. E.; GISKE, C. G.; HARBARTH, S.; HINDLER, J. F.; KAHLMEIER, G.; OLSSON-LILJEQUIST, B.; PATTERSON, D. L.; RICE, L. B.; STELLING, J.; STRUELENS, M. J.; VATOPOULOS, A.; WEBER, J. T.; MONNET, D. L. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, Oxford, v. 18, n. 3, p. 268–281, Mar. 2012. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x

MARTIN, R. M.; BACHMAN, M. A. Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, p. 4, 2018. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00004.



MÜDERRIS, T., MANYASLI, G. D., KAYA, S., et al. In vitro interactions of combinations of colistin with meropenem, rifampicin and tigecycline in colistin-resistant, biofilm-forming *Klebsiella pneumoniae*. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, 2024, v. 110, p. 116408.

MUZAKI, M. Z. B. M., SUBRAMONI, S., SUMMERS, S., et al. *Klebsiella pneumoniae* AI2 transporters mediate interspecies interactions and composition in a three-species biofilm community. **npj Biofilms Microbiomes**, 2024, v. 10, p. 91.

NAVON-VENEZIA, Shiri; KONDRATYEVA, Kira; CARATTOLI, A. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v.41, p.252-275, 2017.

OLSON, R. D. et al. Introducing the Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center (BV-BRC): a resource combining PATRIC, IRD and ViPR. **Nucleic Acids Research**, [S.l.], v. 51, n. D1, p. D678–D689, 6 jan. 2023. DOI: 10.1093/nar/gkac1003.

OMEERSHFFUDIN, U. N. M.; KUMAR, S. Antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*: identification of bacterial DNA adenine methyltransferase as a novel drug target from hypothetical proteins using subtractive genomics. **Genomics & Informatics**, v. 20, n. 4, e47, 2022.

PACZOSA, MK.; MECSAS, J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.80, n.3, p.629-661, 2016.

PATRO, L. P. P., & RATHINAVELAN, T. Targeting the Sugary Armor of *Klebsiella* Species. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 2019, 9:367.

PISANI, S. et al. Antibiotic-loaded nano-sized delivery systems: An insight into gentamicin and vancomycin. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 15, p. 194, 2024.

PISANI, S.; TUFAIL, S.; ROSALIA, M.; DORATI, R.; GENTA, I.; CHIESA, E.; CONTI, B. Antibiotic-Loaded Nano-Sized Delivery Systems: An Insight into Gentamicin and Vancomycin. **Journal of Functional Biomaterials**, Basel, v. 15, art. 194, 15 jul. 2024. DOI: 10.3390/jfb15070194

PRANAVATHIYANI, G. et al. Novel target exploration from hypothetical proteins of *Klebsiella pneumoniae* MGH 78578 reveals a protein involved in host-pathogen interaction. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 109, 2020.

PRASAD, M.; SHETTY, S. K.; NAIR, B.G.; PAL, S.; MADHAVAN, A.. A novel and improved selective media for the isolation and enumeration of *Klebsiella* species. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.106, p.8273-8284, 2022.

PRESTINACI, F.; PEZZOTTI, P.; PANTOSTI, A. Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. **Pathogens and Global Health**, v. 109, p. 309, 2015.

QALA NOU, M. S. et al. Systematic review and meta-analysis on the carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* isolates. **BMC Pharmacology and Toxicology**, v. 26, p. 25, 2025.

RAMOS, P. I. P. et al. An integrative, multi-omics approach towards the prioritization of *Klebsiella pneumoniae* drug targets. **Scientific Reports**, v. 8, p. 10755, 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-28916-7.

RODRIGUEZ-MEDINA, N.; RODRIGUEZ-SANTIAGO, J.; ALVARADO-DELGADO, A.; SAGAL-PRADO, A.; SILVA-SÁNCHEZ, J. et al. Comprehensive study reveals phenotypic heterogeneity in *Klebsiella pneumoniae* species complex isolates. **Scientific Reports**, v.14, p.5876, 2024.

ROSAS, N.C., WILKSCH, J., BARBER, J., et al. The evolutionary mechanism of noncarbapenemase carbapenem-resistant phenotypes in *Klebsiella* spp. **eLife**, 2023, 12, e83107.

RUSSO, T. A.; MARR, C. M. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 32, e00001-19, 2019.

SALAMA, G. G. et al. Downregulation of *Klebsiella pneumoniae* RND efflux pump genes following indole signal produced by *Escherichia coli*. **BMC Microbiology**, 2024, v. 24, p. 312.

SERIO, A. W. et al. Aminoglycoside revival: review of a historically important class of antimicrobials undergoing rejuvenation. **EcoSal Plus**, ESP-0002-2018, 2018.

SHETTAR, S. R. et al. Management of a case of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection in a second-kidney transplant patient. **Frontiers in Transplantation**, v. 3, p. 1494016, 2025.

SINGH, V.; DHANKHAR, P.; DALAL, V.; TOMAR, S.; KUMAR, P. In-silico functional and structural annotation of hypothetical protein from *Klebsiella pneumoniae*: A potential drug target. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 116, p. 108262, 2022.

SOUZA, J. et al. Potential involvement of beta-lactamase homologous proteins in resistance to beta-lactam antibiotics in gram-negative bacteria. **BMC Genomics**, v. 25, p. 508, 2024.

SPARBIER, K., WELLER, U., SCHUBERT, S., BOOGEN, C., & KOSTRZEWA, M. MALDITOF MS for functional detection of  $\beta$ lactam resistance of positive blood cultures.

STANTON, Thomas D.; WYRES, Kelly L. What defines hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*? **eBioMedicine** , v.108, p.105331, 2024.

STOJOWSKASWEDRZYNSKA, K., ŁUPKOWSKA, A., KUCZYNSKAWISNIK, D., & LASKOWSKA, E. Antibiotic Heteroresistance in *Klebsiella pneumoniae*. **International Journal of Molecular Sciences**, 2022, 23, 449.

STRUKOVA, E. N.; PORTNOY, Y. A.; GOLIKOVA, M. V.; ZINNER, S. H. In vitro dynamic model evaluation of meropenem alone and in combination with avibactam against carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Pharmaceuticals**, Basel, v. 17, n. 12, art. 1683, 2024. DOI: 10.3390/ph17121683

SUNDARESAN, A., GANGWAR, J., MALLI MOHAN, G. B., et al. Complete genome sequence, phenotypic correlation and pangenome analysis of uropathogenic *Klebsiella* spp.. **AMB Express**, 2024, v. 14, p. 78.

SWEDAN, S. F.; ALDAKHILY, D. B. Antimicrobial resistance, biofilm formation, and molecular detection of efflux pump and biofilm genes among *Klebsiella pneumoniae*. *Heliyon*, 2024, v. 10, p. e34370.

TAVARES, L. S., SILVA, C. S. F., SOUZA, V. C., et al. Strategies and molecular tools to fight antimicrobial resistance: resistome, transcriptome, and antimicrobial peptides. **Front. Microbiol.**, 2013, v. 4, p. 412.

THY, M.; TIMSIT, J. F.; DE MONTMOLLIN, E. Aminoglycosides for the treatment of severe infection due to resistant Gram-negative pathogens. **Antibiotics**, v. 12, n. 5, p. 860, 2023. DOI: 10.3390/antibiotics12050860.

THY, M.; TIMSIT, J.-F.; MONTMOLLIN, E. Aminoglycosides for the Treatment of Severe Infection Due to Resistant Gram-Negative Pathogens. **Antibiotics**, v. 12, p. 860, 2023.

TIAN, P. et al. Discovery of clinical isolation of drugresistant *Klebsiella pneumoniae* with overexpression of OqxB efflux pump as the decisive drug resistance factor. **Microbial Pathogenesis**, 2024, DOI: 10.1128/spectrum.0012224.

TIAN, Ping; GUO, Ming-Juan; LI, Qing-Qing; LI, Xu-Feng; LIU, Xiao-Qiang; KONG, Qin-Xiang; ZHANG, Hui; YANG, Yan-Yan; LIU, Yan-Yan; YU, Liang; LI, Jia-Bin; LI, Ya-Sheng. Discovery of clinical isolation of drug-resistant *Klebsiella pneumoniae* with overexpression of OqxB efflux pump as the decisive drug resistance factor. **Microbiology Spectrum**, [S.l.], v. 12, n. 10, art. e00122-24, 16 ago. 2024. DOI: 10.1128/spectrum.00122-24

TIAN, Y., ZHANG, Q., WEN, L., et al. Combined effect of Polymyxin B and Tigecycline to overcome Heteroresistance in Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*. **Microbiol Spectrum**, 2021, 9.

VORNHAGEN, J.; ROBERTS, E. K.; UNVERDORBEN, L.; MASON, S.; PATEL, A.; CRAWFORD, R.; HOLMES, C. L.; SUN, Y.; TEODORESCU, A.; SNITKIN, E. S.; ZHAO, L.; SIMNER, P. J.; TAMMA, P. D.; RAO, K.; KAYE, K. S.; BACHMAN, M. A. Combined comparative genomics and clinical modeling reveals plasmid-encoded genes are independently associated with *Klebsiella* infection. **Nature Communications**, v. 13, p. 4459, 2022.

WANG, G., ZHAO, G., CHAO, X., et al. The Characteristic of Virulence, Biofilm and Antibiotic Resistance of *Klebsiella pneumoniae*. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, 2020, v. 17, p. 6278.

WONG, F. et al. Cytoplasmic condensation induced by membrane damage is associated with antibiotic lethality. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 2321, 2021. DOI: 10.1038/s41467-021-22485-6.

WRIGHT, M. S. et al. Genomic determinants of *Klebsiella pneumoniae* carbapenem resistance and virulence. **mBio**, v. 5, n. 6, p. e01675-14, 2014. DOI: 10.1128/mBio.01675-14.

WYRES, K. L.; LAM, M. M. C.; HOLT, K. E. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, p. 211-225, 2020.

XU, F. et al. Recent advances in the biosynthesis and production optimization of gentamicin: a critical review. **Synthetic and Systems Biotechnology**, v. 10, p. 247-261, 2025.

XU, F.; HU, K.; MOHSIN, A.; WU, J.; SU, L.; WANG, Y.; BEN, R.; GAO, H.; TIAN, X.; CHU, J. Recent advances in the biosynthesis and production optimization of gentamicin: a critical review. **Synthetic and Systems Biotechnology**, [s.l.], v. 10, p. 247–261, 2025. DOI: 10.1016/j.synbio.2024.11.003

YANG, X., DONG, N., CHAN, E. W., ZHANG, R., & CHEN, S. (2020). Carbapenem ResistanceEncoding and VirulenceEncoding Conjugative Plasmids in *Klebsiella pneumoniae*. **Trends in Microbiology**, 28(1), 1928.

ZHANG, H. et al. Meropenem primarily inhibited conjugation among *Klebsiella pneumoniae* strains: implications for resistance spread. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 23, p. 13193, 2024. DOI: 10.3390/ijms2523313193.

ZHANG, Y.; ZHANG, Y.; YU, X.; WANG, J.; SUN, Y.; ZHANG, L. Ciprofloxacin resistance mechanisms and novel therapeutic strategies. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 31, p. 35852, 2024.

ZHOU, Y.; CHENG, Y.; MA, T.; WANG, J.; LI, S.; WANG, J.; HAN, L.; HOU, X.; MA, X.; JIANG, S.; LI, P.; LV, J.; HAN, B.; DA, R. Transcriptomic and phenotype analysis revealed the role of rpoS in stress resistance and virulence of a novel ST3355 ESBL-producing hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* isolate. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 13, p. 1259472, 2023.

ZHU, L., LIANG, L., HUI, J., et al. Relationship between antibiotic exposure and carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection within four types of control patients: A systematic review and metaanalysis. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, 2023, 33, 137–151.

## ANEXO A – Tabelas de detalhamento do transcritos de genes expressos 2x

Tabela 3 – Transcritos de genes expressos 2x mais em *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase exposta a CIM de meropenem

Refseq Locus Tag	Alt Locus Tag	Produto
KPHS_16550	VBIKlePne218548_1612	Permease de açúcar e ácido
KPHS_42060	VBIKlePne218548_4106	Glicerato quinase (EC 2.7.1.31)
KPHS_09820	VBIKlePne218548_0954	Succinato-semialdeído desidrogenase [NAD(P)+] (EC 1.2.1.16)
KPHS_10940	VBIKlePne218548_1062	Proteína transportadora de acila fosfodiesterase (EC 3.1.4.14)
KPHS_17670	VBIKlePne218548_1719	23S rrna (uracil(747)-C(5))-metiltransferase (EC 2.1.1.189)
KPHS_21110	VBIKlePne218548_2057	Transportador ABC, proteína permease ynjc
KPHS_29820	VBIKlePne218548_2904	Transportador de efluxo de múltiplos fármacos mdtk/norm (família MATE)
KPHS_23580	VBIKlePne218548_2291	Proteína ydbh sMaisostamente não caracterizada
KPHS_39650	VBIKlePne218548_3870	Peptidase I de sinal (EC 3.4.21.89)
KPHS_03150	VBIKlePne218548_0310	Subunidade fimbrial principal sMaisostamente importante
KPHS_50420	VBIKlePne218548_4926	Proteína citoplasmática sMaisostamente yhjr
KPHS_25600	VBIKlePne218548_2487	D-treonato 4-fosfato desidrogenase [descarboxilante]
KPHS_42540	VBIKlePne218548_4154	Siroclorina cobaltoquelatase cbik (EC 4.99.1.3) @ Atividade de siroclorina ferroquelatase de cbik (EC 4.99.1.4)
KPHS_14160	VBIKlePne218548_1376	Betaína aldeído desidrogenase (EC 1.2.1.8)
KPHS_02300	VBIKlePne218548_0227	Isocitrato liase (EC 4.1.3.1)
KPHS_00530	VBIKlePne218548_0053	Regulador transcricional
KPHS_29710	VBIKlePne218548_2893	Lactoilglutaciona liase (EC 4.4.1.5)
KPHS_22060	VBIKlePne218548_2149	Proteína da família das amido-hidrolases

KPHS_30110	VBIKlePne218548_2933	NADPH:quinona redutase e oxidorreduases dependentes de Zn relacionadas
KPHS_14140	VBIKlePne218548_1374	Acetiltransferase, família GNAT
KPHS_07990	VBIKlePne218548_0775	Subunidade pequena da acetolactato sintase (EC 2.2.1.6)
KPHS_52360	VBIKlePne218548_5119	Bomba de efluxo de ribonucleosídeos de purina nepi
KPHS_03020	VBIKlePne218548_0298	Regulador dMaislo transcricional de ligação a DNA soxs
KPHS_28340	VBIKlePne218548_2754	Subunidade N gama da formato desidrogenase (EC 1.2.1.2)
KPHS_50270	VBIKlePne218548_4912	Regulador transcricional yhjc, família lysr
KPHS_00300	VBIKlePne218548_0029	Alfa-D-glicose 1-fosfato fosfatase yihx (EC 3.1.3.10)
KPHS_23840	VBIKlePne218548_2317	Helicase dependente de ATP hrpa
KPHS_48280	VBIKlePne218548_4716	Proteína de membrana não caracterizada yhdv
KPHS_19250	VBIKlePne218548_1875	Peroxidase de transporte de ferro ferroso efeb
KPHS_01470	VBIKlePne218548_0146	Uroporfirinogênio-III sintase (EC 4.2.1.75)
KPHS_32170	VBIKlePne218548_3135	Nitrito redutase Subunidade grande de [NAD(P)H] (EC 1.7.1.4)
KPHS_13190	VBIKlePne218548_1281	Sistema de transporte de inositol Proteína de ligação a ATP
KPHS_30010	VBIKlePne218548_2923	Transportador de oligopeptídeo ABC, proteína permease oppb (TC 3.A.1.5.1)
KPHS_37640	VBIKlePne218548_3668	Transportador de histidina ABC, proteína de ligação a ATP hisp (TC 3.A.1.3.1)
KPHS_42360	VBIKlePne218548_4136	L-fucose mutarotase (EC 5.1.3.29)
KPHS_25080	VBIKlePne218548_2438	Proteína hipotética
KPHS_39620	VBIKlePne218548_3867	Proteína de ligação a GTP Era
KPHS_49120	VBIKlePne218548_4798	3-desidroquinato sintase (EC 4.2.3.4)
KPHS_30720	VBIKlePne218548_2993	Proteína da família das amido-hidrolases
KPHS_41850	VBIKlePne218548_4086	Proteína de divisão celular divic (ftsB), estabiliza a ftsL contra a clivagem da raspa



KPHS_48610	VBIKlePne218548_4749	Proteína ribossômica LSU L16p (l10e)
KPHS_41900	VBIKlePne218548_4091	Pecorrina-2 oxidase (EC 1.3.1.76) @ Atividade da siroclorina ferroquelatase da cysg (EC 4.99.1.4) / Metiltransferase da uroporfirinogênio-III (EC 2.1.1.107)
KPHS_52340	VBIKlePne218548_5117	2-aminoetilfosfonato:piruvato aminotransferase (EC 2.6.1.37)
KPHS_25900	VBIKlePne218548_2517	Manose-6-fosfato isomerase
KPHS_05990	VBIKlePne218548_0581	Transportador ABC, proteína permease (cluster 2, ribose/xilose/arabinose/galactose)
KPHS_15230	VBIKlePne218548_1483	Proteína de efluxo de magnésio e cobalto corc
KPHS_39530	VBIKlePne218548_3858	Fosforibosilformilglicinamidina sintase, subunidade sintetase (EC 6.3.5.3) / Fosforibosilformilglicinamidina sintase, subunidade glutamina amidotransferase (EC 6.3.5.3)
KPHS_30920	VBIKlePne218548_3012	Acil-coa desidrogenase
KPHS_38880	VBIKlePne218548_3791	Proteína hipotética
KPHS_28430	VBIKlePne218548_2764	Catecol 1,2-dioxigenase (EC 1.13.11.1)
KPHS_08280	VBIKlePne218548_0802	Montagem fimbrial tipo IV, atpase pilb
KPHS_35200	VBIKlePne218548_3429	Provável tautomerase yoli/yrdn
KPHS_04110	VBIKlePne218548_0403	Proteína de biossíntese de treonilcarbamoiladenosina Trna tsae
KPHS_51150	VBIKlePne218548_5000	Enxofre transferase relacionada à rodanês yibn
KPHS_45720	VBIKlePne218548_4464	Esterase yqia
KPHS_15090	VBIKlePne218548_1469	Alfa-ribazol-5'-fosfato fosfatase (EC 3.1.3.73)
KPHS_26480	VBIKlePne218548_2575	Proteína hipotética
KPHS_21930	VBIKlePne218548_2136	Proteína hipotética
KPHS_30120	VBIKlePne218548_2935	Proteína hipotética
KPHS_36170	VBIKlePne218548_3524	Regulador transcricional, família lysr
KPHS_41400	VBIKlePne218548_4042	[nife] proteína de montagem do metalocentro da hidrogenase hypd

KPHS_17920	VBIKlePne218548_1745	Proteína adaptadora da protease Clp dependente de ATP clps
KPHS_21950	VBIKlePne218548_2138	Proteína induzida por estresse Ves (hutd)
KPHS_15920	VBIKlePne218548_1551	Aldose 1-epimerase (EC 5.1.3.3)
KPHS_47450	VBIKlePne218548_4634	Proteína da membrana interna yrbg, antiportador cálcio/sódio:próton previsto
KPHS_28380	VBIKlePne218548_2759	Permease da sMaiserfamília dos transportadores de fármacos/metabólitos (DMT)
KPHS_07540	VBIKlePne218548_0733	SMaisosta lipoproteína da membrana externa STM0080
KPHS_30890	VBIKlePne218548_3009	Transportador ABC, proteína permease (cluster 10, nitrato/sulfonato/bicarbonato)
KPHS_51250	VBIKlePne218548_5010	Proteína da biossíntese do núcleo de lipopolissacarídeo rfaz
KPHS_30290	VBIKlePne218548_2951	Proteína hipotética
KPHS_37310	VBIKlePne218548_3636	N-acetiltransferase elaa
KPHS_19240	VBIKlePne218548_1874	Proteína periplásmica de transporte de ferro ferroso efeo, contém domínio peptidase-M75 e (frequentemente) domínio semelhante à cMaisredoxina
KPHS_51130	VBIKlePne218548_4998	Proteína exportadora de proteínas secb (mantém o estado desdobrado pré-exportação)
KPHS_35800	VBIKlePne218548_3487	Proteína chaperona não caracterizada yegd
KPHS_34720	VBIKlePne218548_3383	Proteína hipotética
KPHS_03840	VBIKlePne218548_0376	Sistema de efluxo RND, proteína de fusão de membrana
KPHS_50650	VBIKlePne218548_4950	DNA-3-metiladenina glicosilase (EC 3.2.2.20)
KPHS_38840	VBIKlePne218548_3787	4-hidroxi-tetra-hidrodipicolinato sintase (EC 4.3.3.7)
KPHS_46990	VBIKlePne218548_4590	Proteína MAISF0306 yhbp
KPHS_46220	VBIKlePne218548_4514	Subunidade pequena do fator de reativação da glicerol desidratase
KPHS_22110	VBIKlePne218548_2154	Proteína C de choque fágico
KPHS_13510	VBIKlePne218548_1313	Permease de aminoácidos não caracterizada, família gabp

KPHS_04100	VBIKlePne218548_0402	NAD(P)H-hidrato epimerase (EC 5.1.99.6) / (S)-NAD(P)H-hidrato desidratase dependente de ADP (EC 4.2.1.136)
KPHS_26460	VBIKlePne218548_2573	Repressor transcricional do operon frutose, família deor
KPHS_46560	VBIKlePne218548_4547	Proteína da membrana interna da família Deda yqja
KPHS_52680	VBIKlePne218548_5149	Galactonato desidratase (EC 4.2.1.6)
KPHS_21520	VBIKlePne218548_2097	Proteína hipotética
KPHS_09370	VBIKlePne218548_0909	Proteína Yaeq
KPHS_02750	VBIKlePne218548_0272	Quinona oxidoredutase (EC 1.6.5.5)
KPHS_38630	VBIKlePne218548_3766	ATP:Cob(I)alamina adenosiltransferase (EC 2.5.1.17) @ ATP:Cob(I)alamina adenosiltransferase (EC 2.5.1.17), utilização de etanolamina
KPHS_29900	VBIKlePne218548_2912	Proteína hipotética
KPHS_21560	VBIKlePne218548_2101	Transportador tipo MFS não caracterizado
KPHS_05570	VBIKlePne218548_0542	Potenciais helicases de DNA da sMaiserfamília I
KPHS_13430	VBIKlePne218548_1305	Precursor da proteína Moaf
KPHS_11720	VBIKlePne218548_1137	Transportador ABC de maltodextrina, proteína permease mdxg
KPHS_52440	VBIKlePne218548_5127	Subunidade pequena da acetolactato sintase (EC 2.2.1.6)
KPHS_45480	VBIKlePne218548_4440	Proteína da família da dienelactona hidrolase
KPHS_17640	VBIKlePne218548_1716	Proteína permease do sistema de transporte de putrescina poth (TC 3.A.1.11.2)
KPHS_10530	VBIKlePne218548_1021	Fosfolipídio/glicerol aciltransferase
KPHS_04660	VBIKlePne218548_0456	Proteína hipotética
KPHS_33750	VBIKlePne218548_3286	Proteína de resistência ao cobre copc
KPHS_05370	VBIKlePne218548_0524	Álcool cinâmílico desidrogenase/reductase (EC 1.1.1.195) @ Álcool desidrogenase (EC 1.1.1.1)
KPHS_18420	VBIKlePne218548_1794	Diaminopropionato amônia-liase (EC 4.3.1.15)

KPHS_19820	VBIKlePne218548_1932	Tiamina quinase (EC 2.7.1.89) @ Adenosilcobinamida quinase (EC 2.7.1.156)
KPHS_37760	VBIKlePne218548_3680	Proteína Deda
KPHS_27780	VBIKlePne218548_2699	Proteína associada ao transporte de Mg(2+)-atpase mgtc
KPHS_10430	VBIKlePne218548_1011	Cadeia leve da etanolamina amônia-liase (EC 4.3.1.7)
KPHS_51540	VBIKlePne218548_5040	Proteína hipotética
KPHS_07590	VBIKlePne218548_0738	Proteína Apag
KPHS_51490	VBIKlePne218548_5034	Proteína IS1 insb
KPHS_51350	VBIKlePne218548_5020	Transferase do ácido 3-desoxi-D-mano-octulosônico (EC 2.4.99.12) (EC 2.4.99.13)
KPHS_28180	VBIKlePne218548_2740	Regulador transcricional, família marr / Acetiltransferase (GNAT)
KPHS_30990	VBIKlePne218548_3019	Aldolase de 4-hidroxi-2-oxovalerato (EC 4.1.3.39)
KPHS_01670	VBIKlePne218548_0164	Lisofosfolipase L2 (EC 3.1.1.5)
KPHS_46100	VBIKlePne218548_4502	Regulador transcricional positivo evga
KPHS_50070	VBIKlePne218548_4892	Transportador ABC de níquel, proteína permease nikc (TC 3.A.1.5.3)
KPHS_39130	VBIKlePne218548_3817	Proteína de ligação a GTP enga
KPHS_24970	VBIKlePne218548_2428	Proteína de membrana MAISF0060 ynfa
KPHS_03430	VBIKlePne218548_0338	Regulador transcricional phnf
KPHS_02990	VBIKlePne218548_0295	Transportador ABC, proteína permease 2 (cluster 1, maltose/g3p/poliamina/ferro)
KPHS_27910	VBIKlePne218548_2712	Proteína de resistência a cobalto-zinco-cádmio
KPHS_35810	VBIKlePne218548_3488	Transdução de sinal do sensor periplásmico histidina quinase
KPHS_21840	VBIKlePne218548_2128	Proteína de montagem de lipopolissacarídeo lapb
KPHS_18920	VBIKlePne218548_1843	Gama-glutamyl-aminobutiraldeído desidrogenase (EC 1.2.1.-)
KPHS_47470	VBIKlePne218548_4636	3-desoxi-D-mano-octulosonato 8-fosfato fosfatase (EC 3.1.3.45)

KPHS_46160	VBIKlePne218548_4508	Subunidade grande do fator de reativação da glicerol desidratase
KPHS_37220	VBIKlePne218548_3627	Proteína hipotética
KPHS_35890	VBIKlePne218548_3496	Transportador não caracterizado mtdt da sMaiserfamília dos principais facilitadores (MFS)
KPHS_22880	VBIKlePne218548_2223	Proteína hipotética
KPHS_44320	VBIKlePne218548_4330	Transportador de D-galactonato
KPHS_20880	VBIKlePne218548_2034	Tipo hipotético de zinco Proteína semelhante à álcool desidrogenase ydjj
KPHS_13560	VBIKlePne218548_1318	Receptor de ferro-ferricromo
KPHS_43960	VBIKlePne218548_4295	Proteína de domínio de ligação a RNA
KPHS_06130	VBIKlePne218548_0595	Bomba de efluxo multidrogas mdtm (do tipo MFS)
KPHS_35420	VBIKlePne218548_3451	Subunidade da ciclase da glicerol fosfato sintase de imidazol
KPHS_02930	VBIKlePne218548_0289	Inositol-1-monofosfatase (EC 3.1.3.25)
KPHS_36300	VBIKlePne218548_3537	Proteína permease transportadora ABC osmoprotetora yehy
KPHS_44540	VBIKlePne218548_4351	Proteína de motilidade de contração pilt
KPHS_10620	VBIKlePne218548_1030	Proteína do domínio S1 de ligação ao RNA
KPHS_02400	VBIKlePne218548_0237	Sistema PTS, componente IIA específico da sorbose (EC 2.7.1.206)
KPHS_07760	VBIKlePne218548_0755	Proteína reguladora do operon da arabinose arac
KPHS_18300	VBIKlePne218548_1782	Proteína de partição cromossômica mukf
KPHS_06470	VBIKlePne218548_0627	2-desidro-3-desoxifosfogalactonato aldolase (EC 4.1.2.21)
KPHS_34870	VBIKlePne218548_3398	Proteína Mobb
KPHS_09450	VBIKlePne218548_0917	Proteína permease transportadora ABC de metionina
KPHS_09220	VBIKlePne218548_0894	Fosfatidato citidililtransferase (EC 2.7.7.41)
KPHS_04170	VBIKlePne218548_0409	Proteína de ligação ao GTP associada à LSU do ribossoma hflx

KPHS_34890	VBIKlePne218548_3400	Proteína antirrestrição
KPHS_41330	VBIKlePne218548_4035	Subunidade 3 da hidrogeniase do formato
KPHS_45670	VBIKlePne218548_4459	Regulador de resposta do sistema de dois componentes qseb
KPHS_15170	VBIKlePne218548_1477	Proteína hipotética
KPHS_44560	VBIKlePne218548_4353	Proteína integral da membrana da divisão celular, yggt e parentes de meio comprimento
KPHS_37250	VBIKlePne218548_3630	Ácido O-succinilbenzoico--coa ligase (EC 6.2.1.26)
KPHS_p300670	VBIKlePne218548_5468	Di-hidropteroato sintase tipo 2 (EC 2.5.1.15) @ Proteína de resistência à sulfonamida
KPHS_34330	VBIKlePne218548_3343	Regulador de resposta associado a Bara uvry (= gaca = sira)
KPHS_41320	VBIKlePne218548_4034	Subunidade 4 da hidrogeniase de formato
KPHS_45130	VBIKlePne218548_4408	Proteína de acoplamento vird4, atpase necessária para transferência de T-DNA
KPHS_41910	VBIKlePne218548_4092	Proteína de conversão de isoenzima de fosfatase alcalina
KPHS_45350	VBIKlePne218548_4427	Proteína não caracterizada STM4317
KPHS_21410	VBIKlePne218548_2086	2-desoxiglicose-6-fosfato hidrolase (EC 3.1.3.68) @ Manitol-1-fosfatase (EC 3.1.3.22) @ Sorbitol-6-fosfatase (EC 3.1.3.50)
KPHS_10390	VBIKlePne218548_1007	Transportador ABC, proteína permease 2 (cluster 4, leucina/isoleucina/valina/benzoato)
KPHS_50380	VBIKlePne218548_4922	Beta-1,4-glucanase (celulase) (EC 3.2.1.4)
KPHS_39210	VBIKlePne218548_3826	Transglicosilase insensível à penicilina (EC 2.4.2.-) e transpeptidase PBP-1C
KPHS_06510	VBIKlePne218548_0631	Transportador de L-galactonato
KPHS_00650	VBIKlePne218548_0065	Ramuloquinase (EC 2.7.1.5)
KPHS_23260	VBIKlePne218548_2258	Proteína hipotética
KPHS_24330	VBIKlePne218548_2365	NAD(P) transidrogenase domínio N da subunidade alfa (EC 1.6.1.2) / NAD(P) transidrogenase domínio C da subunidade alfa (EC 1.6.1.2)
KPHS_27160	VBIKlePne218548_2639	Proteína reguladora transcricional putativa da família rpir

KPHS_06240	VBIKlePne218548_0606	Proteína hipotética
KPHS_39070	VBIKlePne218548_3811	GMP sintase [hidrólise de glutamina], subunidade amidotransferase (EC 6.3.5.2) / GMP sintase [hidrólise de glutamina], subunidade ATP pirofosfatase (EC 6.3.5.2)
KPHS_27080	VBIKlePne218548_2631	Regulador transcricional, família lysr
KPHS_30880	VBIKlePne218548_3008	Transportador ABC, proteína de ligação a ATP (cluster 1, maltose/g3p/poliamina/ferro); Transportador ABC, proteína de ligação a ATP (cluster 10, nitrato/sulfonato/bicarbonato)
KPHS_03050	VBIKlePne218548_0301	Guanina/hipoxantina permease ghxp
KPHS_28530	VBIKlePne218548_2774	Cadeia delta da nitrato redutase respiratória (EC 1.7.99.4)
KPHS_06580	VBIKlePne218548_0638	Sistema PTS, componente IIC específico de frutose-1,6-bisfosfato
KPHS_16010	VBIKlePne218548_1559	Transportador ABC de molibdênio, proteína de ligação ao substrato
KPHS_49610	VBIKlePne218548_4847	Proteína não caracterizada yhha
KPHS_02220	VBIKlePne218548_0219	Proteína hipotética
KPHS_30790	VBIKlePne218548_3000	Transportador ABC, proteína permease (cluster 3, aa básico/glutamina/opinas)
KPHS_48340	VBIKlePne218548_4722	Proteína de função desconhecida Smg
KPHS_45300	VBIKlePne218548_4424	Helicase de DNA replicativa (dnab) (EC 3.6.4.12)
KPHS_28270	VBIKlePne218548_2748	Transportador ABC, proteína de ligação ao ATP (cluster 5, níquel/peptídeos/opinas) / Transportador ABC, proteína de ligação ao ATP (cluster 5, níquel/peptídeos/opinas)
KPHS_46190	VBIKlePne218548_4511	Subunidade grande da glicerol desidratase (EC 4.2.1.30)
KPHS_17820	VBIKlePne218548_1734	Proteína de membrana putativa
KPHS_45960	VBIKlePne218548_4488	Subunidade gama da urease (EC 3.5.1.5)
KPHS_03290	VBIKlePne218548_0324	Sistema de transporte ABC, proteína de ligação ao substrato periplásmica Z5689
KPHS_07550	VBIKlePne218548_0734	Proteína auxiliar do sistema de efluxo de potássio regulada por glutatona keff
KPHS_05730	VBIKlePne218548_0555	Metiltransferase dependente de S-adenosil-L-metionina, semelhante à ciclopropano-acil-fosfolipídio sintase

KPHS_35410	VBIKlePne218548_3450	Fosforibosilformimino-5-aminoimidazol carboxamida ribotídeo isomerase (EC 5.3.1.16)
KPHS_20430	VBIKlePne218548_1991	Fosfohidrolase dependente de metal, subdomínio HD
KPHS_15080	VBIKlePne218548_1468	Fator de silenciamento ribossômico rsfa
KPHS_18800	VBIKlePne218548_1831	Transportador ABC, proteína de ligação ao substrato (cluster 5, níquel/peptídeos/opinas)
KPHS_46130	VBIKlePne218548_4505	Proteína hipotética
KPHS_27400	VBIKlePne218548_2662	Proteína hipotética
KPHS_36410	VBIKlePne218548_3548	Sistema PTS, componente IIB específico para beta-glicosídeo / sistema PTS, componente IIC específico para beta-glicosídeo / sistema PTS, componente IIA específico para beta-glicosídeo
KPHS_14630	VBIKlePne218548_1423	5-metiltioribose quinase (EC 2.7.1.100)
KPHS_13130	VBIKlePne218548_1275	Inosose desidratase (EC 4.2.1.44)
KPHS_13960	VBIKlePne218548_1356	Insk de transposase putativa para o elemento de sequência de inserção IS150
KPHS_42250	VBIKlePne218548_4125	Proteína hipotética
KPHS_45010	VBIKlePne218548_4396	Lipoproteína putativa
KPHS_49980	VBIKlePne218548_4883	Undecaprenil fosfato-alfa-4-amino-4-desoxi-L-arabinose arabinosil transferase (EC 2.4.2.43) @ Proteína de resistência à polimixina pmrk
KPHS_39420	VBIKlePne218548_3847	Proteína hipotética
KPHS_12170	VBIKlePne218548_1182	Provável proteína permease de exportação de ferro fetb
KPHS_37950	VBIKlePne218548_3699	Proteína transportadora de ácidos graxos de cadeia longa
KPHS_44620	VBIKlePne218548_4359	Trna (guanina(46)-N(7))-metiltransferase (EC 2.1.1.33)
KPHS_36400	VBIKlePne218548_3547	6-fosfo-beta-glicosidase (EC 3.2.1.86)
KPHS_41740	VBIKlePne218548_4075	Regulador transcricional, família marr
KPHS_43150	VBIKlePne218548_4214	Sistema PTS, componente IIC específico da celobiose
KPHS_33520	VBIKlePne218548_3263	23S rrna (guanina(745)-N(1))-metiltransferase (EC 2.1.1.187)



KPHS_37740	VBIKlePne218548_3678	Diidrofolato sintase (EC 6.3.2.12) @ Folilpoliglutamato sintase (EC 6.3.2.17)
KPHS_17840	VBIKlePne218548_1736	Hidroxilamina redutase (EC 1.7.99.1)
KPHS_16820	VBIKlePne218548_1639	Regulador transcricional, família gntr
KPHS_44000	VBIKlePne218548_4299	Proteína de membrana, sMaisressora da sensibilidade ao cobre (SCSB)
KPHS_31300	VBIKlePne218548_3049	Proteína hipotética
KPHS_32820	VBIKlePne218548_3196	Proteína de choque térmico putativa
KPHS_14570	VBIKlePne218548_1417	Transportador ABC de 5-metiltiorribose, proteína de ligação a ATP
KPHS_43840	VBIKlePne218548_4283	Proteína hipotética
KPHS_24720	VBIKlePne218548_2403	Subunidade alfa da malonato descarboxilase
KPHS_02660	VBIKlePne218548_0263	Repressor de resposta a SOS e protease lexa (EC 3.4.21.88)
KPHS_31120	VBIKlePne218548_3032	Transportador tipo MFS não caracterizado
KPHS_37990	VBIKlePne218548_3703	Proteína de membrana interna yfdc
KPHS_06030	VBIKlePne218548_0585	Proteína de resistência à fosfomicina fosa
KPHS_20550	VBIKlePne218548_2001	Proteína não caracterizada ybbk
KPHS_20080	VBIKlePne218548_1956	Proteína permease do transportador ABC de importação de espermidina/putrescina potb (TC 3.A.1.11.1)
KPHS_37730	VBIKlePne218548_3677	Proteína de divisão celular associada ao septo dedd
KPHS_22780	VBIKlePne218548_2215	Cabeça de fago, proteína portal B
KPHS_05350	VBIKlePne218548_0522	Permease do sistema de transporte de SN-glicerol-3-fosfato putativa
KPHS_32410	VBIKlePne218548_3159	Peptidil-trna hidrolase (EC 3.1.1.29)
KPHS_34800	VBIKlePne218548_3392	Proteína de membrana interna do complexo de secreção de T-DNA tipo IV, virb6
KPHS_19160	VBIKlePne218548_1867	Proteína secretada putativa
KPHS_41810	VBIKlePne218548_4082	5'-nucleotidase sure (EC 3.1.3.5) @ Exopolifosfatase (EC 3.6.1.11)

KPHS_18250	VBIKlePne218548_1777	3-desoxi-mano-octulosonato citidililtransferase (EC 2.7.7.38)
KPHS_16410	VBIKlePne218548_1598	Subunidade catalítica moae da molibdopterina sintase (EC 2.8.1.12)
KPHS_14710	VBIKlePne218548_1431	Proteína da família da permease citosina/purina/uracila/tiamina/alantoína
KPHS_38830	VBIKlePne218548_3786	Proteína de montagem do barril beta da membrana externa bamc
KPHS_22150	VBIKlePne218548_2158	Regulador transcricional, família lysr
KPHS_05330	VBIKlePne218548_0520	Transportador ABC, proteína de ligação ao ATP (cluster 1, maltose/g3p/poliamina/ferro); Transportador ABC, proteína de ligação a ATP (cluster 10, nitrato/sulfonato/bicarbonato)
KPHS_13680	VBIKlePne218548_1329	Subunidade principal fimbrial CFA/I
KPHS_46950	VBIKlePne218548_4586	Proteína não caracterizada yrap
KPHS_00770	VBIKlePne218548_0077	1,4-di-hidroxi-2-naftoato polipreniltransferase (EC 2.5.1.74)
KPHS_35740	VBIKlePne218548_3481	UTP - glicose-1-fosfato uridililtransferase (EC 2.7.7.9)
KPHS_30030	VBIKlePne218548_2925	Transportador ABC, proteína de ligação a ATP (cluster 5, níquel/peptídeos/opinas)
KPHS_31990	VBIKlePne218548_3118	UTP - glicose-1-fosfato uridililtransferase (EC 2.7.7.9)
KPHS_07100	VBIKlePne218548_0690	Metiltransferase trna/rna não caracterizada
KPHS_41170	VBIKlePne218548_4019	Redutase anaeróbica de óxido nítrico flavorubredoxina
KPHS_31170	VBIKlePne218548_3037	Proteína hipotética
KPHS_00900	VBIKlePne218548_0089	4-carboximuconolactona descarboxilase (EC 4.1.1.44)
KPHS_50740	VBIKlePne218548_4959	2-cetogluconato 6-fosfato redutase (EC 1.1.1.43)
KPHS_50590	VBIKlePne218548_4943	Inscrição de transposase putativa para o elemento de sequência de inserção IS150
KPHS_18440	VBIKlePne218548_1796	Família amidase, hidantoinase/carbamoilase (EC:3.5.1.87)
KPHS_19850	VBIKlePne218548_1935	NADH desidrogenase (EC 1.6.99.3)
KPHS_13310	VBIKlePne218548_1293	Componente de fusão de membrana do sistema tripartite de resistência a múltiplos fármacos

KPHS_42210	VBIKlePne218548_4121	Proteína de ligação ao substrato do transportador ABC de metionina
KPHS_39890	VBIKlePne218548_3894	Inibidor A associado ao ribossomo
KPHS_42020	VBIKlePne218548_4102	Nucleosídeo trifosfato pirofosfohidrolase mazg (EC 3.6.1.8)
KPHS_34670	VBIKlePne218548_3378	Enzima de síntese de yersiniabactina de aquisição de ferro (Irp1, poliquetídeo sintetase) @ Módulos de peptídeo sintetase não ribossomal de biossíntese de sideróforos
KPHS_51570	VBIKlePne218548_5042	Provável carboxivinil-carboxifosfonato fosforilmutase (EC 2.7.8.23)
KPHS_27500	VBIKlePne218548_2672	Corresponde a STY3950 do Acesso AL513382: Salmonella typhi CT18
KPHS_05130	VBIKlePne218548_0500	Inibidor de ribonuclease E rrab
KPHS_25170	VBIKlePne218548_2445	2-desidrotetronato isomerase (EC 5.3.1.35)
KPHS_03530	VBIKlePne218548_0348	Insk de transposase putativa para o elemento de sequência de inserção IS150
KPHS_10310	VBIKlePne218548_0999	Chaperona fimbrial CFA/I
KPHS_36820	VBIKlePne218548_3588	SSU rrna pseudouridina(516) sintase (EC 5.4.99.19)
KPHS_11440	VBIKlePne218548_1110	Proteína de ligação ao DNA HU-beta
KPHS_10790	VBIKlePne218548_1047	Proteína sensora de regulon de fosfato phor (sphs) (EC 2.7.13.3)
KPHS_06490	VBIKlePne218548_0629	Histona acetiltransferase HPA2 e acetiltransferases relacionadas
KPHS_45870	VBIKlePne218548_4479	Trifosfatase inorgânica (EC 3.6.1.25)
KPHS_19340	VBIKlePne218548_1884	Chaperona da redutase respiratória anaeróbica
KPHS_19330	VBIKlePne218548_1883	SMaisosta hidrolase ycdx (EC 3.1.-.-)
KPHS_21420	VBIKlePne218548_2087	SMaisosta proteína de membrana
KPHS_35100	VBIKlePne218548_3420	Proteína hipotética
KPHS_52150	VBIKlePne218548_5098	HAD fosfatase yigl
KPHS_00070	VBIKlePne218548_0007	D-ribose piranase (EC 5.4.99.62)

KPHS_06260	VBIKlePne218548_0608	4-hidroxifenilacetato 3-monooxygenase (EC 1.14.14.9)
KPHS_46880	VBIKlePne218548_4579	Galactitol-1-fosfato 5-desidrogenase (EC 1.1.1.251)
KPHS_05390	VBIKlePne218548_0526	Anidrase carbônica, classe beta (EC 4.2.1.1)
KPHS_11190	VBIKlePne218548_1086	Proteína MAISF0234 Yitk
KPHS_07170	VBIKlePne218548_0697	Proteína de transporte de alanina/glicina putativa
KPHS_46940	VBIKlePne218548_4585	Proteína diaa de associação ao iniciador de DNA
KPHS_23210	VBIKlePne218548_2253	Proteína hipotética
KPHS_46860	VBIKlePne218548_4577	Sistema PTS, componente IIB específico de galactitol (EC 2.7.1.200)
KPHS_32040	VBIKlePne218548_3123	Regulador transcricional, família asnc
KPHS_26030	VBIKlePne218548_2530	Glicosídeo hidrolase previsto por COG1649
KPHS_13600	VBIKlePne218548_1322	Oxidorrredutase
KPHS_18240	VBIKlePne218548_1776	FIG002473: Proteína ycar no cluster de biossíntese de KDO2-Lipídio A
KPHS_47870	VBIKlePne218548_4675	Proteína de formação de septo Maf
KPHS_49410	VBIKlePne218548_4827	Repressor do regulador de glicerol-3-fosfato glpr
KPHS_42820	VBIKlePne218548_4182	Proteína do corpo poliédrico de utilização de propanodiol pdut
KPHS_23040	VBIKlePne218548_2236	Proteína Vgrg
KPHS_01150	VBIKlePne218548_0114	Subunidade pequena da acetolactato sintase (EC 2.2.1.6)
KPHS_41350	VBIKlePne218548_4037	Proteína reguladora da hidrogeniase de formato hyca
KPHS_46520	VBIKlePne218548_4543	Altronato desidratase (EC 4.2.1.7)
KPHS_40760	VBIKlePne218548_3979	Proteína do domínio central da família ahpd do domínio da 4-carboximuconolactona descarboxilase/alquil-hidroperoxidase
KPHS_23870	VBIKlePne218548_2320	Componente de fusão de membrana do sistema de efluxo multidrogas tripartidos do tipo MSF
KPHS_01060	VBIKlePne218548_0106	Proteína da membrana interna yijd

KPHS_32510	VBIKlePne218548_3169	Proteína hipotética
KPHS_21620	VBIKlePne218548_2107	Antranilato sintase, componente amidotransferase (EC 4.1.3.27) / Antranilato fosforibosiltransferase (EC 2.4.2.18)
KPHS_05750	VBIKlePne218548_0557	Amina oxidase, contendo flavina
KPHS_14980	VBIKlePne218548_1458	Proteína de translocação dMaisla de arginina tate
KPHS_21210	VBIKlePne218548_2067	Succinilarginina di-hidrolase (EC 3.5.3.23)
KPHS_02370	VBIKlePne218548_0234	Sistema PTS, componente IID específico de sorbose
KPHS_27560	VBIKlePne218548_2677	Diaminobutirato-2-oxoglutarato aminotransferase (EC 2.6.1.76)
KPHS_47020	VBIKlePne218548_4593	Proteína não caracterizada yhbt
KPHS_07650	VBIKlePne218548_0744	Regulador transcricional do transporte de tricarboxilato tctd => Regulador da resposta ao citrato citb
KPHS_17980	VBIKlePne218548_1751	Tiorredoxina redutase (EC 1.8.1.9)
KPHS_14650	VBIKlePne218548_1425	Fitase
KPHS_42556	VBIKlePne218548_3356	Provável diguanilato ciclase yedq
KPHS_22330	VBIKlePne218548_2175	Oxidoredutase, Família de desidrogenase/redutase de cadeia curta
KPHS_25580	VBIKlePne218548_2485	Desidrogenase de álcool (EC 1.1.1.1)
KPHS_42830	VBIKlePne218548_4183	Proteína de corpo poliédrico de utilização de propanodiol pduu
KPHS_38040	VBIKlePne218548_3708	Proteína de transporte de cianato cynx
KPHS_36770	VBIKlePne218548_3583	Transportador ABC, proteína permease yejb

Tabela 4 – Transcritos de genes expressos 2x menos em *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase exposta a CIM de meropenem

<i>Refseq Locus Tag</i>	<i>Alt Locus Tag</i>	Produto
KPHS_00170	VBIKlePne218548_0017	Proteína yihd
KPHS_26170	VBIKlePne218548_2544	Proteína hipotética
KPHS_13410	VBIKlePne218548_1303	Transportador ABC, proteína de ligação ao substrato (cluster 3, aa básico/glutamina/opinas)
KPHS_34850	VBIKlePne218548_3396	Atpase necessária tanto para a montagem do complexo de secreção tipo IV quanto para a secreção do complexo T-DNA, virb11
KPHS_52650	VBIKlePne218548_5146	Lipoproteína de membrana externa yidq
KPHS_04430	VBIKlePne218548_0434	Proteína ribossômica LSU l9p
KPHS_50540	VBIKlePne218548_4938	Transportador ABC de dipeptídeo, proteína de ligação ao ATP dppf (TC 3.A.1.5.2)
KPHS_10730	VBIKlePne218548_1041	Nucleosídeo fosforilase de pirimidina/purina ppnp
KPHS_25060	VBIKlePne218548_2437	Proteína hipotética
KPHS_02850	VBIKlePne218548_0282	Proteína hipotética
KPHS_34180	VBIKlePne218548_3329	Proteína hipotética
KPHS_17030	VBIKlePne218548_1660	Aldose de açúcar solúvel, dependente de PQQ (EC 1.1.5.-)
KPHS_31130	VBIKlePne218548_3033	4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase (EC 1.13.11.27)
KPHS_23560	VBIKlePne218548_2289	D-lactato desidrogenase (EC 1.1.1.28)
KPHS_02310	VBIKlePne218548_0228	Isocitrato desidrogenase fosfatase (EC 2.7.11.5)/quinase (EC 3.1.3.-)
KPHS_46960	VBIKlePne218548_4587	Proteína de membrana não caracterizada, família yraq
KPHS_20510	VBIKlePne218548_1997	Proteína hipotética
KPHS_02330	VBIKlePne218548_0230	5-metiltetraidrofolato--homocisteína metiltransferase (EC 2.1.1.13)
KPHS_30070	VBIKlePne218548_2929	Proteína hipotética
KPHS_45850	VBIKlePne218548_4477	D-glicero-beta-D-mano-heptose 1-fosfato adenililtransferase (EC 2.7.7.70) / D-glicero-beta-D-mano-heptose-7-fosfato quinase (EC 2.7.1.167)
KPHS_37810	VBIKlePne218548_3685	Proteína MAISF0226 yfcj
KPHS_10740	VBIKlePne218548_1042	Fator de crescimento dependente de recombinação de DNA rdgc
KPHS_48620	VBIKlePne218548_4750	Proteína ribossômica SSU S3p (s3e)
KPHS_50640	VBIKlePne218548_4949	Proteína não caracterizada yhjy
KPHS_15130	VBIKlePne218548_1473	Leucil-trna sintetase (EC 6.1.1.4)
KPHS_27380	VBIKlePne218548_2660	Proteína hipotética
KPHS_09400	VBIKlePne218548_0912	Precursor de lipoproteína yaef não caracterizado
KPHS_41760	VBIKlePne218548_4077	Proteína de transporte de membrana putativa

KPHS_08480	VBIKlePne218548_0822	Espermidina sintase (EC 2.5.1.16)
KPHS_32130	VBIKlePne218548_3131	Proteína reguladora de resposta a nitrato/nitrito narl
KPHS_31530	VBIKlePne218548_3073	Proteína hipotética
KPHS_01240	VBIKlePne218548_0123	Proteína de membrana DUF554 não caracterizada
KPHS_48930	VBIKlePne218548_4779	Proteína yhfA
KPHS_18050	VBIKlePne218548_1757	Cadeia A da dimetilsulfóxido redutase anaeróbica (EC 1.8.5.3), domínio de ligação à molibdopterina
KPHS_30440	VBIKlePne218548_2965	Provável proteína integral de membrana NMA1777
KPHS_29780	VBIKlePne218548_3231	Antiportador K(+)/H(+) nhap2
KPHS_13360	VBIKlePne218548_2900	Repressor da síntese de nucleotídeos de purina
KPHS_51760	VBIKlePne218548_1298	Proteína hipotética
KPHS_36920	VBIKlePne218548_5061	Proteína facilitadora da captação de glicerol
KPHS_00960	VBIKlePne218548_3598	Proteína de membrana MAISF0118 não caracterizada
KPHS_30970	VBIKlePne218548_0095	Regulador transcricional não caracterizado yijo, família arac
KPHS_00750	VBIKlePne218548_0890	Uridilato quinase (EC 2.7.4.22)
KPHS_37670	VBIKlePne218548_3017	Polifenol oxidase multicobre
KPHS_12940	VBIKlePne218548_0075	6-fosfofrutoquinase (EC 2.7.1.11)
KPHS_22200	VBIKlePne218548_3671	Transportador ABC de histidina, proteína de ligação ao substrato hisj (TC 3.A.1.3.1)
KPHS_50180	VBIKlePne218548_1256	5-hidroxiisourato hidrolase (EC 3.5.2.17)
KPHS_06780	VBIKlePne218548_2163	L-alanina-DL-glutamato epimerase (EC 5.1.1.n1)
KPHS_22410	VBIKlePne218548_4903	Oligopeptidase A (EC 3.4.24.70)
KPHS_03360	VBIKlePne218548_0658	Proteína hipotética
KPHS_31690	VBIKlePne218548_2182	Proteína hipotética
KPHS_30580	VBIKlePne218548_0331	Alfa-D-ribose 1-metilfosfonato 5-trifosfato difosfatase (EC 3.6.1.63)
KPHS_45390	VBIKlePne218548_3089	Cadeia alfa da fenilalanil-trna sintetase (EC 6.1.1.20)
KPHS_40540	VBIKlePne218548_2979	Proteína de biogênese do tipo C do citocromo C ccmc, heme liase putativa para ccme
KPHS_06190	VBIKlePne218548_4431	Desidrogenase/redutase de cadeia curta SDR?
KPHS_01990	VBIKlePne218548_3958	Proteína de choque térmico grpe
KPHS_23620	VBIKlePne218548_0601	Proteína de membrana externa não caracterizada yfaz
KPHS_17510	VBIKlePne218548_0196	Proteína ribossomal LSU L10p (P0)
KPHS_29100	VBIKlePne218548_2295	Proteína ydbl sMaisostamente não caracterizada, pode estar relacionada ao metabolismo de aminas
KPHS_22340	VBIKlePne218548_1704	Proteína de fago Ogr
KPHS_15250	VBIKlePne218548_2831	Protease ydcp não caracterizada

KPHS_44590	VBIKlePne218548_2176	Trifosfohidrolase Dntp, ampla especificidade de substrato
KPHS_16420	VBIKlePne218548_1485	Proteína phoh induzível por privação de fosfato, atpase prevista

Tabela 5 – Transcritos associados a estresse oxidativo em *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase exposta a CIM de meropenem

<i>Refseq Locus Tag</i>	<i>Alt Locus Tag</i>	Produto	Varição	<i>Expressão</i>
KPHS_22110	VBIKlePne218548_2154	Proteína de choque fágico C	2	Mais
KPHS_32820	VBIKlePne218548_3196	SMaisosta proteína de choque frio	2	Mais
KPHS_40540	VBIKlePne218548_3958	Proteína de choque térmico GrpE	2	Menos

Tabela 6 – Transcritos associados a transportadores de membrana em *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase exposta a CIM de meropenem

<i>Refseq Locus Tag</i>	<i>Alt Locus Tag</i>	Produto	Varição	<i>Expressão</i>
KPHS_21110	VBIKlePne218548_2057	Transportador ABC, proteína permease YnjC	2	Mais
KPHS_30010	VBIKlePne218548_2923	Transportador ABC de oligopeptídeo, proteína permease OppB (TC 3.A.1.5.1)	2	Mais
KPHS_37640	VBIKlePne218548_3668	Transportador ABC de histidina, proteína de ligação a ATP HisP (TC 3.A.1.3.1)	2	Mais
KPHS_05990	VBIKlePne218548_0581	Transportador ABC, proteína permease (cluster 2, ribose/xilose/arabinose/galactose)	2	Mais
KPHS_28380	VBIKlePne218548_2759	Permease do transportador de fármacos/metabólitos (DMT) da família sMaiser	2	Mais
KPHS_30890	VBIKlePne218548_3009	Transportador ABC, proteína permease (cluster 10, nitrato/sulfonato/bicarbonato)	2	Mais
KPHS_21560	VBIKlePne218548_2101	Transportador tipo MFS não caracterizado	2	Mais
KPHS_11720	VBIKlePne218548_1137	Transportador ABC de maltodextrina, proteína permease MdxG	2	Mais



KPHS_50070	VBIKlePne218548_4892	Transportador ABC de níquel, proteína permease NikC (TC 3.A.1.5.3)	2	Mais
KPHS_02990	VBIKlePne218548_0295	Transportador ABC, proteína permease 2 (cluster 1, maltose/g3p/poliamina/ferro)	2	Mais
KPHS_35890	VBIKlePne218548_3496	Transportador não caracterizado MdtD da família de facilitadores principais sMaiser (MFS)	2	Mais
KPHS_44320	VBIKlePne218548_4330	Transportador de D-galactonato	2	Mais
KPHS_36300	VBIKlePne218548_3537	Proteína permease do transportador ABC osmoprotetor YehY	2	Mais
KPHS_09450	VBIKlePne218548_0917	Proteína permease do transportador ABC de metionina	2	Mais
KPHS_10390	VBIKlePne218548_1007	Transportador ABC, proteína permease 2 (cluster 4, leucina/isoleucina/valina/benzoato)	2	Mais
KPHS_06510	VBIKlePne218548_0631	Transportador de L-galactonato	2	Mais
KPHS_30880	VBIKlePne218548_3008	Transportador ABC, proteína de ligação a ATP (cluster 1, maltose/g3p/poliamina/ferro); Transportador ABC, proteína de ligação ao ATP (cluster 10, nitrato/sulfonato/bicarbonato)	2	Mais
KPHS_16010	VBIKlePne218548_1559	Transportador ABC de molibdênio, proteína de ligação ao substrato ModA	2	Mais
KPHS_30790	VBIKlePne218548_3000	Transportador ABC, proteína permease (cluster 3, aminoácidos básicos/glutamina/opinas)	2	Mais
KPHS_28270	VBIKlePne218548_2748	Transportador ABC, proteína de ligação ao ATP (cluster 5, níquel/peptídeos/opinas) / Transportador ABC, proteína de ligação ao ATP (cluster 5, níquel/peptídeos/opinas)	2	Mais
KPHS_18800	VBIKlePne218548_1831	Transportador ABC, proteína de ligação ao substrato (cluster 5, níquel/peptídeos/opinas)	2	Mais
KPHS_14570	VBIKlePne218548_1417	Transportador ABC de 5-metiltiorribose, proteína de ligação ao ATP	2	Mais
KPHS_31120	VBIKlePne218548_3032	Transportador tipo MFS não caracterizado	2	Mais
KPHS_20080	VBIKlePne218548_1956	Proteína permease PotB do transportador ABC de importação de espermidina/putrescina (TC 3.A.1.11.1)	2	Mais
KPHS_05330	VBIKlePne218548_0520	Transportador ABC, proteína de ligação ao ATP (cluster 1, maltose/g3p/poliamina/ferro);	2	Mais

KPHS_30030	VBIKlePne218548_2925	transportador ABC, proteína de ligação ao ATP (cluster 10, nitrato/sulfonato/bicarbonato)		
KPHS_42210	VBIKlePne218548_4121	transportador ABC, proteína de ligação ao ATP (cluster 5, níquel/peptídeos/opinas)	2	Mais
KPHS_36770	VBIKlePne218548_3583	transportador ABC de metionina, proteína de ligação ao substrato	2	Mais
KPHS_03290	VBIKlePne218548_0324	transportador ABC, proteína permease YejB	2	Mais
KPHS_38040	VBIKlePne218548_3708	Sistema de transporte ABC, proteína de ligação ao substrato periplásmico Z5689	2	Mais
KPHS_19240	VBIKlePne218548_1874	Proteína de transporte de cianato CynX	2	Mais
		Proteína periplásmica de transporte de ferro ferroso EfeO, contém domínio peptidase-M75 e (frequentemente) domínio semelhante à cMaisredoxina	2	Mais
KPHS_19250	VBIKlePne218548_1875	Peroxidase de transporte de ferro ferroso EfeB	2	Mais
KPHS_13190	VBIKlePne218548_1281	Proteína de ligação ao ATP do sistema de transporte de Inositol	2	Mais
KPHS_37950	VBIKlePne218548_3699	Proteína de transporte de ácidos graxos de cadeia longa	2	Mais
KPHS_27780	VBIKlePne218548_2699	Proteína associada à ATPase de transporte de Mg(2+) MgtC	2	Mais
KPHS_05350	VBIKlePne218548_0522	Permease putativa do sistema de transporte de SN-glicerol-3-fosfato	2	Mais
KPHS_17640	VBIKlePne218548_1716	Proteína de permease do sistema de transporte de putrescina PotH (TC 3.A.1.11.2)	2	Mais
KPHS_14980	VBIKlePne218548_1458	Proteína de translocação de arginina dupla TatE	2	Mais
KPHS_48610	VBIKlePne218548_4749	Proteína ribossomal LSU L16p (L10e)	2	Mais
KPHS_03050	VBIKlePne218548_0301	Permease de guanina/hipoxantina GhxP	2	Mais
KPHS_12170	VBIKlePne218548_1182	Provável proteína permease de exportação de ferro FetB	2	Mais
KPHS_35200	VBIKlePne218548_3429	Provável tautomerase YoiI/YrdN	2	Mais
KPHS_14710	VBIKlePne218548_1431	Proteína da família da permease de citosina/purina/uracila/tiamina/alantoína	2	Mais
KPHS_13410	VBIKlePne218548_1303	Transportador ABC, proteína de ligação ao substrato (cluster 3, aa básico/glutamina/opinas)	2	Menos

KPHS_50540	VBIKlePne218548_4938	Transportador ABC de dipeptídeo, proteína de ligação ao ATP DppF (TC 3.A.1.5.2)	2	Menos
KPHS_37670	VBIKlePne218548_3671	Transportador ABC de histidina, proteína de ligação ao substrato HisJ (TC 3.A.1.3.1)	2	Menos
KPHS_30580	VBIKlePne218548_2979	Proteína de biogênese do tipo C do citocromo C, CcmC, heme liase putativa para CcmE	2	Menos
KPHS_01990	VBIKlePne218548_0196	Proteína ribossômica LSU L10p (P0)	2	Menos
KPHS_04430	VBIKlePne218548_0434	Proteína ribossômica LSU L9p	2	Menos
KPHS_33180	VBIKlePne218548_3231	Antiportador K(+)/H(+) NhaP2	2	Menos

Tabela 7 – Transcritos associados a fatores de transcrição em *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase exposta a CIM de meropenem

<i>Refseq Locus Tag</i>	<i>Alt Locus Tag</i>	<i>Produto</i>	<i>Variação</i>	<i>Expressão</i>
KPHS_00530	VBIKlePne218548_0053	Regulador transcricional	2	Mais
KPHS_50270	VBIKlePne218548_4912	Regulador transcricional YhjC, família LysR	2	Mais
KPHS_36170	VBIKlePne218548_3524	Regulador transcricional, família LysR	2	Mais
KPHS_28180	VBIKlePne218548_2740	Regulador transcricional, família MarR / Acetiltransferase (GNAT)	2	Mais
KPHS_03430	VBIKlePne218548_0338	Regulador transcricional PhnF	2	Mais
KPHS_27160	VBIKlePne218548_2639	Proteína reguladora transcricional putativa da família rpiR	2	Mais
KPHS_27080	VBIKlePne218548_2631	Regulador transcricional, família LysR	2	Mais
KPHS_41740	VBIKlePne218548_4075	Regulador transcricional, família MarR	2	Mais
KPHS_16820	VBIKlePne218548_1639	Regulador transcricional, família GntR	2	Mais
KPHS_22150	VBIKlePne218548_2158	Regulador transcricional, família LysR	2	Mais
KPHS_32040	VBIKlePne218548_3123	Regulador transcricional, família AsnC	2	Mais
KPHS_07650	VBIKlePne218548_0744	Regulador transcricional de transporte de tricarboxilato TctD => Regulador de resposta a citrato CitB	2	Mais
KPHS_03020	VBIKlePne218548_0298	Regulador duplo transcricional de ligação a DNA SoxS	2	Mais
KPHS_46100	VBIKlePne218548_4502	Regulador transcricional positivo EvgA	2	Mais
KPHS_26460	VBIKlePne218548_2573	Repressor transcricional do operon frutose, família DeoR	2	Mais
KPHS_10620	VBIKlePne218548_1030	Proteína do domínio S1 de ligação a RNA	2	Mais
KPHS_43960	VBIKlePne218548_4295	Proteína do domínio de ligação a RNA	2	Mais
KPHS_36820	VBIKlePne218548_3588	SSU rRNA pseudouridina(516) sintase (EC 5.4.99.19)	2	Mais
KPHS_04110	VBIKlePne218548_0403	tRNA proteína de biossíntese de treonilcarbamoiladenosina TsaE	2	Mais
KPHS_32410	VBIKlePne218548_3159	Peptidil-tRNA hidrolase (EC 3.1.1.29)	2	Mais
KPHS_39890	VBIKlePne218548_3894	Inibidor A associado ao ribossomo	2	Mais
KPHS_15080	VBIKlePne218548_1468	Fator de silenciamento ribossômico RsfA	2	Mais
KPHS_22780	VBIKlePne218548_2215	Cabeça de fago, proteína portal B	2	Mais
KPHS_34330	VBIKlePne218548_3343	Regulador de resposta associado a BarA UvrY (= GacA = SirA)	2	Mais

KPHS_41910	VBIKlePne218548_4092	Proteína de conversão de isoenzima de fosfatase alcalina	2	Mais
KPHS_17670	VBIKlePne218548_1719	23S rRNA (uracil(747)-C(5))-metiltransferase (EC 2.1.1.189)	2	Mais
KPHS_44620	VBIKlePne218548_4359	tRNA (guanina(46)-N(7))-metiltransferase (EC 2.1.1.33)	2	Mais
KPHS_33520	VBIKlePne218548_3263	23S rRNA (guanina(745)-N(1))-metiltransferase (EC 2.1.1.187)	2	Mais
KPHS_07100	VBIKlePne218548_0690	Metiltransferase de tRNA/rRNA não caracterizada LasT	2	Mais
KPHS_04170	VBIKlePne218548_0409	Proteína de ligação a GTP associada à LSU do ribossoma HflX	2	Mais
KPHS_00960	VBIKlePne218548_0095	Regulador transcricional não caracterizado YijO, família AraC	2	Menos
KPHS_15130	VBIKlePne218548_1473	Leucil-tRNA sintetase (EC 6.1.1.4)	2	Menos
KPHS_31690	VBIKlePne218548_3089	Cadeia alfa da fenilalanil-tRNA sintetase (EC 6.1.1.20)	2	Menos
KPHS_48620	VBIKlePne218548_4750	Proteína ribossômica SSU S3p (S3e)	2	Menos
KPHS_17510	VBIKlePne218548_1704	Proteína do fago Ogr	2	Menos
KPHS_32130	VBIKlePne218548_3131	Proteína reguladora de resposta a nitrato/nitrito NarL	2	Menos

Tabela 8 – Transcritos associados a proteínas de função desconhecida em *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase exposta a CIM de meropenem

<i>Refseq Locus Tag</i>	<i>Alt Locus Tag</i>	Produto	Varição	<i>Expressão</i>
KPHS_19160	VBIKlePne218548_1867	Proteína secretada putativa	2	Mais
KPHS_11190	VBIKlePne218548_1086	Proteína Yitk MAISF0234	2	Mais
KPHS_46990	VBIKlePne218548_4590	Proteína YhbP MAISF0306	2	Mais
KPHS_48340	VBIKlePne218548_4722	Proteína de função desconhecida Smg	2	Mais
KPHS_07590	VBIKlePne218548_0738	Proteína ApaG	2	Mais
KPHS_23040	VBIKlePne218548_2236	Proteína VgrG	2	Mais

KPHS_09370	VBIKlePne218548_0909	Proteína YaeQ	2	Mais
KPHS_33750	VBIKlePne218548_3286	Proteína de resistência ao cobre CopC	2	Mais
KPHS_27500	VBIKlePne218548_2672	corresponde a STY3950 do Acesso AL513382: CT18 de Salmonella typhi	2	Mais
KPHS_13560	VBIKlePne218548_1318	Receptor de ferro ferricromo	2	Mais
KPHS_14650	VBIKlePne218548_1425	Fitase	2	Mais
KPHS_51150	VBIKlePne218548_5000	Enxofre YibN relacionado à rodanês	2	Mais
KPHS_37810	VBIKlePne218548_3685	Proteína YfcJ MAISF0226	2	Menos
KPHS_48930	VBIKlePne218548_4779	Proteína YhfA	2	Menos
KPHS_00170	VBIKlePne218548_0017	Proteína YihD	2	Menos
KPHS_30970	VBIKlePne218548_3017	FIG00003370: Polifenol oxidase multicobre	2	Menos

Tabela 9 – Transcritos associados à modificações em parede celular em *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase exposta a CIM de meropenem

<i>Refseq Locus Tag</i>	<i>Alt Locus Tag</i>	Produto	Variação	<i>Expressão</i>
KPHS_47870	VBIKlePne218548_4675	Proteína de formação de septo Maf	2	Mais
KPHS_37730	VBIKlePne218548_3677	Proteína de divisão celular associada ao septo DedD	2	Mais

Tabela 10 – Transcritos associados a conjugação e fatores plasmidiais de resistência em *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase exposta a CIM de meropenem

<i>Refseq Locus Tag</i>	<i>Alt Locus Tag</i>	Produto	Variação	<i>Expressão</i>
KPHS_13430	VBIKlePne218548_1305	Precursor da proteína MoaF	2	Mais
KPHS_34870	VBIKlePne218548_3398	Proteína MobB	2	Mais
KPHS_34890	VBIKlePne218548_3400	Proteína antirrestrição	2	Mais
KPHS_06030	VBIKlePne218548_0585	Proteína de resistência à fosfomicina Fosa	2	Mais

Tabela 11 – Transcritos associados a modificações em DNA de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase exposta a CIM de meropenem

<i>Refseq Locus Tag</i>	<i>Alt Locus Tag</i>	Produto	Variação	<i>Expressão</i>
KPHS_13960	VBIKlePne218548_1356	Transposase putativa InsK para o elemento de sequência de inserção IS150	2	Mais
KPHS_50590	VBIKlePne218548_4943	Transposase putativa InsK para o elemento de sequência de inserção IS150	2	Mais
KPHS_03530	VBIKlePne218548_0348	Transposase putativa InsK para o elemento de sequência de inserção IS150	2	Mais
KPHS_45300	VBIKlePne218548_4424	Helicase de DNA replicativa (DnaB) (EC 3.6.4.12)	2	Mais
KPHS_05570	VBIKlePne218548_0542	Helicases de DNA da família I putativas	2	Mais
KPHS_50650	VBIKlePne218548_4950	DNA-3-metiladenina glicosilase (EC 3.2.2.20)	2	Mais
KPHS_46940	VBIKlePne218548_4585	Proteína DiaA de associação ao iniciador de DNA	2	Mais
KPHS_11440	VBIKlePne218548_1110	Proteína de ligação a DNA HU-beta	2	Mais
KPHS_45130	VBIKlePne218548_4408	Proteína CoMaisling VirD4, ATPase necessária para a transferência de T-DNA	2	Mais
KPHS_05130	VBIKlePne218548_0500	Inibidor da ribonuclease E RraB	2	Mais
KPHS_02750	VBIKlePne218548_0272	Quinona oxidoredutase (EC 1.6.5.5)	2	Mais
KPHS_42020	VBIKlePne218548_4102	Nucleosídeo trifosfato pirofosfohidrolase MazG (EC 3.6.1.8)	2	Mais
KPHS_51490	VBIKlePne218548_5034	Proteína IS1 InsB	2	Mais
KPHS_19330	VBIKlePne218548_1883	Hidrolase putativa YcdX (EC 3.1.-.-)	2	Mais
KPHS_23840	VBIKlePne218548_2317	Helicase HrpA dependente de ATP	2	Mais
KPHS_18300	VBIKlePne218548_1782	Proteína de partição cromossômica MukF	2	Mais
KPHS_41850	VBIKlePne218548_4086	Proteína de divisão celular DivIC (FtsB), estabiliza FtsL contra a clivagem de RasP	2	Mais
KPHS_10740	VBIKlePne218548_1042	Fator de crescimento RdgC dependente de recombinação de DNA	2	Menos

KPHS_34850	VBIKlePne218548_3396	ATPase necessária tanto para a montagem do complexo de secreção tipo IV quanto para a secreção do complexo T-DNA, VirB11	2	Menos
KPHS_29780	VBIKlePne218548_2900	Repressor da síntese de nucleotídeos de purina	2	Menos
KPHS_10730	VBIKlePne218548_1041	Fosforilase de nucleosídeo de pirimidina/purina PpnP	2	Menos

Tabela 12 – Transcritos associados a proteínas hipotéticas de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase exposta a CIM de meropenem

<i>Refseq Locus Tag</i>	<i>Alt Locus Tag</i>	Produto	Variação	<i>Expressão</i>
KPHS_25080	VBIKlePne218548_2438	Proteína hipotética	2	Mais
KPHS_38880	VBIKlePne218548_3791	Proteína hipotética	2	Mais
KPHS_26480	VBIKlePne218548_2575	Proteína hipotética	2	Mais
KPHS_21930	VBIKlePne218548_2136	Proteína hipotética	2	Mais
KPHS_30120	VBIKlePne218548_2935	Proteína hipotética	2	Mais
KPHS_30290	VBIKlePne218548_2951	Proteína hipotética	2	Mais
KPHS_34720	VBIKlePne218548_3383	Proteína hipotética	2	Mais
KPHS_21520	VBIKlePne218548_2097	Proteína hipotética	2	Mais
KPHS_29900	VBIKlePne218548_2912	Proteína hipotética	2	Mais
KPHS_04660	VBIKlePne218548_0456	Proteína hipotética	2	Mais
KPHS_51540	VBIKlePne218548_5040	Proteína hipotética	2	Mais
KPHS_37220	VBIKlePne218548_3627	Proteína hipotética	2	Mais
KPHS_22880	VBIKlePne218548_2223	Proteína hipotética	2	Mais
KPHS_29900	VBIKlePne218548_2912	Proteína hipotética	2	Mais
KPHS_15170	VBIKlePne218548_1477	Proteína hipotética	2	Mais
KPHS_23260	VBIKlePne218548_2258	Proteína hipotética	2	Mais
KPHS_06240	VBIKlePne218548_0606	Proteína hipotética	2	Mais
KPHS_02220	VBIKlePne218548_0219	Proteína hipotética	2	Mais



KPHS_46130	VBIKlePne218548_4505	Proteína hipotética	2	Mais
KPHS_27400	VBIKlePne218548_2662	Proteína hipotética	2	Mais
KPHS_42250	VBIKlePne218548_4125	Proteína hipotética	2	Mais
KPHS_39420	VBIKlePne218548_3847	Proteína hipotética	2	Mais
KPHS_31300	VBIKlePne218548_3049	Proteína hipotética	2	Mais
KPHS_43840	VBIKlePne218548_4283	Proteína hipotética	2	Mais
KPHS_31170	VBIKlePne218548_3037	Proteína hipotética	2	Mais
KPHS_35100	VBIKlePne218548_3420	Proteína hipotética	2	Mais
KPHS_23210	VBIKlePne218548_2253	Proteína hipotética	2	Mais
KPHS_32510	VBIKlePne218548_3169	Proteína não caracterizada ydbh	2	Mais
KPHS_23580	VBIKlePne218548_2291	Proteína chaperona não caracterizada yegd	2	Mais
KPHS_35800	VBIKlePne218548_3487	Proteína não caracterizada STM4317	2	Mais
KPHS_45350	VBIKlePne218548_4427	Proteína não caracterizada ybbk	2	Mais
KPHS_20550	VBIKlePne218548_2001	Proteína não caracterizada yhbt	2	Mais
KPHS_47020	VBIKlePne218548_4593	Proteína não caracterizada yhha	2	Mais
KPHS_49610	VBIKlePne218548_4847	Proteína não caracterizada yrap	2	Mais
KPHS_46950	VBIKlePne218548_4586	Proteína hipotética semelhante à álcool desidrogenase do tipo zinco ydjj	2	Mais
KPHS_20880	VBIKlePne218548_2034	Proteína hipotética	2	Mais
KPHS_20510	VBIKlePne218548_1997	Proteína hipotética	2	Menos
KPHS_30070	VBIKlePne218548_2929	Proteína hipotética	2	Menos
KPHS_27380	VBIKlePne218548_2660	Proteína hipotética	2	Menos
KPHS_31530	VBIKlePne218548_3073	Proteína hipotética	2	Menos

KPHS_13360	VBIKlePne218548_1298	Proteína hipotética	2	Menos
KPHS_06780	VBIKlePne218548_0658	Proteína hipotética	2	Menos
KPHS_22410	VBIKlePne218548_2182	Proteína não caracterizada yhjy	2	Menos
KPHS_50640	VBIKlePne218548_4949	Proteína hipotética	2	Menos

Tabela 13 – Transcritos associados a modificações em membrana plasmática de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase exposta a CIM de meropenem

<i>Refseq Locus Tag</i>	<i>Alt Locus Tag</i>	Produto	Variação	<i>Expressão</i>
KPHS_48280	VBIKlePne218548_4716	Proteína de membrana não caracterizada yhdv	2	Mais
KPHS_47450	VBIKlePne218548_4634	Proteína de membrana interna yrbg, antiportador cálcio/sódio:próton previsto	2	Mais
KPHS_07540	VBIKlePne218548_0733	Suposta lipoproteína de membrana externa STM0080	2	Mais
KPHS_46560	VBIKlePne218548_4547	Proteína de membrana interna da família Deda yqja	2	Mais
KPHS_24970	VBIKlePne218548_2428	Proteína de membrana MAISF0060 ynfa	2	Mais
KPHS_44560	VBIKlePne218548_4353	Proteína de membrana integral de divisão celular, yggT e parentes de meio comprimento	2	Mais
KPHS_17820	VBIKlePne218548_1734	Suposta proteína de membrana	2	Mais
KPHS_44000	VBIKlePne218548_4299	Proteína de membrana, sMaispressor para sensibilidade ao cobre scsb	2	Mais
KPHS_37990	VBIKlePne218548_3703	Proteína de membrana interna yfdc	2	Mais
KPHS_34800	VBIKlePne218548_3392	Proteína de membrana interna do complexo de secreção de T-DNA tipo IV, virb6	2	Mais
KPHS_38830	VBIKlePne218548_3786	Proteína de montagem do barril beta da membrana externa bamc	2	Mais
KPHS_13310	VBIKlePne218548_1293	Componente de fusão de membrana do sistema de resistência a múltiplos fármacos tripartite	2	Mais

KPHS_21420	VBIKlePne218548_2087	Proteína de membrana suposta	2	Mais
KPHS_01060	VBIKlePne218548_0106	Proteína de membrana interna yijd	2	Mais
KPHS_10790	VBIKlePne218548_1047	Proteína sensora do regulon de fosfato phor (sphs) (EC 2.7.13.3)	2	Mais
KPHS_35810	VBIKlePne218548_3488	Transdução de sinal do sensor periplásmico histidina quinase	2	Mais
KPHS_39210	VBIKlePne218548_3826	Transglicosilase insensível à penicilina (EC 2.4.2.-) e transpeptidase PBP-1C	2	Mais
	VBIKlePne218548_3356	Provável diguanilato ciclase yedq	2	Mais
KPHS_41320	VBIKlePne218548_4034	Subunidade 4 da formato hidrogeniase	2	Mais
KPHS_28340	VBIKlePne218548_2754	Subunidade gama N da formato desidrogenase (EC 1.2.1.2)	2	Mais
KPHS_41350	VBIKlePne218548_4037	Proteína reguladora da formato hidrogeniase hycA	2	Mais
KPHS_41330	VBIKlePne218548_4035	Subunidade 3 da formato hidrogeniase	2	Mais
KPHS_52650	VBIKlePne218548_5146	Lipoproteína da membrana externa yidq	2	Mais
KPHS_51350	VBIKlePne218548_5020	Transferase do ácido 3-desoxi-D-mano-octulosônico (EC 2.4.99.12) (EC 2.4.99.13)	2	Mais
KPHS_18250	VBIKlePne218548_1777	Citidililtransferase 3-desoxi-mano-octuloseonato (EC 2.7.7.38)	2	Mais
KPHS_47470	VBIKlePne218548_4636	Fosfatase 8-fosfato 3-desoxi-D-mano-octuloseonato (EC 3.1.3.45)	2	Mais
KPHS_46960	VBIKlePne218548_4587	Proteína de membrana não caracterizada, família YraQ	2	Menos
KPHS_41760	VBIKlePne218548_4077	Proteína de transporte de membrana putativa	2	Menos
KPHS_01240	VBIKlePne218548_0123	Proteína de membrana DUF554 não caracterizada	2	Menos
KPHS_30440	VBIKlePne218548_2965	Provável proteína de membrana integral NMA1777	2	Menos
KPHS_36920	VBIKlePne218548_3598	Proteína de membrana MAISF0118 não caracterizada	2	Menos
KPHS_06190	VBIKlePne218548_0601	Proteína de membrana externa não caracterizada Yfaz	2	Menos
KPHS_16420	VBIKlePne218548_1599	Proteína de membrana interna YbhI	2	Menos

KPHS_45850	VBIKlePne218548_4477	D-glicero-beta-D-mano-heptose 1-fosfato adenililtransferase (EC 2.7.7.70) / D-glicero- beta-D-mano-heptose-7-fosfato quinase (EC 2.7.1.167)	2	Menos
------------	----------------------	--	---	-------

Tabela 14 – Transcritos associados a motilidade de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase exposta a CIM de meropenem

<i>Refseq Locus Tag</i>	<i>Alt Locus Tag</i>	Produto	Variação	<i>Expressão</i>
KPHS_03150	VBIKlePne218548_0310	Subunidade fimbrial principal putativa	2	Mais
KPHS_08280	VBIKlePne218548_0802	Montagem fimbrial tipo IV, ATPase PilB	2	Mais
KPHS_13680	VBIKlePne218548_1329	Subunidade fimbrial principal CFA/I	2	Mais
KPHS_10310	VBIKlePne218548_0999	Chaperona fimbrial CFA/I	2	Mais
KPHS_44540	VBIKlePne218548_4351	Proteína de motilidade de contração muscular PilT	2	Mais
KPHS_45670	VBIKlePne218548_4459	Regulador de resposta do sistema de dois componentes QseB	2	Mais

Tabela 15 – Transcritos associados a bomba de efluxo de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase exposta a CIM de meropenem

<i>Refseq Locus Tag</i>	<i>Alt Locus Tag</i>	Produto	Variação	<i>Expressão</i>
KPHS_29820	VBIKlePne218548_2904	Transportador de efluxo de múltiplos fármacos MdtK/NorM (família MATE)	2	Mais
KPHS_52360	VBIKlePne218548_5119	Bomba de efluxo de ribonucleosídeos de purina NepI	2	Mais
KPHS_15230	VBIKlePne218548_1483	Proteína de efluxo de magnésio e cobalto CorC	2	Mais
KPHS_03840	VBIKlePne218548_0376	Sistema de efluxo RND, proteína de fusão de membrana	2	Mais

KPHS_06130	VBIKlePne218548_0595	Bomba de efluxo de múltiplos fármacos MdtM (do tipo MFS)	2	Mais
KPHS_07550	VBIKlePne218548_0734	Proteína auxiliar KefF do sistema de efluxo de potássio regulado por glutathione	2	Mais
KPHS_23870	VBIKlePne218548_2320	Componente de fusão de membrana do sistema de efluxo de múltiplos fármacos tripartite do tipo MSF	2	Mais

Tabela 16 – Transcritos associados ao metabolismo de ácidos graxos e congêneres em *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase exposta a CIM de meropenem.

<i>Refseq Locus Tag</i>	<i>Alt Locus Tag</i>	Produto	<i>Classificação</i>	<i>Variação</i>	<i>Expressão</i>
KPHS_51250	VBIKlePne218548_5010	Proteína rfaz da biossíntese do núcleo de lipopolissacarídeo	Lipídio	2	Mais
KPHS_21840	VBIKlePne218548_2128	Proteína de montagem de lipopolissacarídeo lapb	Lipídio	2	Mais
KPHS_45010	VBIKlePne218548_4396	Lipoproteína putativa	Lipídio	2	Mais
KPHS_10530	VBIKlePne218548_1021	Fosfolipídio/glicerol aciltransferase	Lipídio	2	Mais
KPHS_09220	VBIKlePne218548_0894	Fosfatidato citidililtransferase (EC 2.7.7.41)	Fosfolipídeos	2	Mais
KPHS_30920	VBIKlePne218548_3012	Acil-coa desidrogenase	Lipídio	2	Mais
KPHS_01670	VBIKlePne218548_0164	Lisofosfolipase L2 (EC 3.1.1.5)	Fosfolipídeos	2	Mais
KPHS_10430	VBIKlePne218548_1011	Cadeia leve da etanolamina amônia-liase (EC 4.3.1.7)	Glicerofosfolipídeos	2	Mais
KPHS_18240	VBIKlePne218548_1776	Proteína ycar no cluster de biossíntese de KDO2-Lipídio A	Lipídio	2	Mais

KPHS_09400	VBIKlePne218548_0912	Precursor de lipoproteína yaef não caracterizado	Lipídio	2	Menos
------------	----------------------	--	---------	---	-------

Tabela 17 – Transcritos associados ao metabolismo de carboidrato e congêneres de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase exposta a CIM de meropenem

<i>Refseq Locus Tag</i>	<i>Alt Locus Tag</i>	Produto	<i>Classificação</i>	<i>Variação</i>	<i>Expressão</i>
KPHS_16550	VBIKlePne218548_1612	Permease de açúcar ácido	Carboidrato	2	Mais
KPHS_09220	VBIKlePne218548_0894	Fosfatidato citidililtransferase (EC 2.7.7.41)	Fosfolipídeos	2	Mais
KPHS_49980	VBIKlePne218548_4883	Undecaprenil fosfato-alfa-4-amino-4-desoxi-L-arabinose arabinosil transferase (EC 2.4.2.43) @ Proteína de resistência à polimixina PmrK	Carboidrato	2	Mais
KPHS_35740	VBIKlePne218548_3481	UTP--glicose-1-fosfato uridililtransferase (EC 2.7.7.9)	Carboidrato	2	Mais
KPHS_31990	VBIKlePne218548_3118	UTP--glicose-1-fosfato uridililtransferase (EC 2.7.7.9)	Carboidrato	2	Mais
KPHS_06470	VBIKlePne218548_0627	2-desidro-3-desoxifosfogalactonato aldolase (EC 4.1.2.21)	Carboidrato	2	Mais
KPHS_21410	VBIKlePne218548_2086	2-desoxiglicose-6-fosfato hidrolase (EC 3.1.3.68) @ Manitol-1-fosfatase (EC	Carboidrato	2	Mais

		3.1.3.22) @ Sorbitol-6-fosfatase (CE 3.1.3.50)			
KPHS_50740	VBIKlePne218548_4959	2-cetogluconato 6-fosfato redutase (EC 1.1.1.43)	Carboidrato	2	Mais
KPHS_36400	VBIKlePne218548_3547	6-fosfo-beta-glicosidase (EC 3.2.1.86)	Carboidrato	2	Mais
KPHS_15920	VBIKlePne218548_1551	Aldose 1-epimerase (EC 5.1.3.3)	Carboidrato	2	Mais
KPHS_00300	VBIKlePne218548_0029	alfa-D-glicose 1-fosfato fosfatase YihX (EC 3.1.3.10)	Carboidrato	2	Mais
KPHS_46520	VBIKlePne218548_4543	altronato desidratase (EC 4.2.1.7)	Carboidrato	2	Mais
KPHS_50380	VBIKlePne218548_4922	beta-1,4-glucanase (celulase) (EC 3.2.1.4)	Carboidrato	2	Mais
KPHS_26030	VBIKlePne218548_2530	glicosídeo hidrolase previsto por COG1649	Carboidrato	2	Mais
KPHS_02370	VBIKlePne218548_0234	Sistema PTS, componente IID específico para sorbose	Carboidrato	2	Mais
KPHS_02400	VBIKlePne218548_0237	Sistema PTS, componente IIA específico para sorbose (EC 2.7.1.206)	Carboidrato	2	Mais
KPHS_43150	VBIKlePne218548_4214	Sistema PTS, componente IIC específico para celobiose	Carboidrato	2	Mais
KPHS_06580	VBIKlePne218548_0638	Sistema PTS, IIC específico para frutose/olisina/glicoselisina	Carboidrato	2	Mais
KPHS_25900	VBIKlePne218548_2517	Manose-6-fosfato isomerase	Carboidrato	2	Mais
KPHS_42360	VBIKlePne218548_4136	L-fucose mutarotase (EC 5.1.3.29)	Carboidrato	2	Mais
KPHS_00070	VBIKlePne218548_0007	D-ribose piranase (EC 5.4.99.62)	Carboidrato	2	Mais

KPHS_07760	VBIKlePne218548_0755	Proteína reguladora do operon arabinose AraC	Carboidrato	2	Mais
KPHS_46880	VBIKlePne218548_4579	Galactitol-1-fosfato 5-desidrogenase (EC 1.1.1.251)	Carboidrato	2	Mais
KPHS_52680	VBIKlePne218548_5149	Galactonato desidratase (EC 4.2.1.6)	Carboidrato	2	Mais
KPHS_02930	VBIKlePne218548_0289	Inositol-1-monofosfatase (EC 3.1.3.25)	Carboidrato	2	Mais
KPHS_25600	VBIKlePne218548_2487	D-treonato 4-fosfato desidrogenase [descarboxilante]	Carboidrato	2	Mais
KPHS_10430	VBIKlePne218548_1011	Etanolamina amônia-liase de cadeia leve (EC 4.3.1.7)	Glicerofosfolipídeos	2	Mais
KPHS_13130	VBIKlePne218548_1275	Inose desidratase (EC 4.2.1.44)	Carboidrato	2	Mais
KPHS_00650	VBIKlePne218548_0065	Ramuloquinase (EC 2.7.1.5)	Carboidrato	2	Mais
KPHS_36410	VBIKlePne218548_3548	Sistema PTS, componente IIB específico para beta-glicosídeo / Sistema PTS, componente IIC específico para beta-glicosídeo / Sistema PTS, componente IIA específico para beta-glicosídeo	Carboidrato	2	Mais
KPHS_46860	VBIKlePne218548_4577	Sistema PTS, componente IIB específico para galactitol (EC 2.7.1.200)	Carboidrato	2	Mais
KPHS_17030	VBIKlePne218548_1660	Desidrogenase de açúcar aldose solúvel, Dependente de PQQ (EC 1.1.5.-)	Carboidrato	2	Menos
KPHS_00750	VBIKlePne218548_0075	6-fosfofrutocinase (EC 2.7.1.11)	Carboidrato	2	Menos



KPHS_03360	VBIKlePne218548_0331	Alfa-D-ribose 1- metilfosfonato 5-trifosfato difosfatase (EC 3.6.1.63)	Carboidrato	2	Menos
------------	----------------------	--	-------------	---	-------

Tabela 18 – Transcritos associados ao metabolismo proteico de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase exposta a CIM de meropenem

<i>Refseq Locus Tag</i>	<i>Alt Locus Tag</i>	Produto	Varição	<i>Expressão</i>
KPHS_07170	VBIKlePne218548_0697	Proteína transportadora de alanina/glicina putativa	2	Mais
KPHS_17920	VBIKlePne218548_1745	Proteína adaptadora de protease Clp dependente de ATP clps	2	Mais
KPHS_02660	VBIKlePne218548_0263	Repressor de resposta a SOS e protease lexa (EC 3.4.21.88)	2	Mais
KPHS_52340	VBIKlePne218548_5117	2-aminoetilfosfonato:piruvato aminotransferase (EC 2.6.1.37)	2	Mais
KPHS_39530	VBIKlePne218548_3858	Fosforibosilformilglicinamidina sintase, subunidade sintetase (EC 6.3.5.3) / Fosforibosilformilglicinamidina sintase, subunidade glutamina amidotransferase (EC 6.3.5.3)	2	Mais
KPHS_39070	VBIKlePne218548_3811	GMP sintase [glutamina-hidrólise], subunidade amidotransferase (EC 6.3.5.2) / GMP sintase [glutamina-hidrólise], subunidade ATP pirofosfatase (EC 6.3.5.2)	2	Mais
KPHS_05730	VBIKlePne218548_0555	Dependente de S-adenosil-L-metionina Metiltransferase, semelhante à ciclopropano-acil-fosfolipídio graxo sintase	2	Mais
KPHS_06490	VBIKlePne218548_0629	Histona acetiltransferase HPA2 e acetiltransferases relacionadas	2	Mais
KPHS_27560	VBIKlePne218548_2677	Diaminobutirato-2-oxoglutarato aminotransferase (EC 2.6.1.76)	2	Mais

KPHS_13510	VBIKlePne218548_1313	Permease de aminoácidos não caracterizada, família gabp	2	Mais
KPHS_41400	VBIKlePne218548_4042	[nife] hidrogenase metalocentrismo proteína de montagem hypd	2	Mais
KPHS_25170	VBIKlePne218548_2445	2-desidrotetronato isomerase (EC 5.3.1.35)	2	Mais
KPHS_38840	VBIKlePne218548_3787	4-hidroxi-tetra-hidro-dipicolinato sintase (EC 4.3.3.7)	2	Mais
KPHS_14630	VBIKlePne218548_1423	5-metil-tioribose quinase (EC 2.7.1.100)	2	Mais
KPHS_18440	VBIKlePne218548_1796	Amidase, família hidantoinase/carbamoilase (EC:3.5.1.87)	2	Mais
KPHS_22060	VBIKlePne218548_2149	Proteína da família da amidoidrolase	2	Mais
KPHS_30720	VBIKlePne218548_2993	Proteína da família da amidoidrolase	2	Mais
KPHS_05750	VBIKlePne218548_0557	Amina oxidase, contendo flavina	2	Mais
KPHS_45960	VBIKlePne218548_4488	Subunidade gama da urease (EC 3.5.1.5)	2	Mais
KPHS_19820	VBIKlePne218548_1932	Tiamina quinase (EC 2.7.1.89) @ Adenosilcobinamida quinase (EC 2.7.1.156)	2	Mais
KPHS_37760	VBIKlePne218548_3680	Proteína Deda	2	Mais
KPHS_18420	VBIKlePne218548_1794	Diaminopropionato amônia-liase (EC 4.3.1.15)	2	Mais
KPHS_37740	VBIKlePne218548_3678	Diidrofolato sintase (EC 6.3.2.12) @ Folilpoliglutamato sintase (EC 6.3.2.17)	2	Mais
KPHS_29710	VBIKlePne218548_2893	Lactoilglutamina liase (EC 4.4.1.5)	2	Mais
KPHS_42060	VBIKlePne218548_4106	Glicerato quinase (EC 2.7.1.31)	2	Mais
KPHS_52150	VBIKlePne218548_5098	HAD fosfatase yigl	2	Mais
KPHS_20430	VBIKlePne218548_1991	Fosfohidrolase dependente de metais, subdomínio HD	2	Mais
KPHS_17840	VBIKlePne218548_1736	Hidroxilamina redutase (EC 1.7.99.1)	2	Mais
KPHS_16410	VBIKlePne218548_1598	Subunidade catalítica moae da molibdopterina sintase (EC 2.8.1.12)	2	Mais
KPHS_35420	VBIKlePne218548_3451	Subunidade ciclase da imidazol glicerol fosfato sintase	2	Mais
KPHS_45870	VBIKlePne218548_4479	Trifosfatase inorgânica (EC 3.6.1.25)	2	Mais
KPHS_39650	VBIKlePne218548_3870	Peptidase sinal I (EC 3.4.21.89)	2	Mais
KPHS_42820	VBIKlePne218548_4182	Proteína pdut do corpo poliédrico de utilização do propanodiol	2	Mais

KPHS_42830	VBIKlePne218548_4183	Proteína pduu do corpo poliédrico de utilização do propanodiol	2	Mais
KPHS_51130	VBIKlePne218548_4998	Proteína secb exportadora de proteínas (mantém o estado desdobrado pré-exportação)	2	Mais
KPHS_50420	VBIKlePne218548_4926	Proteína citoplasmática putativa yhjr	2	Mais
KPHS_21950	VBIKlePne218548_2138	Proteína Ves induzida por estresse (hutd)	2	Mais
KPHS_22200	VBIKlePne218548_2163	L-alanina-DL-glutamato epimerase (EC 5.1.1.n1)	2	Menos
KPHS_29100	VBIKlePne218548_2831	Protease não caracterizada ydcp	2	Menos
KPHS_02330	VBIKlePne218548_0230	5-metiltetraidrofolato--homocisteína metiltransferase (EC 2.1.1.13)	2	Menos
KPHS_23620	VBIKlePne218548_2295	Proteína não caracterizada putativa ydbl, pode estar relacionada ao metabolismo de aminas	2	Menos
KPHS_15250	VBIKlePne218548_1485	Proteína phoh induzível por privação de fosfato, atpase prevista	2	Menos
KPHS_02310	VBIKlePne218548_0228	Isocitrato desidrogenase fosfatase (EC 2.7.11.5)/quinase (EC 3.1.3.-)	2	Menos
KPHS_50180	VBIKlePne218548_4903	Oligopeptidase A (EC 3.4.24.70)	2	Menos

Tabela 19 – Transcritos associados ao metabolismo energético de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase exposta a MIC de meropenem

Refseq Locus Tag	Alt Locus Tag	Produto	Variação	Expressão
KPHS_41170	VBIKlePne218548_4019	Óxido nítrico redutase anaeróbica flavorubredoxina	2	Mais
KPHS_19340	VBIKlePne218548_1884	Redutase respiratória anaeróbica chaperona	2	Mais
KPHS_14140	VBIKlePne218548_1374	Acetiltransferase, família GNAT	2	Mais
KPHS_37310	VBIKlePne218548_3636	N-acetiltransferase ElaA	2	Mais
KPHS_38630	VBIKlePne218548_3766	ATP:Cob(I)alamina adenosiltransferase (EC 2.5.1.17) @ ATP:Cob(I)alamina	2	Mais

		adenosiltransferase (EC 2.5.1.17), utilização de etanolamina		
KPHS_10940	VBIKlePne218548_1062	Fosfodiesterase da proteína transportadora de acila (EC 3.1.4.14)	2	Mais
KPHS_25580	VBIKlePne218548_2485	Desidrogenase do álcool (EC 1.1.1.1)	2	Mais
KPHS_09820	VBIKlePne218548_0954	Desidrogenase de succinato- semialdeído [NAD(P)+] (EC 1.2.1.16)	2	Mais
KPHS_21210	VBIKlePne218548_2067	Diidrolase de succinilarginina (EC 3.5.3.23)	2	Mais
KPHS_17980	VBIKlePne218548_1751	Redutase de tiorredoxina (EC 1.8.1.9)	2	Mais
KPHS_24330	VBIKlePne218548_2365	Domínio N da subunidade alfa da NAD(P) transidrogenase (EC 1.6.1.2) / Domínio C da subunidade alfa da NAD(P) transidrogenase (EC 1.6.1.2)	2	Mais
KPHS_04100	VBIKlePne218548_0402	Epimerase de NAD(P)H-hidrato (EC 5.1.99.6) / Desidratase de (S)- NAD(P)H-hidrato dependente de ADP (EC 4.2.1.136)	2	Mais
KPHS_19850	VBIKlePne218548_1935	Desidrogenase de NADH (EC 1.6.99.3)	2	Mais
KPHS_30110	VBIKlePne218548_2933	NADPH:quinona redutase e oxidoredutases dependentes de Zn relacionadas	2	Mais
KPHS_39130	VBIKlePne218548_3817	Proteína de ligação a GTP EngA	2	Mais
KPHS_39620	VBIKlePne218548_3867	Proteína de ligação a GTP Era	2	Mais
KPHS_14160	VBIKlePne218548_1376	Betaína aldeído desidrogenase (EC 1.2.1.8)	2	Mais
KPHS_05390	VBIKlePne218548_0526	Anidrase carbônica, classe beta (EC 4.2.1.1)	2	Mais
KPHS_28430	VBIKlePne218548_2764	Catecol 1,2-dioxigenase (EC 1.13.11.1)	2	Mais
KPHS_05370	VBIKlePne218548_0524	Álcool cinamílico desidrogenase/redutase (EC	2	Mais

		1.1.1.195) @ Álcool desidrogenase (EC 1.1.1.1)		
KPHS_32170	VBIKlePne218548_3135	Subunidade grande da nitrito redutase [NAD(P)H] (EC 1.7.1.4)	2	Mais
KPHS_13600	VBIKlePne218548_1322	Oxidoredutase	2	Mais
KPHS_22330	VBIKlePne218548_2175	Oxidoredutase, família da desidrogenase/redutase de cadeia curta	2	Mais
KPHS_28530	VBIKlePne218548_2774	Cadeia delta da nitrato redutase respiratória (EC 1.7.99.4)	2	Mais
KPHS_45480	VBIKlePne218548_4440	Proteína da família das hidrolases de dienelactona	2	Mais
KPHS_18920	VBIKlePne218548_1843	Gama-glutamyl-aminobutiraldeído desidrogenase (EC 1.2.1.-)	2	Mais
KPHS_24720	VBIKlePne218548_2403	Subunidade alfa da malonato descarboxilase	2	Mais
KPHS_45720	VBIKlePne218548_4464	Esterase YqiA	2	Mais
KPHS_42540	VBIKlePne218548_4154	Siroclorina cobaltoquelatase CbiK (EC 4.99.1.3) @Atividade da ferroquelatase da siroclorina de CbiK (EC 4.99.1.4)	2	Mais
KPHS_18050	VBIKlePne218548_1757	Cadeia A da dimetilsulfóxido redutase anaeróbica (EC 1.8.5.3), domínio de ligação à molibdopterina	2	Menos
KPHS_45390	VBIKlePne218548_4431	SDR da desidrogenase/redutase de cadeia curta?	2	Menos
KPHS_23560	VBIKlePne218548_2289	D-lactato desidrogenase (EC 1.1.1.28)	2	Menos
KPHS_44590	VBIKlePne218548_4356	Proteína YggW semelhante à coproporfirinogênio-III oxidase independente de oxigênio	2	Menos

Tabela 20 – Transcritos associados à produção de metabólitos secundário de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase exposta a MIC de meropenem

<i>Refseq Locus Tag</i>	<i>Alt Locus Tag</i>	<b>Produto</b>	<b>Variação</b>	<b>Expressão</b>
KPHS_41900	VBIKlePne218548_4091	Pecorrina-2 oxidase (EC 1.3.1.76) @ Atividade de siroclorina ferroquelatase de CysG (EC 4.99.1.4) / Uroporfirinogênio-III metiltransferase (EC 2.1.1.107)	2	Mais
KPHS_00770	VBIKlePne218548_0077	1,4-di-hidroxi-2-naftoato polipreniltransferase (EC 2.5.1.74)	2	Mais
KPHS_21620	VBIKlePne218548_2107	Antranilato sintase, componente amidotransferase (EC 4.1.3.27) / Antranilato fosforibosiltransferase (EC 2.4.2.18)	2	Mais
KPHS_49120	VBIKlePne218548_4798	3-desidroquinato sintase (EC 4.2.3.4)	2	Mais
KPHS_00900	VBIKlePne218548_0089	4-carboximuconolactona descarboxilase (EC 4.1.1.44)	2	Mais
KPHS_40760	VBIKlePne218548_3979	Proteína do domínio central da família AhpD do domínio da 4-carboximuconolactona descarboxilase/alquil-hidroperoxidase	2	Mais
KPHS_30990	VBIKlePne218548_3019	4-hidroxi-2-oxovalerato aldolase (EC 4.1.3.39)	2	Mais
KPHS_06260	VBIKlePne218548_0608	4-hidroxifenilacetato 3-monooxygenase (EC 1.14.14.9)	2	Mais
KPHS_07990	VBIKlePne218548_0775	Subunidade pequena da acetolactato sintase (EC 2.2.1.6)	2	Mais
KPHS_52440	VBIKlePne218548_5127	Subunidade pequena da acetolactato sintase (EC 2.2.1.6)	2	Mais
KPHS_01150	VBIKlePne218548_0114	Subunidade pequena da acetolactato sintase (EC 2.2.1.6)	2	Mais
KPHS_15090	VBIKlePne218548_1469	Alfa-ribazol-5'-fosfato fosfatase (EC 3.1.3.73)	2	Mais
KPHS_01470	VBIKlePne218548_0146	Uroporfirinogênio-III sintase (EC 4.2.1.75)	2	Mais
KPHS_02300	VBIKlePne218548_0227	Isocitrato liase (EC 4.1.3.1)	2	Mais
KPHS_37250	VBIKlePne218548_3630	Ácido O-succinilbenzoico--CoA ligase (EC 6.2.1.26)	2	Mais

KPHS_35410	VBIKlePne218548_3450	Fosforribosilformimino-5-aminoimidazol carboxamida ribotídeo isomerase (EC 5.3.1.16)	2	Mais
KPHS_51570	VBIKlePne218548_5042	Provável carboxivinil-carboxifosfonato fosforilmutase (EC 2.7.8.23)	2	Mais
KPHS_31130	VBIKlePne218548_3033	4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase (EC 1.13.11.27)	2	Menos
KPHS_08480	VBIKlePne218548_0822	Espermidina sintase (EC 2.5.1.16)	2	Menos

Tabela 21 – Transcritos associados ao metabolismo de ácidos nucleicos de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase exposta a MIC de meropenem

<i>Refseq Locus Tag</i>	<i>Alt Locus Tag</i>	<b>Produto</b>	<b>Variação</b>	<b>Expressão</b>
KPHS_41810	VBIKlePne218548_4082	5'-nucleotidase SurE (EC 3.1.3.5) @ Exopolifosfatase (EC 3.6.1.11)	2	Mais
KPHS_12940	VBIKlePne218548_1256	5-hidroxiisourato hidrolase (EC 3.5.2.17)	2	Menos
KPHS_22340	VBIKlePne218548_2176	dNTP trifosfohidrolase, ampla especificidade de substrato	2	Menos

Tabela 22 – Transcritos associados às vias metabólicas de vitaminas e minerais de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase exposta a MIC de meropenem

<i>Refseq Locus Tag</i>	<i>Alt Locus Tag</i>	<b>Produto</b>	<b>Variação</b>	<b>Expressão</b>
KPHS_p300670	VBIKlePne218548_5468	Di-hidropteroato sintase tipo 2 (EC 2.5.1.15) @ Proteína de resistência à sulfonamida	2	Mais

KPHS_34670	VBIKlePne218548_3378	Enzima de síntese de yersiniabactina de aquisição de ferro (Irp1, poliquetídeo sintetase) @ Módulos de sintetase de peptídeos não ribossomais da biossíntese de sideróforos	2	Mais
KPHS_46220	VBIKlePne218548_4514	Subunidade pequena do fator de reativação da glicerol desidratase	2	Mais
KPHS_46160	VBIKlePne218548_4508	Subunidade grande do fator de reativação da glicerol desidratase	2	Mais
KPHS_46190	VBIKlePne218548_4511	Subunidade grande da glicerol desidratase (EC 4.2.1.30)	2	Mais
KPHS_49410	VBIKlePne218548_4827	Repressor do regulador de glicerol-3-fosfato glpr	2	Mais
KPHS_51760	VBIKlePne218548_5061	Proteína facilitadora da absorção de glicerol	2	Menos



## ANEXO B – Artigo Técnico

### Transcriptomic Remodeling and Survival Strategies of Extensively Drug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Under Meropenem Pressure

Xhaulla Maria Quariguasi Cunha Fonseca<sup>a,b\*</sup>, Marco Antonio de Freitas Clementino<sup>a\*</sup>, Rafhaella Nogueira Della Guardia Gondim<sup>c</sup>, Luciana França da Silva<sup>c</sup>, Maria Gleiciane da Rocha<sup>e</sup>, Francisco Cleber Silva Ferreira<sup>c</sup>, Ana Karolina Silva dos Santos<sup>a</sup>, Fábio Miyajima<sup>d</sup>, Luzia Gabrielle Zeferino de Castro<sup>d</sup>, Caroline Rebouças Damasceno<sup>d</sup>, Alexandre Havt Bindá<sup>c</sup>, Aldo Ângelo Moreira Lima<sup>a,b</sup>.

<sup>a</sup> *Infectious Diseases Laboratory, Institute of Biomedicine, Department of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, 60430-270, Brazil*

<sup>b</sup> *Medical Science Postgraduation Program, Department of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, 60430-270, Brazil*

<sup>c</sup> *Molecular Toxinology Laboratory, Institute of Biomedicine, Department of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, 60430-270, Brazil*

<sup>d</sup> *Analytical Competence Molecular Epidemiology Laboratory, Oswaldo Cruz Foundation, Fortaleza, 61773-270, Brazil*

<sup>e</sup> *Institute of Biomedicine, Department of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, 60430-270, Brazil*

**\*Corresponding Authors:** X. M. Q. C. Fonseca. Rua Coronel Nunes de Melo, 1315; Rodolfo Teófilo. Fortaleza, Ceará, Brazil; CEP: 60.420-270. E-mail: xhaullafonseca27@gmail.com.

M. A. F. Clementino. Rua Coronel Nunes de Melo, 1315; Rodolfo Teófilo. Fortaleza, Ceará, Brazil; CEP: 60.420-270. E-mail: mclementino@ufc.br.

## Abstract

*Klebsiella pneumoniae* is an opportunistic pathogen of great medical relevance due to its high virulence and resistance to antimicrobials. Carbapenem resistance is mediated by carbapenemases and represents a global clinical challenge due to the limited therapeutic arsenal. Transcriptomic assays can elucidate antimicrobial resistance mechanisms and enables the identification of pharmacological targets in extensively drug-resistant (XDR) *Klebsiella pneumoniae*. This study evaluated the transcriptomic profile of carbapenemase-producing *K. pneumoniae* after exposure to meropenem and assessed its morpho-functional and metabolic pathway modifications in response to antibiotic treatment. The sensitivity of carbapenemase-producing *K. pneumoniae*, isolated from the ICU of the University Hospital Walter Cantídio in Fortaleza, CE, was determined by disk diffusion, broth microdilution, and the automated VITEK-2® method. The strain was exposed to subinhibitory concentrations of meropenem and their bacterial growth curve was determined. Total RNA was extracted from bacteria with and without antibiotic treatment at their growth curve log phase. RNA sequencing (RNA-Seq) was performed on a high-throughput MiSeq platform, and differential expression analysis identified both upregulated and downregulated transcripts. Following exposure to meropenem, *K. pneumoniae* showed increased expression of genes related to the plasma membrane, efflux pumps, and cell wall modifications, as well as genes involved in resistance to polymyxins and changes in energy metabolism, such as glycolysis and fermentation. Furthermore, genes associated with antioxidant systems and oxidative stress response were expressed at elevated levels, indicating a survival mechanism under selective pressure. On the other hand, transcripts associated with protein metabolism and DNA synthesis were downregulated, suggesting global metabolic reprogramming for cell maintenance in hostile environments. Thus, exposure to meropenem induced complex adaptations in *K. pneumoniae*. The results provide valuable insights into the resistance and adaptation mechanisms of this bacterium, highlighting potential targets for new therapeutic strategies.

**Keywords:** Transcripts. Carbapenems. Iron-uptake. Oxidative stress.

## Introduction

*Klebsiella pneumoniae* is an encapsulated, opportunistic bacterium of high medical relevance, frequently associated with severe nosocomial infections, including septicemia (Paczosa; Meccas, 2016; Rodriguez-Medina et al., 2024). Approximately 62% of isolates in intensive care units (ICUs) are Gram-negative, with *K. pneumoniae* being one of the main multidrug-resistant organisms responsible for hospital outbreaks. Its ability to acquire antimicrobial resistance mechanisms makes its control a major clinical challenge. Among the most concerning resistance mechanisms is the production of carbapenemases, which confers resistance to carbapenems—one of the main classes of antimicrobials used to treat infections caused by multidrug-resistant bacteria (Navon-Venezia et al., 2017; Hawkey et al., 2022). Mortality

associated with carbapenemase-producing strains can exceed 50% in hospitals due to the limited therapeutic options and failures in conventional treatments (Prestinaci et al., 2015; Kerneis et al., 2021; Adams et al., 2018).

Among the carbapenems, meropenem stands out as one of the main antimicrobials used in clinical practice, acting by inhibiting bacterial cell wall synthesis through binding to penicillin-binding proteins (PBPs), leading to cell lysis and bacterial death. However, the effectiveness of this drug has been compromised due to the emergence of extensively drug-resistant (XDR) *K. pneumoniae* strains bacteria resistant to almost all classes of antimicrobials, except for one or two last-line therapeutic options (Yang et al., 2021; Dai; Hu, 2022).

Understanding the molecular mechanisms of antibiotic resistance is essential for developing new therapeutic strategies. Transcriptomic studies are valuable tools for elucidating these mechanisms, as they allow a global analysis of gene expression under specific antibacterial stress conditions (Brennan-Krohn et al., 2022; Long et al., 2019), including modifications in metabolic pathways, which play a crucial role in the survival and adaptation of *Klebsiella pneumoniae*, particularly under environmental stress and antimicrobial exposure. Furthermore, morpho-functional changes, such as alterations in cell membrane composition and energy metabolism, can confer antimicrobial resistance by modulating cell permeability and the activity of efflux pumps (Russo; Marr, 2019; Liu et al., 2024a). Therefore, this study aimed to evaluate the transcriptome of *K. pneumoniae* XDR exposed to meropenem. The analysis detailed differential gene expression, identifying genes that are positively and negatively regulated in response to the antimicrobial treatment.

## Materials and methods

### Bacterial strains

The *Klebsiella pneumoniae* strain was isolated from an ICU patient (strain code 202). A previous project collected 258 Gram-negative bacterial (GNB) strains, revealing a high prevalence of resistance to penicillins, cephalosporins, and carbapenems among isolates from patients admitted to the Intensive Care Unit (ICU) of the Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC), Fortaleza, Brazil (408549-2022.0). *Klebsiella pneumoniae* strain isolates were identified using the VITEK® 2 Compact automated system (BioMérieux, France), following the manufacturer's recommendations. Carbapenemase production was confirmed by the Ng-Test Carba 5 test®, following the manufacturer's recommendations. For this study, a *Klebsiella*

*pneumoniae* isolate resistant to at least one antimicrobial agent from  $\beta$ -lactams, fluoroquinolones, aminoglycosides, polymyxins, and/or glycyclcyclines was used. This isolate was classified as extensively drug-resistant (XDR), where XDR isolates were resistant to at least one agent in all tested classes, except for a maximum of two. It was collected from a tracheal aspirate.

#### *Antibacterial agents*

Ciprofloxacin (Medley Farmacêutica, São Paulo, Brazil) was diluted in 0.1M hydrochloric acid, while gentamicin (Medley Farmacêutica, São Paulo, Brazil) and meropenem (Medley Farmacêutica, São Paulo, Brazil) were diluted in sterile deionized water. The **stock solutions** of the antibacterial agents were prepared at the following concentrations: 5,000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  for ciprofloxacin, 50,000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  for gentamicin, and 250,000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  for meropenem. All drugs were prepared according to the CLSI M100 document (CLSI, 2017). The stock solutions of ciprofloxacin, gentamicin, and meropenem were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use.

#### *Antibacterial susceptibility testing*

The *K. pneumoniae* strain was stored in the Biobank of the Federal University of Ceará. It was cultured for 18 hours in LB medium (Sigma-Aldrich, USA) at  $37^{\circ}\text{C}$  and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  in 50% glycerol LB (v/v: 500 $\mu\text{L}$ /500 $\mu\text{L}$ ) and was then used to perform antimicrobial susceptibility testing (AST) using three different techniques: disk diffusion, broth microdilution, and the automated VITEK-2® method.

For the disk diffusion method, the *Klebsiella pneumoniae* strain was diluted in 5 mL of LB medium (Sigma-Aldrich, USA), then 100  $\mu\text{L}$  of the bacterial suspension was transferred to Mueller-Hinton agar plates (KASVI, Brazil) using a Drigalski loop for uniform spreading. Antibiotic-impregnated disks containing ciprofloxacin 5  $\mu\text{g}$ , gentamicin 10  $\mu\text{g}$ , and meropenem 10  $\mu\text{g}$  (Sensidisc DME – Diagnósticos Microbiológicos Especializados) were placed on the inoculum. After 24 hours of incubation at  $37^{\circ}\text{C}$ , inhibition zones formed around the disks were measured, and the results were interpreted according to the manufacturer's guidelines and the CLSI (2017) and BRCast standards.

In addition to the disk diffusion method, susceptibility testing was performed in 96-well microplates using the broth microdilution technique, following the CLSI M100 guidelines (CLSI, 2017). The concentration range tested was 4 to 2048  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  for meropenem, 2 to 1024  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  for ciprofloxacin, and 2 to 1024  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  for gentamicin. A control drug was tested using an *E. coli* ATCC 25922 strain for quality control of the experiment, the meropenem at concentrations ranging from 4 to 0.008  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . The inocula were prepared in 0.9% saline solution and then adjusted to a final concentration of  $5 \times 10^5$  CFU/mL in cation-adjusted Mueller-Hinton broth. The plate was then incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  for 16 to 20 hours. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) reading was performed visually, where the MIC was determined as the concentration capable of inhibiting 100% of growth compared to the control. For the VITEK 2® susceptibility test, a bacterial suspension was prepared in 0.45% sterile saline solution (NaCl), adjusting the optical density to 0.5 on the McFarland scale. After preparing the suspension, the specific VITEK 2® cards were inoculated.

#### *Growth curve of carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae*

The growth curve was plotted to determine the incubation time required to obtain biomass for RNA extraction, which was defined within the exponential growth phase. The

exponential growth phase represents the period of highest metabolic activity of the cell and is, therefore, the ideal stage for using cells in assays. The method used to define the growth curve was liquid culture, with sampling of aliquots over time.

To define the growth curve, the assay was repeated three times. First, a pre-inoculum was prepared: five isolated colonies of *Klebsiella pneumoniae* were cultivated on Mueller-Hinton agar at 37°C for 24 hours, then inoculated into test tubes containing 10 mL of previously autoclaved Mueller-Hinton broth. The pre-inoculum was maintained at 37°C, 180 RPM for 24 hours. After this period, a 100 µL aliquot of 0.5 McFarland inoculum ( $\sim 10^8$  cells) from the pre-inoculum was aseptically inoculated into eight test tubes containing 10 mL of autoclaved Mueller-Hinton broth. At predetermined time intervals of every 2 hours, from 0 to 12 hours, 1 mL aliquots were analyzed using an absorption spectrophotometer to determine the optical density (OD) at 600 nm.

#### *Growth curve of carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae exposed to different concentrations of antibacterials*

To evaluate the response of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* under different antibiotic concentrations, bacterial cultures were prepared in Mueller-Hinton (MH) medium. Initially, 10 mL of MH was added to experimental tubes, while 5 mL was added to control tubes without drug addition. The bacterial inoculum was adjusted to 0.5 on the McFarland scale ( $\sim 10^8$  cells/mL), and 100 µL of the suspension was transferred to each tube.

Bacterial cultures were incubated at 37°C under constant agitation at 180 RPM until they reached an OD<sub>600</sub> between 0.5 and 0.6, indicating the exponential growth phase. At this point, antibiotics were added to the experimental cultures at concentrations corresponding to MIC, 2× MIC, and 4× MIC. The cultures were then re-incubated under the same conditions. Aliquots of 1 mL were collected at 1, 3, and 6-hour intervals, and OD<sub>600</sub> was measured to monitor bacterial growth. The remaining volume was immediately chilled on ice for 30 seconds, followed by centrifugation at 3220 g at 4°C for 15 minutes. The supernatant was discarded, and the cell pellets were stored at -80°C for further RNA extraction.

#### *RNA extraction and rRNA removal*

To isolate high-quality RNA, the bacterial pellet was initially homogenized in TRIzol™, ensuring the inhibition of RNase activity. Homogenization was performed using 1 mL of TRIzol™ per 50–100 mg of sample. After homogenization, the sample was incubated for 5 minutes at room temperature, followed by the addition of 0.2 mL of chloroform per mL of TRIzol™ used. The mixture was vigorously shaken and incubated for 2–3 minutes, allowing phase separation after centrifugation at 12,000 g at 4°C for 15 minutes, resulting in the formation of an upper aqueous phase (containing RNA), an interphase, and a lower organic phase.

The aqueous phase was carefully transferred to a new tube, avoiding contamination from the other phases. To precipitate RNA, 0.5 mL of isopropanol per mL of TRIzol™ was added, followed by a 10-minute incubation and centrifugation at 12,000 g for 10 minutes at 4°C, forming an RNA pellet in a white gel-like form. The RNA pellet was washed with 1 mL of 75% ethanol, followed by centrifugation at 7,500 g for 5 minutes at 4°C. After ethanol removal, the pellet was air-dried for 5–10 minutes, then resuspended in RNase-free water, with heating at 55–60°C for 10–15 minutes to ensure complete solubilization. The RNA quality and concentration were evaluated using spectrophotometry or fluorometry, considering an A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> ratio close to 2 as indicative of high purity.

#### *Sample quality assessment*

After RNA extraction for cDNA library preparation, the Agilent D1000 ScreenTape system, integrated with the 2200 TapeStation instrument, was used to analyze the quality of the extracted RNA. Following the manufacturer's recommendations, Quality assessment was performed to ensure that all samples had an RNA Integrity Number (RIN) equal to or greater than 7. Initially, the equipment was configured using the Agilent TapeStation Controller software, and the necessary devices, including the ScreenTape and reagents, were inserted into the instrument after stabilization at room temperature for 30 minutes.

For RNA sample preparation, 3  $\mu\text{L}$  of Sample Buffer was mixed with 1  $\mu\text{L}$  of previously purified RNA. Quality control of the assay was ensured by including a standard control, prepared by mixing 3  $\mu\text{L}$  of Sample Buffer with 1  $\mu\text{L}$  of the RNA Ladder provided in the kit. The mixtures were homogenized in a shaker at 2000 rpm for 1 minute, followed by brief centrifugation to position the contents at the bottom of the tubes. The prepared samples were then loaded into the D1000 ScreenTape device. The results were generated and analyzed using the Agilent TapeStation Analysis software. The system's sensitivity allowed for RNA detection at concentrations as low as 0.1 ng/ $\mu\text{L}$ , while quantification accuracy was maintained within 10% variation in the specified concentration ranges. All reagents, including the ScreenTape device, were stored at 2–8°C, and strict precautions were followed during sample handling to prevent RNA degradation and avoid contamination.

#### *cDNA library construction and RNA-seq sequencing*

For each experimental condition mRNA enrichment was performed using the MICROBExpress Bacterial mRNA Purification Kit (Ambion), and rRNA removal was conducted using the Ribo-Zero Kit (Epicentre). From this purified and enriched sample, cDNA library was constructed for three biological replicates per condition, and sequencing was carried out using the Illumina HiSeq 2500 platform (Fasteris, Geneva, Switzerland).

To perform the transcriptomic analysis of *Klebsiella pneumoniae* and identify differentially expressed genes (DEGs) under specific conditions, the first step was the pre-processing of RNA-seq data, which involved the removal of low-quality sequences, adapters, and contaminants. Quality control was performed using tools such as FastQC to ensure that the RNA-seq reads were error-free, had good coverage, and high sequence quality. Additionally, sequence alignment was carried out against the reference genome of *Klebsiella pneumoniae* using the BV-BRC system (Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center) (Olson et al., 2023). After alignment, data normalization was applied to correct sequencing depth discrepancies and gene expression variations.

Differential expression analysis was performed using the DESeq2 package. Through this analysis, it was possible to identify genes that exhibited significant expression variations, associating these changes with specific biological processes or phenotypic modifications in *Klebsiella pneumoniae*.

#### *Gene clustering*

Gene clustering was conducted based on functional classification, differential expression levels, and involvement in critical metabolic pathways. Genes were grouped into specific functional categories, including resistance mechanisms (efflux pumps, membrane permeability modifications, enzymatic inactivation of antimicrobials, oxidative stress responses, polysaccharide biosynthesis, biofilm formation, iron acquisition systems, and secondary

metabolism). This manual clustering provided a detailed functional overview, highlighting the most relevant genes and pathways in antimicrobial resistance. The integration of this information allows for the prioritization of targets for therapeutic interventions and the development of strategies to control the spread of resistant *Klebsiella pneumoniae* strains.

#### Statistical analysis

Statistical analyses were conducted using **GraphPad Prism 9** and **R with RStudio (version 4.2.2)**. For the determination of **antimicrobial susceptibility**, **MIC** values were analyzed using **one-way ANOVA**, followed by **Tukey's test**. The **bacterial growth curve** was fitted to a sigmoidal model and analyzed using **repeated measures ANOVA** with **Greenhouse-Geisser correction**. The growth of *Klebsiella pneumoniae* in the presence of **meropenem**, **gentamicin**, and **ciprofloxacin** was evaluated using **two-way factorial ANOVA**, followed by **Sidak's correction**. **Transcriptomic analysis** was conducted using **DESeq2**, considering differentially expressed genes with **log2 fold-change  $\geq 1$  or  $\leq -1$** , corrected by the **Benjamini-Hochberg method**. Images were statistically analyzed as follows: in **growth curves**, **repeated measures ANOVA** with **Bonferroni correction** was applied; in **violin plots**, the **Mann-Whitney U test** was used to compare gene expression between control and treated groups. In the **volcano plot**, gene dispersion analysis was performed using the **Wald test**, with **Bonferroni correction for multiple comparisons**. For all tests, a significance level of  **$p < 0.05$**  was adopted.

## Results

### Antimicrobial susceptibility assay

The minimum inhibitory concentrations (MICs) of meropenem, ciprofloxacin, and gentamicin against *Klebsiella pneumoniae* and the growth control *Escherichia coli* ATCC are described in Table 1. For ciprofloxacin and gentamicin, *Klebsiella pneumoniae* was tested within a concentration range of 2 to 1024  $\mu\text{g/mL}$ , with MIC values of 64  $\mu\text{g/mL}$  for ciprofloxacin and 256  $\mu\text{g/mL}$  for gentamicin. In the case of meropenem, *Klebsiella pneumoniae* was tested at concentrations ranging from 4 to 2048  $\mu\text{g/mL}$ , showing an MIC of 256  $\mu\text{g/mL}$ . As a validation control, the strain *E. coli* ATCC 25922 was included, it was exposed to concentrations ranging from 0.008 to 4  $\mu\text{g/mL}$ , and exhibited a sensitivity profile with an MIC of 0.06  $\mu\text{g/mL}$ , a value consistent with the standards established by CLSI.

The antimicrobial susceptibility results obtained through the VITEK® automated method are described in Table 2. This method was used to confirm strain identification and to assess susceptibility to clinically relevant antibiotics, both individually and in combination. The

strain exhibited resistance to most tested antimicrobials, showing susceptibility only to the combination of Ceftazidime/Avibactam, with an MIC of 1 µg/mL. For meropenem, the strain showed resistance with an MIC of  $\geq 16$  µg/mL. Based on the susceptibility data obtained from the tested methods, the strain was classified as XDR (Extensively Drug-Resistant).

#### *Growth curve of carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae*

The growth curve of *Klebsiella pneumoniae* is presented in Figure 1. The curve follows a sigmoidal pattern, which can be divided into three distinct phases. The lag phase, between 0 and 1 hour, is characterized by the absence of significant growth, with OD600 values close to zero. At this stage, the cells were adapting to the culture medium, synthesizing enzymes, and adjusting to the conditions to initiate cell division.

From 1 hour onward, the exponential phase begins, extending until approximately 5 to 6 hours. During this stage, a rapid increase in optical density is observed, reaching values above 0.4. Around 5-6 hours, the stationary phase begins and continues until approximately 12 hours. In this phase, growth progressively slows down and reaches a plateau, with OD600 values stabilizing around 0.6 to 0.65.

#### *Growth curve of carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae exposed to different concentrations of antibacterials*

The Growth curve of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* exposed to different concentrations of antibacterials is presented in Figure 2. For meropenem, it was observed that over time, even at the highest concentrations (2×MIC and 4×MIC), bacterial growth was significantly stimulated ( $p < 0.05$ ), increasing OD over 6 hours. However, at MIC concentration, bacterial growth exceeded control values after 6 hours of exposure. This behavior suggests that *K. pneumoniae* may adapt to concentrations equal to or higher than MIC, requiring concentrations above 4×MIC to achieve a bactericidal effect against *K. pneumoniae* (Figure 2A).

Figure 2B, related to gentamicin, reveals a different pattern. The MIC concentration has a greater impact on bacterial growth compared to 2×MIC and 4×MIC, which show a less pronounced reduction in optical density (OD600). However, even at these higher concentrations, bacterial growth is still visible, suggesting that the bacterium has some intrinsic or adaptive resistance to the antimicrobial, requiring higher concentrations for effective control.



Finally, Figure 2C, which evaluates the exposure of *K. pneumoniae* to ciprofloxacin, shows a distinct behavior from the other two antimicrobials, with minimal stimulation of bacterial growth compared to the other tested antimicrobials. However, at the MIC concentration, there is a peak in optical density at 2 hours, followed by a sharp decline, indicating that the antimicrobial initially exerts a rapid stimulatory effect, but this effect is later reversed. The 2×MIC and 4×MIC concentrations keep bacterial optical densities consistently low over time, showing a significant inhibitory effect ( $p < 0.05$ ) on growth.

#### *Transcripts of carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae after exposure to Meropenem*

Regarding the transcripts of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* after meropenem exposure, Figure 3 presents a violin plot displaying gene expression across various modified metabolic categories. Overall, the data indicate that most of the bacterium's fundamental signaling processes remain stable, suggesting metabolic robustness under meropenem pressure. This stability is evident in categories such as carbohydrate, amino acid, lipid, and energy metabolism, which are essential for cell survival.

The graphs presented in Figure 4 illustrated the gene expression analysis across various functional categories, comparing the standard strain condition and meropenem exposure. Genes related to metabolism (801 genes analyzed) exhibited a broad and consistent distribution across conditions, indicating that meropenem exposure sustained general metabolic pathways. Similarly, categories such as cellular processes (91 genes), protein processing (195 genes), and membrane transport (147 genes) maintained similar expression patterns, suggesting that these fundamental functions were not directly affected by antimicrobial exposure.

The stress response, defense, and virulence category (177 genes) showed a significant difference ( $p < 0.05$ ), indicating a possible induction of genes related to defense mechanisms or cellular adaptation in response to meropenem exposure. Thus, the data suggest that although most cellular functions remain unchanged between control and meropenem exposure, there is an activation of genes associated with defense and virulence, which may indicate an adaptive response to the antimicrobial. These observations highlight an overall stability of cellular processes, with localized responses to external stimuli in the stress and defense category.

#### *Genes upregulated by Meropenem exposure*

Two LysR-type regulators—KPHS\_00530 and KPHS\_27080—were among the most strongly induced, pointing to a coordinated reprogramming of metabolic pathways. KPHS\_45670, encoding the QseB response regulator of a two-component system, was likewise up-regulated, consistent with the need for rapid signal transduction under antibiotic pressure. Multiple transporters essential for survival in hostile conditions showed higher expression. KPHS\_05350 encodes a glycerol-3-phosphate permease, whereas KPHS\_05330 specifies an ABC transporter that imports maltose, nitrate, and iron. KPHS\_16010, a molybdenum transporter, was also induced—reflecting the demand for this cofactor by molybdo-enzymes activated during stress.

Genes tied to anaerobic respiration were also up regulated. KPHS\_28530 is part of the nitrate-reduction chain, and KPHS\_41170 encodes nitric-oxide reductase, completing denitrification when oxygen is scarce. Furthermore, genes responsible for cell-wall remodeling and genome plasticity were also upregulated. KPHS\_39210, encoding a penicillin-insensitive transglycosylase (Fig. 5), and KPHS\_51150, a rhodanese-related sulfotransferase, were up-regulated, suggesting adjustments to peptidoglycan synthesis and redox balance. The transposase genes KPHS\_03530 and KPHS\_50590 showed increased expression, hinting at mobilization of genetic elements that could disseminate resistance determinants. KPHS\_00070 (D-ribose pyranase; Fig. 5) rose significantly ( $p < 0.05$ ), indicating enhanced carbohydrate catabolism. KPHS\_46990 (UPF0306 protein YhbP) and KPHS\_47870 (septum-formation protein Maf) were also induced, implying roles in structural maintenance and cell division under stress.

Several hypothetical genes—e.g., KPHS\_21930, KPHS\_30290, KPHS\_39420—were significantly up-regulated ( $p < 0.05$ ). Although their functions remain unknown, they may constitute novel components of the meropenem stress response. Collectively, these data reveal a multilayered transcriptional programme encompassing signal transduction, nutrient acquisition, energy metabolism, cell-wall biogenesis, and genome dynamics, underscoring the capacity of *Klebsiella pneumoniae* to adapt rapidly to meropenem challenge.

#### *Genes downregulated by Meropenem exposure*

The most transcripts downregulated belong to pathways that become dispensable—or even detrimental—under drug pressure, namely secretion-system biogenesis, central metabolism, and aerobic respiration.

Virulence and gene transfer transcripts were down regulated. KPHS\_34850, encoding the VirB11 ATPase that energizes type IV secretion, was markedly repressed. A diminished VirB11 pool is expected to curtail conjugative DNA transfer, thereby restraining the dissemination of resistance and virulence determinants—a strategic trade-off under stress.

KPHS\_31130 (4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase, tyrosine catabolism) and KPHS\_30580 (cytochrome c biogenesis) both declined, consistent with a metabolic realignment that favours energy conservation over biosynthetic breadth. In the same vein, KPHS\_18050, coding for anaerobic dimethyl-sulfoxide reductase, was silenced, suggesting that alternative electron-acceptor pathways are down-prioritized once meropenem stalls growth. Furthermore, KPHS\_30970 (multicopper polyphenol oxidase) and KPHS\_45390 (short-chain

dehydrogenase/reductase) showed reduced expression, implying deliberate suppression of redox-active enzymes that might otherwise amplify antibiotic-induced oxidative damage.

Several hypothetical or poorly annotated genes—KPHS\_13360, KPHS\_02850, KPHS\_31530 and KPHS\_36920 (UPF0118 family membrane protein)—were also down-regulated ( $p < 0.05$ ; Fig. 5). Although their functions remain undefined, their concerted repression hints at roles in membrane architecture or metabolite transport that become non-essential—or energetically costly—during meropenem challenge. Taken together, the down-regulated gene set paints a picture of *K. pneumoniae* throttling back energy-intensive functions, horizontal gene transfer, and certain redox processes to prioritize core survival pathways when confronted with meropenem.

## Discussion

Antimicrobial Resistance and Growth Curve Analysis of *Klebsiella pneumoniae* Exposed to Meropenem, Ciprofloxacin, and Gentamicin showed that the antimicrobial resistance of *Klebsiella pneumoniae* represents a growing challenge in nosocomial environments, especially due to its ability to acquire resistance mechanisms that limit therapeutic options (Prestinaci et al., 2015). Among the antibiotics frequently used in the treatment of infections caused by this bacterium, gentamicin, ciprofloxacin, and meropenem stand out. In the present study, these three antimicrobials were selected to evaluate the resistance of the *K. pneumoniae* strain due to their widespread clinical use and the need to understand their effectiveness against multidrug-resistant strains. For this purpose, susceptibility assays were performed using three different methods.

In the present study, the MIC values obtained were  $\geq 16$   $\mu\text{g/mL}$  for meropenem,  $\geq 4$   $\mu\text{g/mL}$  for ciprofloxacin, and  $\geq 16$   $\mu\text{g/mL}$  for gentamicin, classifying the strain as resistant to all tested antibiotics. According to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2017), the resistance breakpoints for *K. pneumoniae* are  $\geq 4$   $\mu\text{g/mL}$  for meropenem,  $\geq 1$   $\mu\text{g/mL}$  for ciprofloxacin, and  $\geq 8$   $\mu\text{g/mL}$  for gentamicin. The Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (BRcast, 2024) establishes resistance breakpoints of  $\geq 8$   $\mu\text{g/mL}$  for meropenem,  $\geq 1$   $\mu\text{g/mL}$  for ciprofloxacin, and  $\geq 4$   $\mu\text{g/mL}$  for gentamicin. Comparing the values obtained with these standards, the MIC of the studied strain exceeds the defined breakpoints in both guidelines, confirming a highly resistant phenotype.

The analyzed strain was classified as XDR (extensively drug-resistant), a concerning condition that significantly reduces the available therapeutic options. XDR gram-negative resistance is associated with high mortality rates, especially in immunocompromised patients or those in intensive care units (Li et al., 2024). The study by Elkady et al. (2024) identified MIC values for meropenem ranging between 8 and 32  $\mu\text{g/mL}$  in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*, confirming the dissemination of genetic resistance mechanisms among these strains. Comparing these results with those of the present study, in which the MIC for meropenem was  $\geq 16$   $\mu\text{g/mL}$ , it is observed that the reported value aligns with the range described by Elkady et al. (2024), reinforcing the severity of carbapenem resistance in different clinical contexts. Based on the susceptibility data and MIC determination, the growth curve of carbapenemase-producing *K. pneumoniae* was analyzed to recognize the log phase and perform a comparative assessment of the strain's growth curve after exposure to selected antibacterial agents.

Meropenem significantly impacted the growth rate of carbapenemase-producing *K. pneumoniae*. In the conducted assays, the growth curve showed an extended lag phase, suggesting that the bacterium required a longer adaptation period when exposed to the antibiotic. This effect may be related to the induction of resistance mechanisms, such as the overproduction of efflux

pumps or modulation of membrane porin expression, strategies previously described for carbapenem-resistant *K. pneumoniae* (Elkady et al., 2024; Yao et al., 2023). During the exponential phase, a reduced growth rate was observed, indicating that despite resistance, meropenem still exerts an inhibitory effect on the bacterium. This phenomenon may be associated with the metabolic cost of resistance, as the production of carbapenemases and the activation of adaptation mechanisms can compromise bacterial metabolic efficiency (Li et al., 2024; Li et al., 2024b; Marzouk et al., 2024). However, upon reaching the stationary phase, the cell density was comparable to that of cultures not exposed to the antibiotic, demonstrating that the bacterium can circumvent the effect of meropenem and maintain long-term viability. This behavior is concerning from a clinical perspective, as it suggests that even in the presence of a carbapenem, the bacterium can persist in the host and promote the development of chronic infections or relapses (Kerneis et al., 2021; Mehrota et al., 2023). Given this behavior, meropenem was chosen as the target drug for subsequent tests, where the transcriptome of this strain was evaluated after exposure to MIC concentrations of meropenem.

Gene expression analysis demonstrated an increase in the expression of genes associated with energy metabolism and oxidative stress response after exposure to meropenem. Among the highly expressed genes, those related to amino acid biosynthesis and carbohydrate metabolism regulation stood out, a pattern also identified by Liu et al. (2024a) and Wright et al. (2014). Specifically, the *soxS* (KPHS\_17670) gene was highly expressed, indicating activation of the SoxRS pathway, which is directly involved in protection against oxidative damage. This finding aligns with Cain et al. (2018), who demonstrated that adaptation to antibiotics often involves detoxification mechanisms to minimize DNA and membrane damage.

The transcriptomic analysis revealed that exposure to meropenem induced the overexpression of genes associated with nutrient transport, particularly ABC-type transporters involved in the uptake of compounds such as maltose, nitrate, and iron, notably the KPHS\_05330 gene. This finding indicates a metabolic reprogramming aimed at maintaining cellular viability under stress conditions, favoring bacterial adaptation through enhanced acquisition of essential micronutrients. The study by Polani et al. (2025) supports this observation by demonstrating that the presence of the plasmid-borne ferric citrate transport system (*fecABCDE*) in *K. pneumoniae* contributes to increased resistance to cefiderocol by repressing the expression of endogenous siderophore receptors and promoting an alternative iron uptake pathway. These data converge toward the understanding that modulation of iron acquisition, whether through endogenous or plasmid-mediated mechanisms, is a key determinant in the bacterial adaptive response. It is also noteworthy that therapeutic strategies combining carbapenems with iron chelators have been explored as alternatives against XDR strains, aiming to limit iron availability and impair bacterial metabolism. However, the data obtained in this study indicate that *K. pneumoniae* may activate compensatory iron transport pathways under antimicrobial stress, potentially undermining the efficacy of such therapeutic combinations. Therefore, a detailed understanding of iron uptake and regulatory mechanisms provides valuable insights for the development of new approaches against multidrug-resistant isolates. Additionally, the *katG* (KPHS\_09820) gene, encoding catalase, also showed positive regulation, confirming the activation of antioxidant mechanisms to counteract meropenem-induced stress (Sundaresan et al., 2024).

This integrative phenotypic-transcriptomic approach exposes the molecular playbook that an XDR *K. pneumoniae* deploys to survive carbapenem assault. This study uncovered a shift toward (i) enhanced micronutrient acquisition (iron, molybdenum, nitrate), (ii) redox-stress mitigation (SoxRS, KatG), and (iii) energy-sparing down-regulation of high-cost functions such

as type IV secretion. These pathways supply a shortlist of drug-gable nodes—ABC transporters, alternative respiratory enzymes, and oxidative-stress regulators—that can be probed in future screens for adjuvant compounds or targeted gene knock-downs. Moreover, the growth-phase-specific transcriptional signatures provide a roadmap for timing therapeutic interventions to catch the bacterium at its most vulnerable metabolic state. Taken together, our findings not only clarify why current carbapenem monotherapy falters but also chart a rational path toward combination regimens and novel inhibitors designed to disarm the very circuits that prop up extreme drug resistance.

#### Conflicts of interest

The author(s) declare that there are no conflicts of interest.

#### Acknowledgement

This work was supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq; Brazil; Grants 408549-2022.0) and CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel; Brazil).

#### Declaration of interest statement

We declare there is no conflict of interest and agree with the disclosure of the results.

#### References

ADAMS, S.; GAYOSO, A.; RILEY, L. W. Stress-Adaptive Responses Associated with High-Level Carbapenem Resistance in KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Pathogens*, v. 3028290, p. 1–11, 2018.

BRAZILIAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING - BrCAST (BrCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and halo diameters, 2024.

BRENNAN-KROHN, T.; GROTE, A.; RODRIGUEZ, S. Transcriptomics reveals how minocycline-colistin synergy overcomes antibiotic resistance in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 66, e0196921, 2022.

CAIN, A. K.; HALL, A.; WRIGHT, R.; TAYLOR, P.; WILLIAMS, P.; CROOK, D. W.; PAUL, J.; LEWIS, R. J.; WREN, B. W. Adaptive responses of *Klebsiella pneumoniae* to antimicrobial stress. *Microbial Genomics*, v. 4, n. 6, p. e000210, 2018.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 30th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute ,2017.

- 486 DAI, P.; HU, D. The making of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Clinical*  
487 *Laboratory Analysis*, v. 36, e24743, 2022.
- 488 ELKADY, F. M.; MOHAMED, A. A.; HASSAN, R. S.; EL-SAYED, N. M. Genetic Insights on  
489 Meropenem Resistance Concerning *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates. *Life*, v. 14, p. 1408,  
490 2024.
- 491 HAWKEY, J.; COTTINGHAM, H.; TOKOLYI, A., et al. Linear plasmids in *Klebsiella* and other  
492 *Enterobacteriaceae*. *Microbial Genomics*, v. 8, p. 000807, 2022.
- 493 KERNEIS, S.; LUCET, J. C.; SANTORO, A.; MESCHIARI, M. Individual and collective impact  
494 of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *K. pneumoniae* in patients admitted to  
495 the ICU. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 76, suppl. 1, p. i19–i26, 2021.
- 496 KERNEIS, S.; MICHAUD, A.; LECOQ, L.; ARLET, G.; DRUELLE, V.; ALLAVENA, C.;  
497 JACOB, L.; CAVAILLON, J. M.; PAPIOT, Q.; BRUN-BUISSON, C.; PEAN, Y. Individual and  
498 collective impact of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *K. pneumoniae* in  
499 patients admitted to the ICU. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 76, p. i19–i26, 2021.
- 500 LI, D.; WANG, Y.; LIU, X.; SONG, J.; ZHAO, J.; YAN, X.; FENG, Y. Monotherapy vs  
501 combination therapy in patients with *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection: A systematic  
502 review and meta-analysis. *Journal of Infection and Chemotherapy*, v. 30, p. 372–378, 2024.
- 503 LIU, M.; WU, J.; ZHAO, J., et al. Global epidemiology and genetic diversity of *mcr*-positive  
504 *Klebsiella pneumoniae*: A systematic review and genomic analysis. *Environmental Research*, v.  
505 259, p. 119516, 2024a.
- 506 LIU, Y.; MA, X.; WANG, R.; SHI, X.; WU, H.; ZHANG, X. Mechanisms of resistance and  
507 metabolic adaptations in *Klebsiella pneumoniae* under carbapenem stress conditions. *Frontiers in*  
508 *Microbiology*, v. 15, p. 10762, 2024b.
- 509 LONG, D.; ZHU, L.; DU, F., et al. Phenotypical profile and global transcriptomic profile of  
510 hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* due to carbapenemase-encoding plasmid acquisition. *BMC*  
511 *Genomics*, v. 20, p. 480, 2019.

- MARZOUK, A.; LI, D.; SHEHTAR, S. R.; WANG, J.; FAN, X. *Klebsiella pneumoniae* resistance evolution under meropenem pressure: Genomic and metabolic adaptations. *Frontiers in Microbiology*, v. 15, p. 12560, 2024.
- MEHROTA, S.; FAN, X.; LI, P.; WANG, Y.; LI, X. *Klebsiella pneumoniae* adaptive mechanisms under antimicrobial stress: A transcriptomic approach. *Microbial Pathogenesis*, v. 183, p. 105174, 2023.
- NAVON-VENEZIA, S.; KONDRATYEVA, K.; CARATTOLI, A. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 41, p. 252-275, 2017.
- OLSON, R. D. et al. Introducing the Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center (BV-BRC): a resource combining PATRIC, IRD and ViPR. *Nucleic Acids Research*, [S.l.], v. 51, n. D1, p. D678–D689, 6 jan. 2023. DOI: 10.1093/nar/gkac1003.
- PACZOSA, M. K.; MECSAS, J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 80, n. 3, p. 629-661, 2016.
- POLANI, R.; DE FRANCESCO, A.; TOMOLILLO, D.; ARTUSO, I.; EQUESTRE, M. et al. (2025). Cefiderocol resistance conferred by plasmid-located ferric citrate transport system in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Emerging Infectious Diseases*, 31(1), 123–124. <https://doi.org/10.3201/eid3101.241426>.
- PRESTINACI, F.; PEZZOTTI, P.; PANTOSTI, A. Antimicrobial resistance: A global multifaceted phenomenon. *Pathogens and Global Health*, v. 109, n. 7, p. 309-315, 2015.
- RODRIGUEZ-MEDINA, N.; RODRIGUEZ-SANTIAGO, J.; ALVARADO-DELGADO, A.; SAGAL-PRADO, A.; SILVA-SÁNCHEZ, J., et al. Comprehensive study reveals phenotypic heterogeneity in *Klebsiella pneumoniae* species complex isolates. *Scientific Reports*, v. 14, p. 5876, 2024.
- RUSSO, T. A.; MARR, C. M. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 32, e00001-19, 2019.

- 538 SUNDARASEN, R.; RAJASEKAR, K.; WU, X.; CHEN, Y.; TAN, H.; LIM, C. J.; WONG, S.  
539 Transcriptomic adaptations of *Klebsiella pneumoniae* to  $\beta$ -lactam antibiotics. *Microbial*  
540 *Pathogenesis*, v. 183, p. 105164, 2024.
- 541 WRIGHT, M. S.; RIOS, R.; JACOBS, M. R.; BOYCE, T. G.; BORDENSTEIN, S. R.; REVEZ,  
542 J.; MARCONI, R. T.; BARTON, J. Genomic determinants of *Klebsiella pneumoniae* carbapenem  
543 resistance and virulence. *mBio*, v. 5, n. 6, p. e01675-14, 2014.
- 544 YANG, X.; DONG, N.; CHAN, E. W.; ZHANG, R.; CHEN, S. Carbapenem Resistance-Encoding  
545 and Virulence-Encoding Conjugative Plasmids in *Klebsiella pneumoniae*. *Trends in Microbiology*,  
546 v. 28, n. 1, p. 19-28, 2021.
- 547 YAO, X.; FAN, X.; WANG, J.; WANG, Y.; CHEN, Z.; ZHANG, Y. The role of efflux pumps and  
548 metabolic reprogramming in *Klebsiella pneumoniae* under antimicrobial stress. *Frontiers in*  
549 *Microbiology*, v. 14, p. 12594, 2023.



**Table 1.** Minimum Inhibitory Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ ) of Meropenem, Ciprofloxacin and Gentamicin against carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*.

Species	Ciprofloxacin	Gentamicin	Meropenem
<i>Klebsiella pneumoniae</i>			
Range ( $\mu\text{g/mL}$ )	2- 1024	2- 1024	4- 2048
MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )	64	256	256
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922			
Range ( $\mu\text{g/mL}$ )	-	-	0.008 - 4
MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )	-	-	0.06

MIC: Minimum Inhibitory Concentration; ATCC: American Type Culture Collection.

554 **Table 2.** Minimum Inhibitory Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ ) of different antimicrobials by automated  
 555 VITEK® method

Antibiotic	MIC	Interpretation
Amoxicilin/clavulanic acid		
Urine	$\geq 32$	R
Other	$\geq 32$	R
Piperacillin/Tazobactam	$\geq 128$	R
Cefuroxime	$\geq 64$	R
Cefuroxime Axetil	$\geq 64$	R
Ceftazidime	32	R
Ceftriaxone		
Meningitis	$\geq 64$	R
Other	$\geq 64$	R
Ceftazidime/Avibactam	1	S
Ceftolozane/Tazobactam	$\geq 32$	R
Cefepime	$\geq 32$	R
Aztreonam	$\geq 64$	R
Ertapenem	$\geq 8$	R
Meropenem		
Meningitis	$\geq 16$	R
Other	$\geq 16$	R
Amikacin	32	R
Gentamicin	$\geq 16$	R
Ciprofloxacin	$\geq 4$	R
Tigecycline	1	R

556 MIC: Minimum Inhibitory Concentration; R: Resistant; S: Sensitive

## Figure legends

**Figure 1.** Growth curve of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* over 12 hours. The optical density at 600 nm (OD600) was measured at different time points to assess bacterial growth dynamics. The curve represents the mean and standard deviation, showing an initial lag phase, followed by an exponential growth phase, and reaching a plateau after approximately 10 hours, indicating bacterial adaptation and stabilization in the culture medium.

**Figure 2.** Growth curve of *Klebsiella pneumoniae* after exposure to different concentrations of meropenem, gentamicin, and ciprofloxacin. The optical density at 600 nm (OD600) was measured at different time points (0, 2, 4, and 6 hours) to evaluate bacterial growth under antimicrobial stress. A: OD600 bacterial exposed to meropenem (256 to 1024 µg/ml); B: OD600 bacterial exposed to gentamicin (256 to 1024 µg/ml); C: OD600 bacterial exposed to ciprofloxacin (64 to 256 µg/ml). MER: Meropenem. GEN: Gentamicin. CIP: Ciprofloxacin. \* Represents statistically significant differences ( $P < 0.05$ ) between the absorbance values of cells exposed to drugs, when compared to the drug-free growth.

**Figure 3.** Gene expression in different metabolic pathways in *Klebsiella pneumoniae* after exposure to Meropenem, represented by violin plots. **12 genes** belonging to **carbohydrate metabolism, amino acid metabolism, lipid metabolism, and energy metabolism** showed significantly different expression levels between the conditions ( $p < 0.05$ ). The plots illustrate the distribution of gene expression levels (TPM) across various metabolic categories, comparing **control without exposition** (red) and **exposition to meropenem** (blue) conditions. Each violin represents the density of genes at different expression levels, with the white box inside indicating the interquartile range and the median.

**Figure 4.** Analysis of gene expression in *Klebsiella pneumoniae* under exposure to the MIC of Meropenem, represented by violin plots. **12 genes** belong to **metabolism, membrane transport, energy production, and stress response** showed significantly different expression levels between the conditions ( $p < 0.05$ ). The plots illustrate the distribution of gene expression levels (TPM) across various metabolic categories, comparing **control without exposition** (red) and **exposition to meropenem** (blue) conditions. Each violin represents the density of genes at various expression levels within a category. The white box inside each violin indicates the interquartile range, with the median marked.

**Figure 5.** Analysis of gene expression in *Klebsiella pneumoniae* under exposure to the MIC of Meropenem, expressed by a volcano plot. Eight genes significantly upregulated ( $p < 0.05$ ) are shown on the right (red), while significantly four downregulated genes ( $p < 0.05$ ) are on the left (blue). Non-significant genes are clustered near the center (gray). a: ribosome-associated inhibitor A; b: hypothetical protein; c: Putative transposase InsK for insertion sequence element IS150; d: D-ribose pyranase; e: penicillin-insensitive transglycosylase; f: Septum formation protein Maf; g: hypothetical protein; h: UPF0306 protein YhbP; i: hypothetical protein; j: Uncharacterized UPF0118 membrane protein; k: hypothetical protein; l: hypothetical protein. The plot displays the distribution of differentially expressed genes, with the x-axis representing the  $\log_2$  fold change (upregulated and downregulated genes) and the y-axis showing the  $-\log_{10}$  p-value, indicating statistical significance. Software: R® (4.2.2).

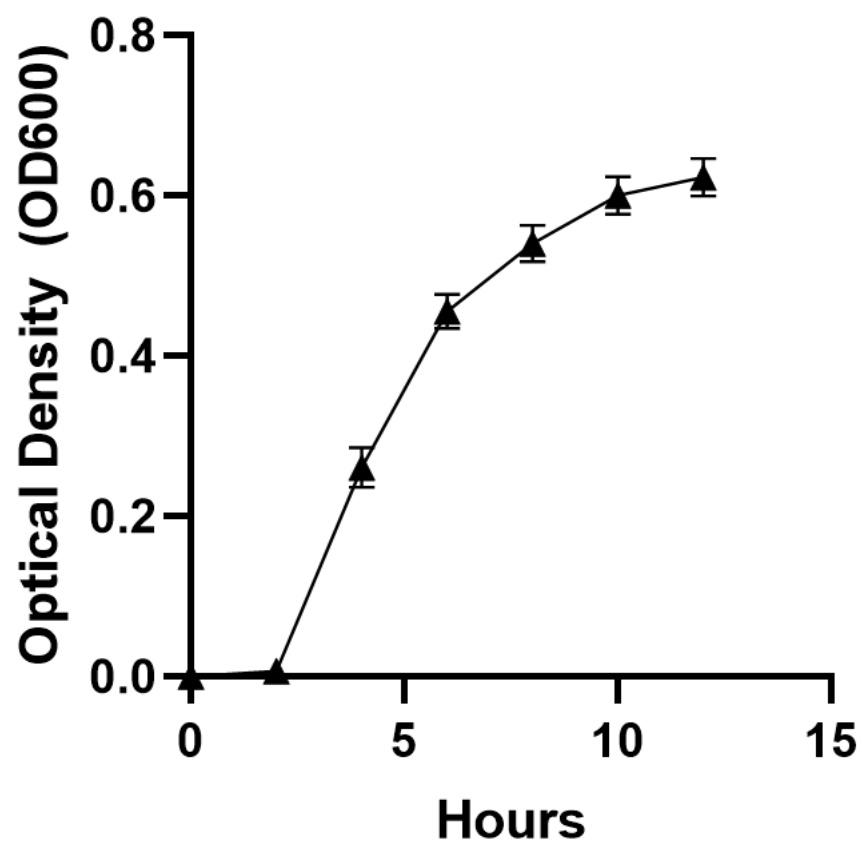
**Figure 1**

Figure 2

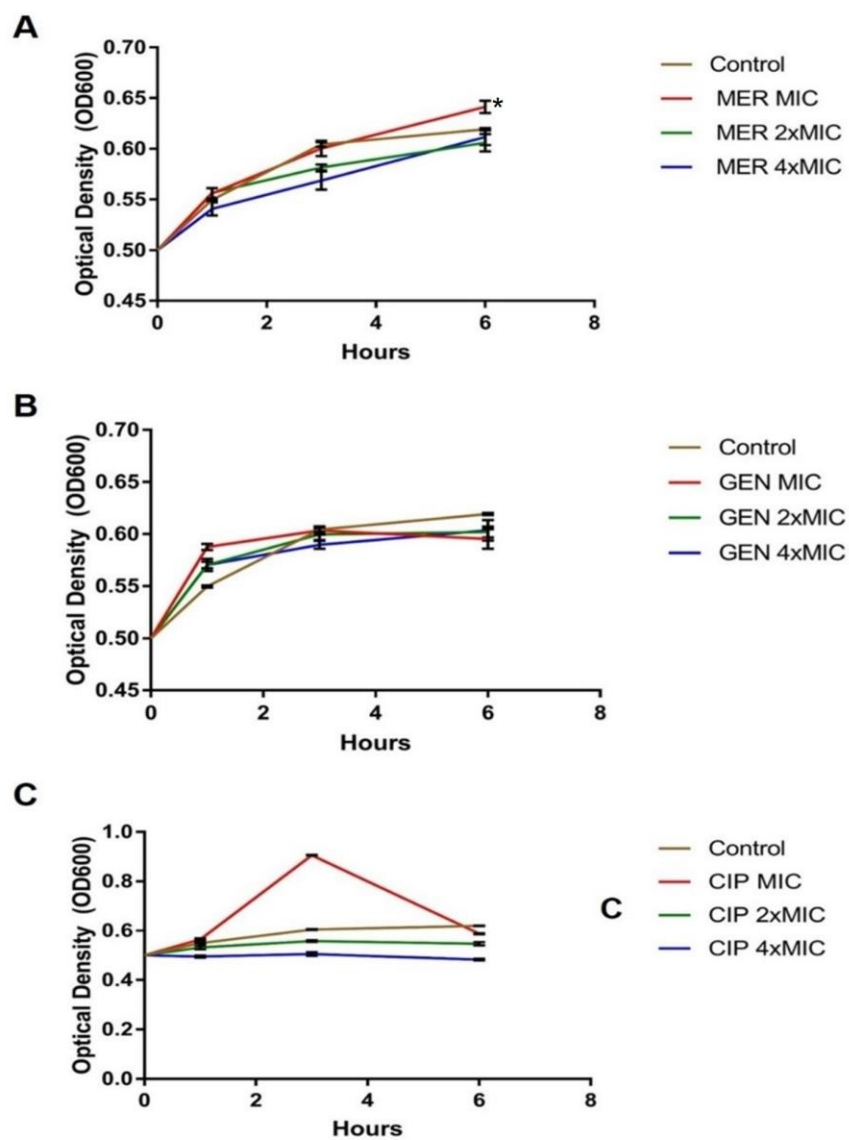


Figure 3

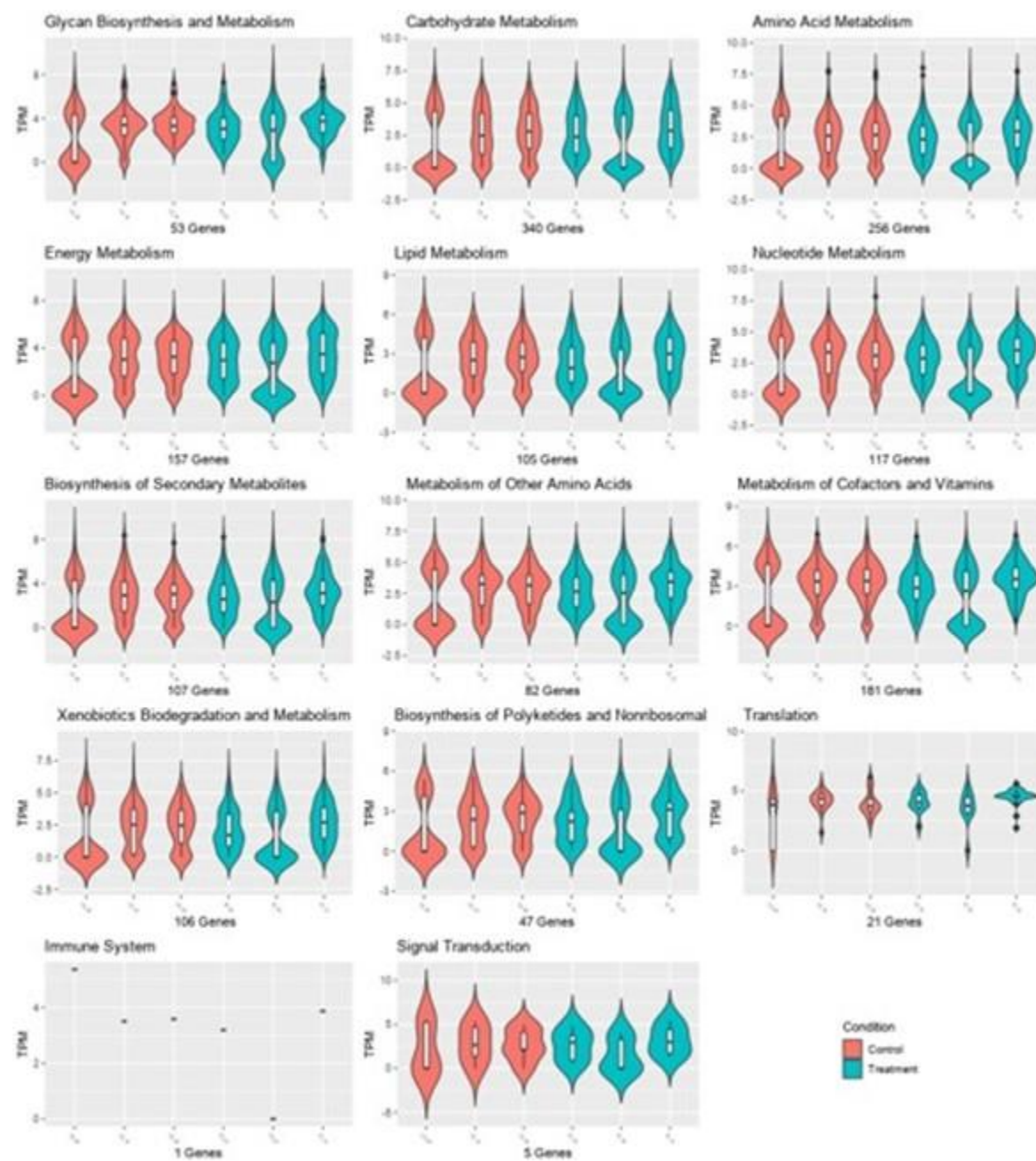


Figure 4

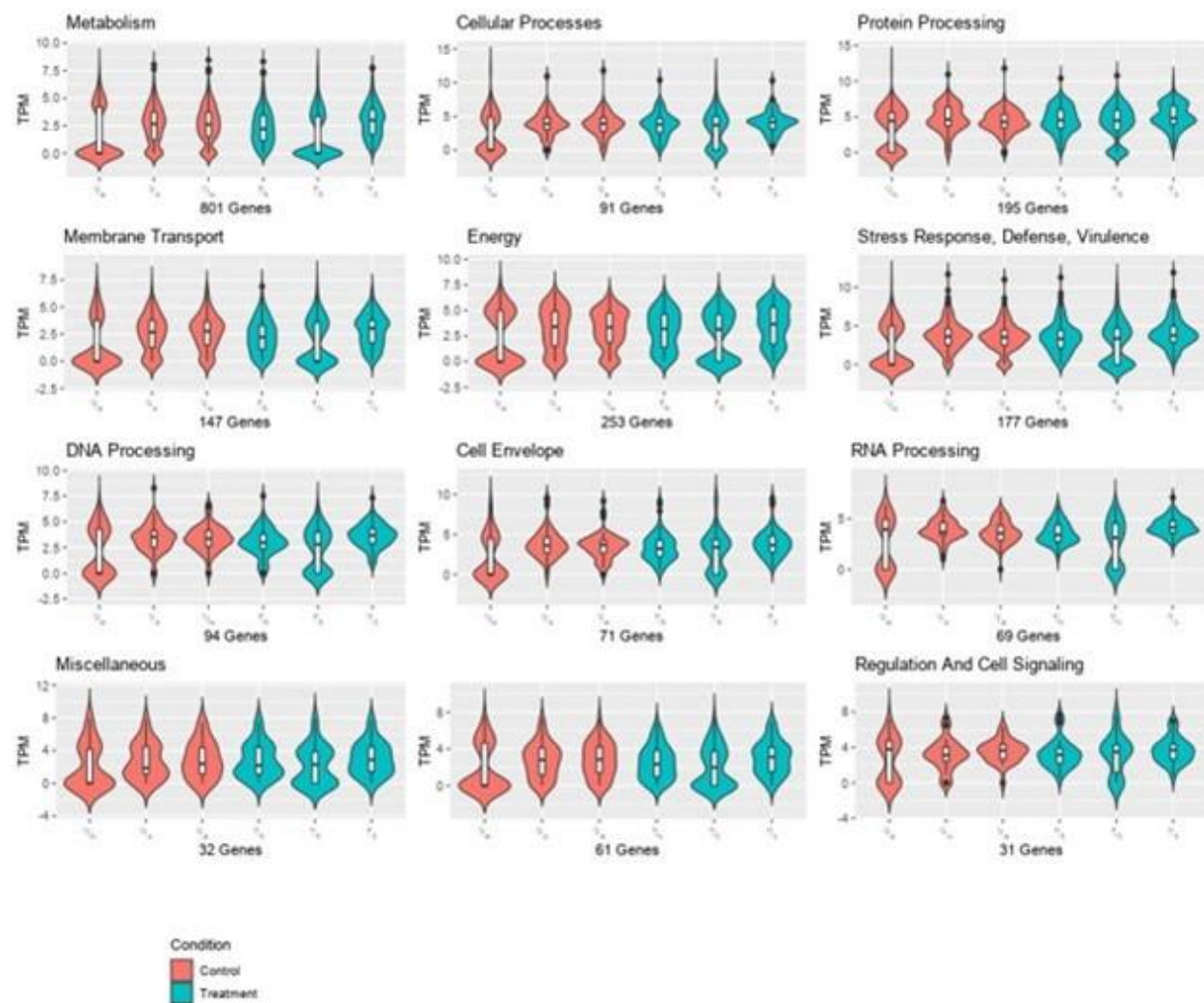
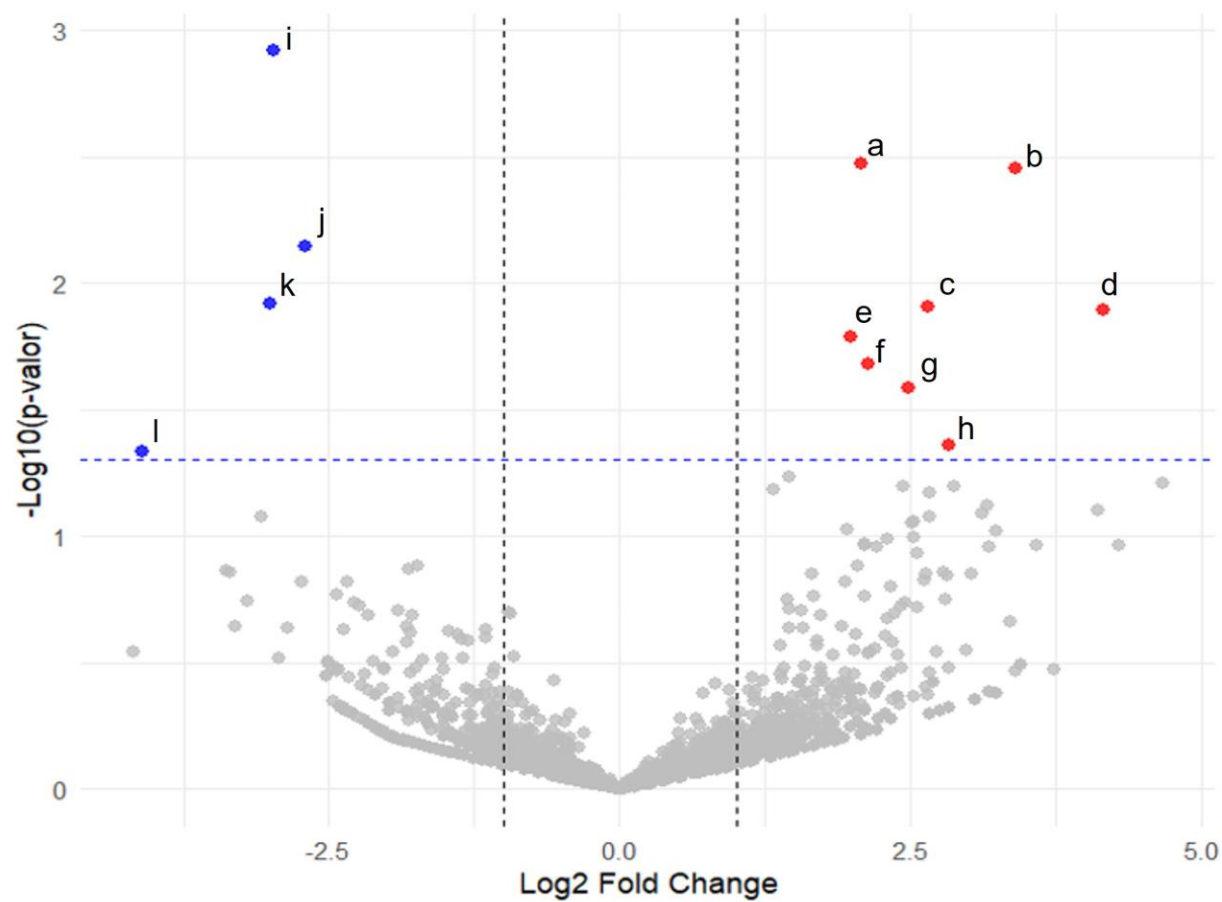




Figure 5



## ANEXO C – Artigo Técnico

The Journal of Nutrition 154 (2024) 1232–1251



# JN THE JOURNAL OF NUTRITION

journal homepage: <https://jn.nutrition.org/>

Nutrition and Disease

## A New Murine Undernutrition Model Based on Complementary Feeding of Undernourished Children Causes Damage to the Morphofunctional Intestinal Epithelium Barrier



Samilly A Ribeiro<sup>1,\*</sup>, Enock LR Braga<sup>1</sup>, Marcus L Queiroga<sup>1</sup>, Marco A Clementino<sup>1</sup>, Xhaulla MQC Fonseca<sup>1</sup>, Mônica O Belém<sup>1</sup>, Lyvia MVC Magalhães<sup>1</sup>, José K de Sousa<sup>1</sup>, Thiago M de Freitas<sup>1</sup>, Herlice N Veras<sup>1</sup>, Cristiane C de Aquino<sup>1</sup>, Alan DC Santos<sup>3</sup>, Flávio RM de Moura<sup>3</sup>, Armênio A dos Santos<sup>1</sup>, Alexandre Havt<sup>1</sup>, Bruna LL Maciel<sup>2</sup>, Aldo AM Lima<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil; <sup>2</sup> Nutrition Postgraduation Program, Department of Nutrition, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Brazil; <sup>3</sup> Núcleo de Estudos Químicos de Micromoléculas da Amazônia (NEQUIMA), Manaus, Brazil

### ABSTRACT

**Background:** Complementary feeding is critical in establishing undernutrition. However, experimental undernourished diets do not represent the amount of nutrients in the complementary diets of undernourished children.

**Objectives:** To develop, validate, and evaluate the impact of a new murine model of undernutrition on the intestinal epithelium, based on the complementary diet of undernourished children from 7 countries with low-socioeconomic power belonging to the Malnutrition-Enteric Diseases (MAL-ED) cohort study.

**Methods:** We used the difference in the percentage of energy, macronutrients, fiber and zinc in the complementary diet of children without undernutrition compared with stunting (height-for-age Z-score < -2) for the MAL-ED diet formulation. Subsequently, C57BL/6 mice were fed a control diet (AIN-93M diet) or MAL-ED diet for 28 d. Weight was measured daily; body composition was measured every 7 d; lactulose:mannitol ratio (LM) and morphometry were evaluated on days 7 and 28; the cotransport test and analysis of intestinal transporters and tight junctions were performed on day 7.

**Results:** The MAL-ED diet presented -8.03% energy, -37.46% protein, -24.20% lipid, -10.83% zinc, +5.93% carbohydrate, and +45.17% fiber compared with the control diet. This diet rapidly reduced weight gain and compromised body growth and energy reserves during the chronic period ( $P < 0.05$ ). In the intestinal epithelial barrier, this diet caused an increase in the LM ( $P < 0.001$ ) and reduced ( $P < 0.001$ ) the villous area associated with an increase in FAT/CD36 in the acute period and increased ( $P < 0.001$ ) mannitol excretion in the chronic period.

**Conclusions:** The MAL-ED diet induced undernutrition in mice, resulting in acute damage to the integrity of the intestinal epithelial barrier and a subsequent increase in the intestinal area during the chronic period. This study introduces the first murine model of undernutrition for the complementary feeding phase, based on data from undernourished children in 7 different countries.

**Keywords:** child undernutrition, undernutrition experimental model, complementary feeding, functional barrier of the intestinal epithelium, body composition

**Abbreviations:** ANOVA, analysis of variance; Isc, short-circuit current; LM, lactulose:mannitol ratio; MAL-ED, Malnutrition-Enteric Diseases; NMR, nuclear magnetic resonance; PD, potential difference; PLS-DA, partial least squares-discriminant analysis; RBD, regional basic diet; TSP, trimethylsilyl propanoic acid; TR, transepithelial electrical resistance; UNDERNOU, undernourished.

\* Corresponding author. E-mail address: [samilly.rib@gmail.com](mailto:samilly.rib@gmail.com) (S.A. Ribeiro).

<https://doi.org/10.1016/j.tjn.2024.02.001>

Received 5 October 2023; Received in revised form 26 January 2024; Accepted 1 February 2024; Available online 10 February 2024  
0022-3166/© 2024 American Society for Nutrition. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

## Introduction

Undernutrition in the first few years of life is a serious health problem associated with an increased risk of mortality [1], a vicious cycle of clinical and subclinical enteric infections, impairment of physical and cognitive development, and chronic diseases in adulthood [2–5]. Despite efforts to reduce cases of child malnutrition, the latest estimates report that ~149.2 million children aged <5 y were affected by chronic undernutrition and 45.4 million by acute undernutrition in 2019 alone [6]. Furthermore, the socioeconomic crisis caused by the COVID-19 pandemic is estimated to have a chronic impact on the number of children affected by stunting in the coming years [7].

The introduction of complementary feeding, which is necessary to meet the energy demand exceeding that provided by breast milk, increases the risk of child malnutrition [8,9]. Malnutrition in low- and middle-income countries stems from nutritional deficiencies in complementary diets [10]. However, the quantification of nutrients in children's complementary diets and analysis of their association with childhood malnutrition are quite scarce in the literature [11–15], directly reflecting experimental undernutrition diets.

There are only 3 diets based on the dietary composition of specific populations: the regional basic diet (RBD), which mimics the food composition of the Brazilian semiarid region [16]; the vegetable maize diet, which is based on the predominant foods consumed by Malawian children with kwashiorkor [17]; and M8, a diet based on the foods most consumed by the population of Malawi [18]. These 3 experimental diets are based only on the most predominant foods in the diet of these populations, which is limited by the lack of representation of the amount of energy, macronutrients, and micronutrients consumed by the child population. Furthermore, none of these diets represent the complementary feeding phase, which is critical for infant nutrition.

Attia et al. [19] showed that morphologic, functional, and inflammatory alterations in the intestine might be responsible for establishing morbidities related to long-term undernutrition. Thus, understanding the intestinal alterations triggered by undernutrition may be the key to implementing more effective treatments. Animal models have contributed to our understanding of the pathophysiology of different nutritional deficiencies [18,20–23]. Notably, even with the advances in the understanding of damage at the intestinal level, the preference for using experimental diets with protein restriction to study the functional intestinal epithelium limits the findings and may not reflect child undernutrition [19].

Thus, this study aimed to formulate a new undernutrition diet, the Malnutrition-Enteric Diseases (MAL-ED) diet, based on a recent study that quantified the energy, macronutrients, and micronutrients of the complementary diet of undernourished children from 7 countries with low-socioeconomic power [11]. Furthermore, we aimed to evaluate the effect of this new experimental diet on the functional intestinal epithelium of C57BL/6 mice. We hypothesized that the new MAL-ED diet would induce a clinical picture of undernutrition in newly weaned mice, negatively affecting the morphology and function of the intestinal epithelium. Thus, to our knowledge, this is the first murine model of undernutrition aimed at mimicking common nutritional deficiencies in undernourished children during complementary feeding.

## Methods

### Animals and ethics approval

Overall, 74 male C57BL/6 mice ( $n = 4$ –11/group) were obtained from the Sector Animal Facility of the Department of Physiology and Pharmacology at the Federal University of Ceará. These mice were housed in a controlled environment with a 12/12-h light/dark cycle and a temperature of  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  and were provided with water ad libitum. The quantity of the diet was measured daily so that both groups consumed the same amount of food.

All procedures conducted on mice followed the standards of the National Council for the Control of Animal Experimentation and were approved by the Ethics in Animal Use Committee at the Federal University of Ceará (protocol number 3941290319).

### Diet

The formulation of the new undernutrition-inducing diet, MAL-ED, was based on the quantification of the complementary feeding of children with and without undernutrition in the multicenter MAL-ED cohort [11].

Maciel et al. [11] quantified nutrients and energy from complementary feeding, using 24-h recalls from 1463 children living in urban, periurban, and rural areas of 7 countries with low-socioeconomic status. These locations included Bhaktapur, Nepal ( $n = 229$ ); Dhaka, Bangladesh ( $n = 208$ ); Fortaleza, Brazil ( $n = 169$ ); Haydom, Tanzania ( $n = 210$ ); Loreto, Iquitos, Peru ( $n = 199$ ); Venda, South Africa ( $n = 221$ ); and Vellore, India ( $n = 227$ ).

Thus, the consumption of energy, macronutrients, fiber, 6 vitamins (niacin, riboflavin, thiamine, folate, and vitamins A and C), and 6 minerals (calcium, iron, magnesium, potassium, phosphorus, and zinc) in the children's complementary feeding was quantified, and the diet composition of children with and without undernutrition was compared.

Our new MAL-ED experimental diet was created using the percentage difference in energy, macronutrients, fiber, and zinc consumption between children with undernutrition (height-for-age Z-score  $< -2$ , stunting) and those without undernutrition at 24 mo of age but using a standard experimental diet as a reference. Zinc deficiency was represented in the MAL-ED diet due to its correlation with enteric infections [3] and the establishment of stunting at 24 mo of age [18]. To ensure that the new undernutrition diet was the appropriate dietary pattern for rodents, we used the standard AIN93-M control diet. Zinc was added to the feed as zinc chelate. In order to reduce its final content in the experimental new MAL-ED diet, similar to the diet of undernourished children from the MAL-ED cohort (a reduction of 2%–9% compared with nourished children) [11], 0.083 g of zinc chelate/kg of feed was added to ~33 mg zinc/kg in the final feed. The formulation and production of both the MAL-ED and control (AIN-93M) diets were performed by Rhoster.

The centesimal composition of the new undernutrition diet was evaluated using various methods, including the Dumas method to quantify protein, loss on drying and gravimetry to verify the amount of moisture, and atomic absorption to quantify macronutrients and micronutrients. These procedures were conducted by the company CBO. These methods collectively allowed for the quantification of moisture, crude protein, fat,



crude fiber, calcium, phosphorus, and zinc. The amount of carbohydrate was estimated by subtracting the values of crude protein, fat, fiber, mineral material, and moisture in 100 g of feed.

### Experimental design

The new murine model of undernutrition was established according to the protocol of Brown et al. [24], with some modifications. Male C57BL/6 mice aged 21 d underwent measurements of body weight, total length, and electrical bioimpedance before being randomly assigned to either the control group (AIN93-M diet) or the undernourished group (MAL-ED diet). The diet consumption protocol was extended to 28 d (49 d of age) to observe the temporal effects of the diet on various body parameters and the intestinal epithelial barrier. Initially, we provided the experimental groups with water and food ad libitum ( $n = 6/\text{group}$ ) for 28 d but did not observe any clinical signs of undernutrition in the animals (Supplementary Figure 1). Going forward, a new experimental protocol was adopted in which the amount of food in the control group was weighed daily to estimate daily consumption and verify the same amount was available to the undernourished group. Body weight was measured daily, and water consumption was measured every 2 d. Additionally, every 7 d, the animals underwent evaluations of body development and body composition. The intestinal epithelium was analyzed at 2 different times, on days 7 and 28, to verify acute and chronic temporal changes triggered by the MAL-ED diet. On days 7 and 28, the animals were intramuscularly anesthetized using ketamine hydrochloride (90 mg/kg) and xylazine hydrochloride (10 mg/kg). Blood and intestinal tissues were collected for albumin, morphometric, histopathologic, and molecular biological analyses, and the animals were killed by exsanguination. We used a total of 74 animals, of which 12 consumed the MAL-ED and control diet ad libitum for 28 d, and 64 animals were on the quantity-restricted diet protocol for 7 or 28 d. Of the 64 animals, we used 21 animals ( $n = 10$  and 11) to evaluate the clinical signs of undernutrition and collected intestinal tissue and blood for morphometric, histopathologic, and albumin analyses over a period of 28 d. Tissue and blood samples were collected from another 26 animals over a 7-d period for morphometric, histopathologic, tight junction, intestinal transporter, and albumin analyses and the absorption test in Ussing chambers. Subsequently, we used 15 animals for the lactulose and mannitol test and metabolome analysis.

### Assessment of body development

The body growth of the animals was measured on days 0, 7, 14, 21, and 28 to assess body development. For this, the mice were briefly anesthetized with isoflurane (Cristália) [25], then they were positioned on a flat surface and aligned, and body length from snout to end of tail was measured with the aid of a digital caliper (Mitutoyo Precision Measuring Tools).

### Body composition analysis

Mice underwent body assessment by tetrapolar bioimpedance (ImpediVET) on days 0, 7, 14, 21, and 28. Mice were anesthetized and placed under a nonconducting surface with the limbs arranged perpendicular to the body and the tail extended distally. Four needles (25 × 12 gauge) were inserted into the subdermal region along the dorsal midline. The central

electrodes were inserted between the ears and hind legs, whereas the peripheral electrodes were inserted between the eyes and tail, as specified by the manufacturer. The needles were connected to the electrodes attached to the device. The length of the animal between the central electrodes and the animal's body weight were measured and recorded by the equipment. The electric current was then activated, and the bioimpedance parameters of resistance and reactance were obtained using a single spectrum of 4–1 MHz in a series of 256 points. Finally, the device used a complex impedance graph to determine total body water, extracellular fluid, and intracellular fluid, whereas fat-free mass, fat mass, and BMI ( $\text{g}/\text{m}^2$ ) were calculated by the device's software (ImpediVET) [26]. Total body water was normalized to weight and expressed as percentage.

### Morphometric and histopathologic analysis

Duodenum, jejunum, and ileum samples were transversely sectioned and fixed in 10% formaldehyde buffer for 18 h. After the fixation period, the material was dehydrated, embedded in paraffin, cut into 5.0  $\mu\text{m}$  sections using an impact microtome (Polycut S, Leica), and stained with hematoxylin and eosin. Subsequently, with the aid of an optical microscope coupled to an image acquisition system (Leica) and ImageJ software version 1.5a (NIH), the areas of all villi and corresponding crypts were measured on each slide of the group (a minimum of 10 villi and 10 corresponding crypts per slide) to analyze the acute and chronic impact of the MAL-ED diet on intestinal morphometry.

For the histopathologic analysis, possible lesions were analyzed according to the inflammatory infiltrate severity score system suggested by Erben et al. [27], with some modifications. The severity criteria were as follows: **score 0**, normal histologic findings with <10% leukocytes in the mucosa; **score 1**, mild findings with 10%–25% leukocytes in the mucosa and edema in villi; **score 2**, moderate findings with 26%–50% leukocytes in the mucosa, submucosa, and edema; **score 3**, severe findings with >51% transmural leukocytes and edema. Histopathologic analysis was performed by a pathologist on all small intestinal segments collected on days 7 and 28.

### Assessment of the intestinal epithelial barrier

An experimental group was exclusively used to assess the intestinal epithelial barrier using the lactulose and mannitol test so that the conditions required for the test would not interfere with the other analyses. The animals underwent a period of adaptation to the collection environment, which consisted of remaining in metabolic cages for 2 h/d for 5 d before the administration of the lactulose and mannitol solution. In the last 24 h before the test, all animals remained in metabolic cages for the entire duration. During these 24 h, the animals were fed an isocaloric G diet (a low-carbohydrate diet; Rhoster) for 16 h and fasted for 8 h to prevent dietary carbohydrates from interfering with the subsequent analysis. After fasting, all animals were administered 200  $\mu\text{L}$  of a solution containing 250 g/L of lactulose (Duphar Laboratories) and 50 g/L of mannitol (Henrifarma Chemicals and Pharmaceuticals LTDA) by gavage to assess paracellular and transcellular permeability, respectively. Urine samples were collected 24 h after test solution administration and preserved in 0.236 mg/mL chlorhexidine (Sigma-Aldrich). The animals consumed the isocaloric G diet during the collection period. Sample volumes were recorded and centrifuged at

18,480  $\times$  g for 3 min at 25°C, then 50  $\mu$ L of each sample was added to 50  $\mu$ L of an internal standard solution (3.6 mM of melibiose diluted in 2.9 mL of distilled water). The solution was centrifuged again (18,480  $\times$  g for 3 min), and 50  $\mu$ L was used for sugar determination. Two standard carbohydrate solutions were used to calibrate the system at baseline and between tests for each group. The standards contained 60  $\mu$ M of the following sugars: glucosamine, mannitol, melibiose, and lactulose (group I), and inositol, sorbitol, glucose, and lactose (group II). Sugar standard curves were generated and samples were measured using high pressure liquid chromatography with pulsed amperometric detection in the UltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific), as previously described [28].

#### Analysis of serum albumin concentrations

Albumin concentrations were measured using the Labtest dosage kit (Lagoa Santa). The samples were prepared according to the manufacturer's instructions: sample (10  $\mu$ L of serum plus 1.0 mL of color reagent), blank (1.0 mL of color reagent), and standard (10  $\mu$ L of standard plus 1.0 mL of color reagent). The solutions were lightly mixed, and after 2 min, readings were obtained at 630 nm wavelength in a Labquest spectrophotometer.

#### Evaluation of baseline electrophysiologic parameters and during challenge with glutamine, alanyl-glutamine, and glucose by Ussing chamber

The Ussing chamber system is a valuable, proven, and widely used method to measure the transport of electrolytes, nutrients, and drugs across epithelial tissues. The experimental procedure was performed as previously described [29]. The animals were anesthetized as described in the Experimental Design section, and jejunal samples were collected and dissected to remove the

serosa. The mucosa was then attached to hemichambers, which were connected to a automatic voltage clamp model #AVC-300 (Buck & Co. Inc.), using salt bridges coupled with electrodes. The system maintained the tissue at 37.8°C, aerated with a carbogenic mixture (95% oxygen and 5% carbon dioxide) and filled with a Krebs-Mannitol solution on the mucosal side and Krebs-Glucose on the serous side. By fixing voltage and electrical current, we measured the basal potential difference (PD), transepithelial resistance (TR), and short-circuit current (Isc) for 120 min without adding any substance (basal response) or during the challenge with increasing concentrations (7 mM, 20 mM, 70 mM, and 200 mM) of glucose (Merck), L-glutamine (Sigma-Aldrich), and L-alanyl-glutamine (Rexim SA). After the experimental protocol, a viability test was performed with 250 mM of theophylline (Sigma-Aldrich) and then with glucose (5 mM/mL), to confirm tissue responsiveness at the end of the protocol.

#### Evaluation of gene transcription of tight junctions and intestinal transporter proteins

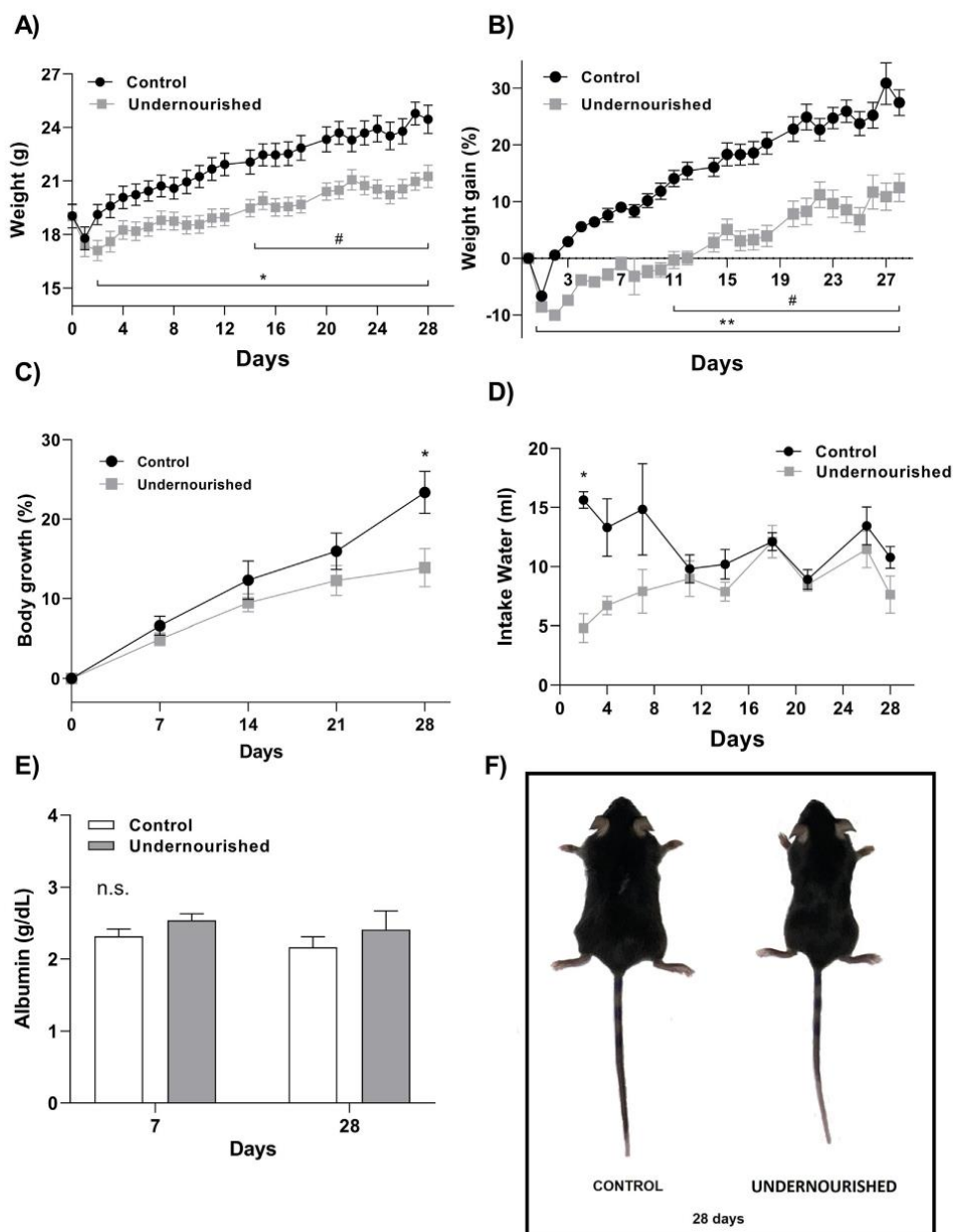
Gene transcription of zonula occludens-1 (ZO-1), occludin, claudin-1, claudin-2, claudin-15, peptide transport 1 (PEPT-1), SGLT-1, FATP4, and FAT/CD36 was determined using qRT-PCR. The reference gene for normalization was 18S. Total RNA was extracted from jejunal mucosal scrapings using the TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific). To scrape the jejunal mucosa, tissue was cut to expose the intestinal mucosa, and a histologic slide was used to scrape the mucosa. The samples were collected and stored until the day of extraction. Then, 1  $\mu$ g of the total isolated RNA was used for cDNA synthesis using the GoScript Reverse Transcription System (Promega), according to the manufacturer's instructions. For the qRT-PCR reaction, 7.5  $\mu$ L of GoTaq qPCR Master Mix (Promega), 2.4  $\mu$ L of each primer (0.8

**TABLE 1**  
Nutritional composition of the MAL-ED and control diets.

	Control diet	MAL-ED diet	Difference (%)
Energy (kcal)	391.69	360.22	−8.03
<i>Macronutrients</i>			
Carbohydrate (g)	61.89	65.66	5.93
Protein (g)	21.25	13.29	−37.46
Lipid (g)	6.57	4.98	−24.20
Fibers (g)	2.9	4.21	45.17
<i>Micronutrients</i>			
Zinc (mg)	35.0	31.21	−10.83
<i>Ingredients</i>			
Semola grits (g)	—	54.90	—
Casein (81% protein)/14% (g)	16.40	9.60	—
Dextrinized starch (g)	15.50	0.00	—
Sucrose (g)	10.00	0.00	—
Soy oil (g)	4.00	5.10	—
Cellulose MC-101 (g)	5.00	26.00	—
Mineral mix (g)	3.50	3.50	—
Zinc chelate (g)	0.0093	0.0083	—
Vitamin mix (g)	1.00	1.00	—
L-cysteine (g)	0.18	0.30	—
Choline bitartrate (g)	0.25	0.25	—
Tert-butylhydroquinone (g)	0.0008	0.0014	—

Abbreviation: MAL-ED, Malnutrition-Enteric Diseases.

Values referring to the analysis of the centesimal composition of the MAL-ED diet and control diet (AIN-93M), as well as the amount of ingredients used to formulate each diet.



(caption on next page)



mM), and 1.0  $\mu$ L of cDNA from the samples were used, and nuclease-free water was added to an end volume of 20  $\mu$ L. The sequences and annealing conditions for each investigated gene, obtained from the National Center for Biotechnology Information website, are listed in [Supplementary Table 1](#). The data obtained were based on the values of the threshold cycle, in which the observed fluorescence was 10 times greater than the baseline fluorescence for each qPCR assay. All amplifications were evaluated for the melting curve to ensure the specificity of the amplification and to detect the formation of initiator dimers or any other nonspecific products. From the values of the quantitative cycle (Cq/Ct), the relative concentrations of RNA were calculated according to the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method [30].

### Evaluation of relative protein expression of tight junction and intestinal transporter proteins

The expression of tight junction and transporter proteins involved in the regulation of the intestinal barrier was investigated using western blotting. Jejunal mucosal samples from the animals were homogenized in RIPA buffer (Thermo Fisher Scientific) with a protease inhibitor (1 mL inhibitor: 100 mL RIPA) and centrifuged at  $18,480 \times g$  for 10 min. Total protein content in each sample was measured using the Pierce BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific). Samples (50  $\mu$ g of protein) were prepared by adding Laemmli buffer (Bio-Rad) with  $\beta$ -mercaptoethanol (Bio-Rad) and denatured at 99°C for 5 min. Proteins were separated by SDS-PAGE (8%–10% for SGLT-1, PEPT-1, and occludin; 15% for claudin-1 and -2), transferred to nitrocellulose membranes, blocked with 5% bovine serum albumin for 1 h, and incubated with primary rabbit antibodies: anti-actin (1:1000), anti-PEPT-1 (1:200), anti-occludin (1:1000), anti-claudin-2 (1:200) (Santa Cruz Biotechnology), and anti-claudin-15 (1:200) (Thermo Fisher Scientific). The membranes were then incubated for 1.5 h with the secondary antibody and subsequently visualized using the Clarity Western ECL Substrate kit (Bio-Rad) and ChemiDoc system (Bio-Rad). Densitometric quantification of the bands was performed using ImageJ version 1.5 (NIH).

### Metabolome

#### NMR experiments and identification of metabolites

For the acquisition of proton nuclear magnetic resonance ( $^1\text{H}$  NMR) spectra, 150  $\mu$ L of urine collected in the lactulose and mannitol test was mixed with 400  $\mu$ L of  $\text{D}_2\text{O}$  phosphate buffer (pH = 7.4) containing 1 mM trimethylsilyl propanoic acid (TSP-d4) and 3 mM  $\text{Na}_3\text{N}$  [31]. A 550  $\mu$ L aliquot of the resulting solution was transferred to a 5 mm NMR tube. All NMR spectra

were recorded at 293 K using an Avance III HD spectrometer operating at a  $^1\text{H}$  frequency of 500.13 MHz, equipped with a 5 mm probe. Additionally,  $^1\text{H}$  NMR spectra were acquired using a water suppression pulse sequence, NOESYPR1D (Bruker library), with 64 K data points over a 20 ppm spectral width averaged over 32 transients. A recycle delay of 15 s and a mixing delay of 100 ms were used to help reduce the water signal through T1 relaxation and chemical exchange. Saturation of the water signal was achieved by irradiation during recycling and nuclear overhauser effect (NOE) mixing delay at the  $\text{H}_2\text{O}/\text{HOD}$  NMR frequency. Sheeting, tuning, matching, and pulse width were carefully adjusted for each sample. The free induction decay (FID) were Fourier transformed with line broadening = 0.3 Hz. The resulting spectra were manually phased, baseline referenced to the TSP resonance (methyl groups) at 0.0 ppm. The assignment of  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra was obtained using 2-dimensional experiments (heteronuclear multiple bond correlation – HMBC  $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ ), the literature data [32,33], the Chenomx NMR Suite software version 8.4 (using pH = 7.4), and the Spectral Database for Organic Compounds (SDBS site from the National Institute of Advanced Industrial Science and Technology [AIST]; [https://sdb.sdb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/cre\\_index.cgi](https://sdb.sdb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/cre_index.cgi)).

#### Multivariate analysis

Absolute areas of the identified metabolites were normalized to creatinine and organized in a matrix with 32 samples (lines) and 7 variables (columns). Partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) was performed using Pareto scaling. To check the validity of the model, a 10-fold cross-validation method was applied, and Q2 and R2 were calculated [34]. The model with 3 latent components provided Q2, R2, and accuracy values of 0.761%, 0.665%, and 93.3%, respectively. A permutation test and an additional cross-validation tool were also used for the PLS-DA model with 2000 permutations. Permutation analysis showed that the Q2 values of the original model were higher than those of permutation method and that the model had a higher predictive ability.

#### Metabolite quantification

Metabolite quantification was performed on the original spectra data through the internal method, using TSP-d4 (1 mM) as the internal reference. The concentration of the metabolites was normalized to each urine sample's corresponding creatinine value to compensate for variations in urine volume (results were expressed as M/M creatinine) [31,35]. The multi-integration tool-kit AMIX-viewer (Bruker BioSpin) was used to normalize the data. The results were evaluated using Welch's *t* test and Mann-Whitney *U* tests, according to the normality of the data. Metabolite contents ( $P < 0.05$ ) were

**FIGURE 1.** Comparison of physical development in mice fed undernutrition MAL-ED or control diet. (A) Weight (g) and (B) Weight gain (%) of the control (black line) SEM (\* undernourished compared with control,  $P < 0.05$ , Student's *t* test; #  $P < 0.05$ , 1-way ANOVA followed by the Bonferroni post-test in the malnourished group comparing day 1 with the other times). (C) Body growth on days 7, 14, 21 and 28 ( $n = 10$ –11). Data are presented as mean  $\pm$  SEM (# $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , 1-way ANOVA followed by the Bonferroni post-hoc test in the undernourished group comparing day 1 with the other timepoints). (D) Water intake of control (black line) and undernourished (gray line) animals for a period of 28 d (\* $P < 0.05$ , Student's *t* test for undernourished compared with control for each day). Data are representative of the mean water consumption of control and undernourished animals from 3 different experimental lines ( $n = 11$ ). (E) Serum concentrations of plasma albumin (g/dL) on days 7 and 28 of ingestion of the control diet (white bar) or MAL-ED (gray bar). Data correspond to 2 experimental lines ( $n = 7$ ). Values are presented as mean  $\pm$  SEM (n.s. =  $P > 0.05$ , Student's *t* test for undernourished compared with control). (F) Illustrative image of the control and undernourished animals on the 28th day. ANOVA, analysis of variance; MAL-ED, Malnutrition-Enteric Diseases; SEM, standard error of the mean.



considered significant. SPSS 21.0 software was used for the univariate analysis.

### Statistical analysis

The collected data were entered into a Microsoft Excel spreadsheet version 15/Office 2013 and double-checked to validate data entry. Data were assessed for normality using the Kolmogorov-Smirnov test. Normalized parametric data were analyzed by the *t* test or analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni post-hoc test, when the data were paired. Nonparametric data were analyzed using the Mann-Whitney *U* test. All tests were performed using GraphPad Prism software. Results are presented as mean  $\pm$  SEM or median and IQR (Q1;Q3), when indicated. Statistical significance was set at *P* value of  $<0.05$ .

## Results

### Composition of the MAL-ED diet

Compositional analysis revealed that the new MAL-ED undernutrition diet presented  $-8.03\%$  energy,  $-37.46\%$  protein,  $-24.20\%$  fat,  $-10.83\%$  zinc,  $+5.93\%$  carbohydrate, and  $+45.17\%$  fiber compared with the control diet (Table 1). The ingredients and their respective amounts used to formulate the diets are listed in Table 1.

### Induction of malnutrition by the new MAL-ED diet

Consumption of the MAL-ED diet ad libitum for 28 d did not significantly change ( $P > 0.05$ ) the weight and weight gain of the animals compared with the control diet. Although  $\sim 8$  to 29 g more of the MAL-ED diet was consumed than the control diet, as illustrated in Supplementary Figure 1A, B, and C, respectively, there was no change in body parameters. However, when consumption of the MAL-ED diet was restricted to the same amount consumed as the control diet, a significant reduction ( $P < 0.05$ ) was observed in body parameters (Figure 1).

By controlling daily consumption of the MAL-ED experimental diet, we observed a significant reduction in the daily weight of animals in the undernourished group compared with the control group from the second experimental period onward (control  $19.12 \pm 0.56$  g compared with undernourished  $17.11 \pm 0.56$ g) (Figure 1A). Weight gain was significantly reduced ( $P < 0.05$ ) from the first day of undernutrition (control  $-6.63\% \pm 0.28\%$  compared with undernourished  $-8.55\% \pm 0.56\%$ ) and remained reduced until the 28th day (control  $27.47\% \pm 2.27\%$  compared with undernourished  $12.49\% \pm 2.46\%$ ) (Figure 1B). Consumption of the MAL-ED diet also caused a significant difference ( $P < 0.05$ ) in body growth compared with the control group on day 28 (Figure 1C).

Water consumption was slightly higher in undernourished animals in the first 6 d but was significant ( $P < 0.05$ ) only on day 2 (Figure 1D). When analyzing the serum albumin concentrations, we did not identify a significant difference ( $P > 0.05$ ) between the control and undernourished groups on days 7 and 28 (Figure 1E). A representative image of the global effects triggered by chronic consumption of the MAL-ED diet in animals is shown in Figure 1F.

### Impact of the MAL-ED diet on body composition

The MAL-ED diet did not alter ( $P > 0.05$ ) the total body water content of the animals at the time (Figure 2A). However, we

identified a significant reduction ( $P < 0.05$ ) in extracellular fluid in the undernourished group compared with the control group on days 7, 14, 21, and 28 (Figure 2B), whereas the intracellular fluid was significantly reduced ( $P < 0.05$ ) in the undernourished group compared with the control only on days 14 and 21 (Figure 2C).

Consumption of the MAL-ED diet resulted in a significant reduction ( $P < 0.05$ ) in fat-free mass on days 7, 14, 21 and 28 (Figure 2D). In contrast, the new diet compromised fat reserves only in the later period, with a significant reduction ( $P < 0.05$ ) of 16.36% and 25.37% in the undernourished group compared with the control on days 21 and 28, respectively (Figure 2E). BMI was also significantly reduced ( $P < 0.05$ ) only on day 28 (control  $4.94 \pm 0.13$  g/cm<sup>2</sup> compared with undernourished  $4.5 \pm 0.09$  g/cm<sup>2</sup>) (Figure 2F).

### Acute to chronic impact of MAL-ED diet consumption on total small bowel size, morphometry, and histopathology

When analyzing the total length of the small intestine, we did not observe any significant change ( $P > 0.05$ ) in the total size of the intestine for 7 d (Figure 3A). However, the total length of the intestine was  $\sim 7.26\%$  greater ( $P = 0.013$ ) in undernourished animals than the controls on day 28 (Figure 3B).

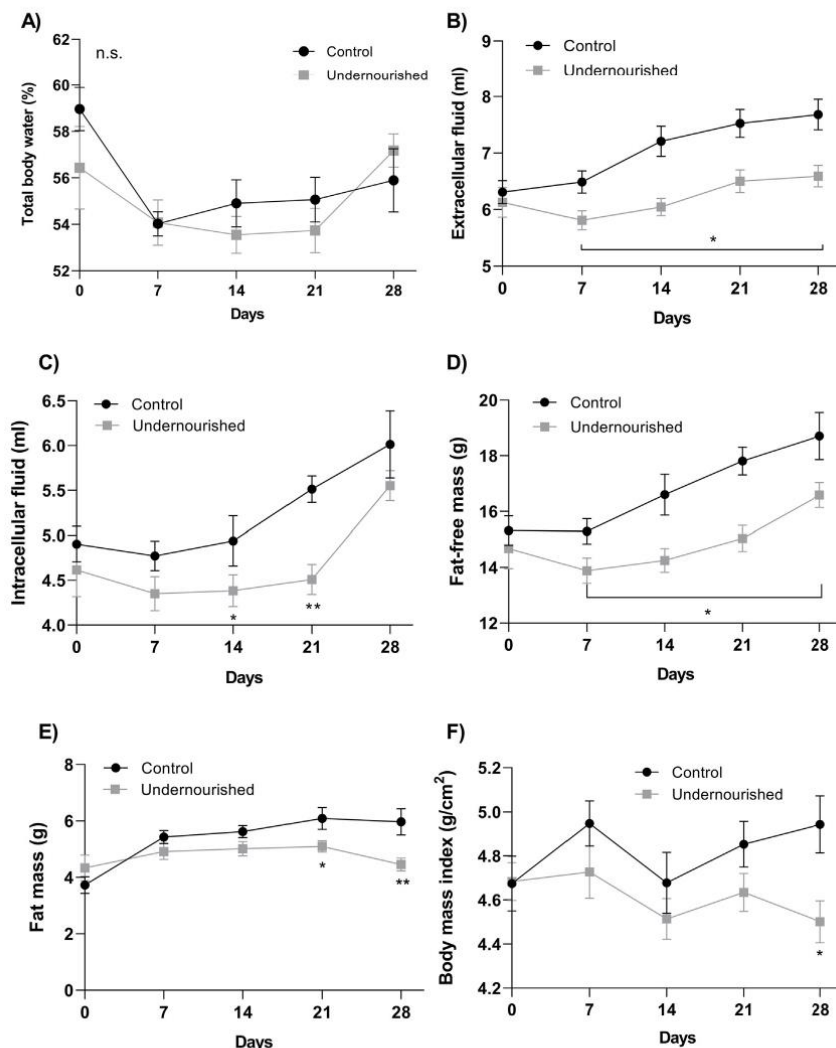
Morphometric analysis in the acute period revealed that the MAL-ED diet triggered a reduction in the area of villi in the duodenum ( $-34.37\%$ ) and jejunum ( $-41.37\%$ ) in undernourished animals, whereas the area of villi in the ileum was 23.72% larger ( $P < 0.0001$ ) than that in the controls (Figure 4A). On the 28th day of undernutrition induction, we found that the area of the villi was significantly ( $P < 0.0001$ ) larger in the duodenum (276.38%) and ileum (27.84%) of undernourished mice than in the controls (Figure 4B). However, the area of the villi in the jejunum in undernourished animals was 13.52% smaller ( $P < 0.001$ ) than in the controls (Figure 4B). In contrast, the crypt area was significantly smaller in the duodenum (24.31%) and larger in the ileum (12.42%) on day 7, without significant changes ( $P = 0.243$ ) in the jejunum (Figure 4C). On the 28th day, the crypt areas were larger ( $P < 0.0001$ ) in all segments of the undernourished animals than in the controls (Figure 4C).

Analysis of the histopathologic scores did not show significant alterations ( $P > 0.05$ ) in any segment when comparing undernourished animals with controls (Table 2). The most important finding was the presence of edema in the villi; however, we did not observe a significant difference ( $P > 0.05$ ) between the groups. Representative images of the duodenum, jejunum, and ileum of undernourished and control animals on days 7 and 28 are shown in Figure 5.

### Assessment of intestinal epithelial barrier integrity

Ingestion of the MAL-ED diet triggered a significant increase ( $P = 0.011$ ) of 103.9% in paracellular permeability compared with ingestion of the control diet in the acute period (Figure 6A). The increase in the lactulose excretion rate remained higher in the chronic period, with an average increase of 348.1% ( $P = 0.0007$ ) in undernourished animals than in the controls (Figure 6A). Regarding the total absorptive area, there were no significant changes ( $P > 0.05$ ) in the acute period; however, a significant increase ( $P = 0.0012$ ) of 28.19% was observed in the



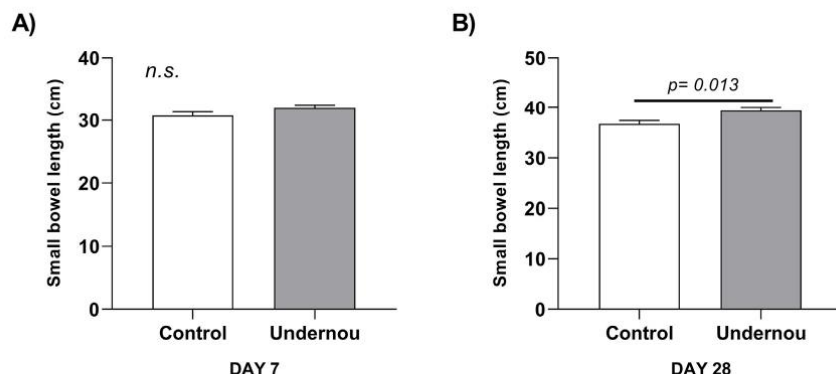


**FIGURE 2.** Body composition in animals fed an undernourished MAL-ED or control diet. (A) Total body water (%), (B) Extracellular fluid (mL), (C) Intracellular fluid (mL), (D) Fat-free mass (g), (E) Fat mass (g), and (F) BMI ( $\text{g}/\text{cm}^2$ ) of control (black line) and undernourished (gray line) animals at days 0, 7, 14, 21, and 28. \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$ , Student's  $t$  test for undernourished compared with control for each time. The values in the figure are representative of an experimental line and are represented by means  $\pm$  SEM of the control and undernourished groups ( $n = 10$ ). Total body water values were normalized by the weight of each evaluated animal and presented as a percentage. MAL-ED, Malnutrition-Enteric Diseases; SEM, standard error of the mean.

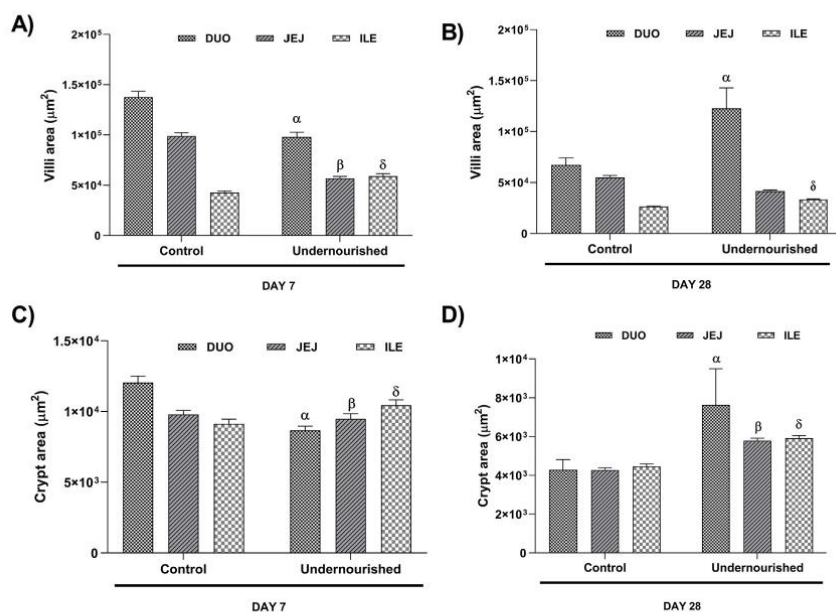
undernourished animals compared with controls on day 28 (Figure 6B). Consumption of the MAL-ED diet damaged the integrity of the intestinal barrier on day 7, with a significant increase ( $P = 0.022$ ) in the LM in undernourished animals compared with the control (Figure 6C). However, no significant changes ( $P = 0.1014$ ) in the LM were observed between the groups on day 28 (control: 0.279, 0.312–0.592 compared with undernourished: 0.222, 0.474–0.697) (Figure 6C).

#### Basal ion transport response and during absorption of glutamine, alanyl-glutamine, and glucose after acute consumption of the MAL-ED diet

When evaluating the  $I_{sc}$ , PD, and TR, we found that the baseline  $I_{sc}$  and TR of the undernourished group remained relatively higher ( $P > 0.05$ ) than those of the control group throughout the experimental period (Figure 7A and 7B, respectively), with a similar baseline TR ( $P > 0.05$ ) between



**FIGURE 3.** Total length of the small intestine after acute and chronic consumption of the MAL-ED diet. (A) Gut length (cm) on day 7 and (B) Gut length (cm) on day 28 of control (white bar) and undernourished (gray bar) animals. Results are representative of one experimental line for each period ( $n = 6-8$ ). Values are presented as mean  $\pm$  SEM (n.s. =  $P > 0.05$  and  $P$  value for significant data is specified in the plot, undernourished compared with control, Mann-Whitney  $U$  test). MAL-ED, Malnutrition-Enteric Diseases; SEM, standard error of the mean; Undernourished, undernourished.



**FIGURE 4.** Area of villi and crypts of the duodenum, jejunum, and ileum after days 7 and 28 of consumption of the MAL-ED diet. (A) villus area on day 7 ( $\mu\text{m}^2$ ) and (B) villus area on day 28 ( $\mu\text{m}^2$ ), (C) crypt area ( $\mu\text{m}^2$ ) on day 7 and (D) crypt area ( $\mu\text{m}^2$ ) on day 28 of the duodenum (DUO), jejunum (JEJ), and ileum (ILE) of the control and undernourished groups. Values are presented as mean  $\pm$  SEM (Mann-Whitney  $U$  test, undernourished compared with control for each segment of the intestine at days 7 and 28.  $\alpha$ :  $P < 0.0001$ , comparison undernourished duodenum with control duodenum;  $\beta$ :  $P < 0.0001$ , undernourished jejunum compared with control jejunum;  $\delta$ :  $P < 0.0001$ , undernourished ileum compared with control ileum,  $n = 8$ ). MAL-ED, Malnutrition-Enteric Diseases.

groups throughout the experimental period (Figure 7B). However, the PD was higher in the undernourished group ( $P > 0.05$ ) than in the control group in the initial timepoints and very similar at the final timepoint (Figure 7C). No significant

differences ( $p > 0.05$ ) were observed for any of the evaluated parameters.

By adding increasing concentrations of glutamine, alanyl-glutamine, and glucose in the jejunum, we identified that

**TABLE 2**

Histopathologic scores triggered by acute and chronic consumption of the MAL-ED diet.

Time	Group	Intestinal segment	Scores
Day 7	Control	Duodenum	1 (0–1)
		Jejunum	1 (0–1)
		Ileum	0 (0–1)
	Undernourished	Duodenum	0 (0–1)
		Jejunum	0 (0–1)
		Ileum	1 (0–1)
Day 28	Control	Duodenum	0 (0–0)
		Jejunum	0 (0–1)
		Ileum	0 (0–0)
	Undernourished	Duodenum	0 (0–1)
		Jejunum	1 (0–1)
		Ileum	0.5 (0–1)

Abbreviation: MAL-ED, Malnutrition-Enteric Diseases.

Scores were analyzed using the Mann-Whitney *U* test, Undernourished compared with control for each intestinal segment at day 7 and 28. Values are expressed as median (minimum – maximum).

animals undernourished for 7 d did not show different responses ( $P > 0.05$ ) than controls in the values of  $\Delta$ Isc, PD, and TR (Figure 8), with the exception of a lower resistance ( $P < 0.05$ ) in the dose of 70 mM of glucose in the undernourished animals (Figure 8C). The data were evaluated for the Hill coefficient; however, we did not find coefficients close to 1.0. Thus, EC<sub>50</sub> and maximum response calculations were not performed.

#### Concentrations of intestinal transporter transcripts and tight junctions after acute consumption of the MAL-ED diet

Consumption of the MAL-ED diet for an acute period triggered changes in FAT/CD36 transcript concentrations (Figure 9D). There was a significant increase ( $P = 0.022$ ) of 384% in the concentrations of FAT/CD36 transcripts in the jejunum of undernourished animals compared with that in control animals on day 7 (Figure 9D). When evaluating the transcript concentrations of SGLT-1, PEPT-1, FATP4, and CFTR, there were no significant differences ( $p > 0.05$ ) between the control and undernourished groups (Figure 9A, B, C and E, respectively). The transcript concentrations of claudin-1, -2, -15, occludin, and ZO-1 also showed no significant differences ( $P > 0.05$ ) between the control and undernourished groups, as shown in Figure 9F, G, H, I, and J, respectively.

#### Protein expression of intestinal transporters and tight junction proteins after acute consumption of the MAL-ED diet

When we evaluated protein expression, we found that claudin-2, -15, and occludin concentrations did not differ significantly ( $P > 0.05$ ) between groups (Figure 10A, B, and C, respectively). PEPT-1 concentrations were also unchanged ( $P > 0.05$ ) between the groups (Figure 10D). The complete protein results are shown in Supplementary Figure 2.

#### Metabolite profile after consumption of the MAL-ED diet

The samples from the 7-d experiment did not show any differences in chemical profiles. Therefore, multivariate analysis

was only performed for the 28-d experiment. We identified 7 metabolites, as described in Table 3. The PLS-DA score depicted in Figure 11 shows that the control samples grouped mostly on the negative side of components 1 and 2, whereas the undernourished samples were spread all over the other quadrants. The loading plot revealed that dimethylamine, lactate, succinate, betaine, and pyruvate were responsible for the control sample grouping, and the undernourished samples were characterized by elevated concentrations of taurine and formate. Only taurine and dimethylamine had variable importance in the projection values  $>1$ ; therefore, they can be considered discriminant variables. The average dimethylamine content (M/M creatinine) was median (Q1;Q3) 229.407 (175.737;272.969) and 0.163 (0.147;0.205) for the control and undernourished samples, respectively, whereas the average taurine content (M/M creatinine) was 4.285 (3.862;4.848) and 3.736 (2.775;5.078) for control and undernourished samples, respectively. Statistical analysis showed that, except for formate and betaine, the metabolite content was statistically different between the groups studied (Table 3).

## Discussion

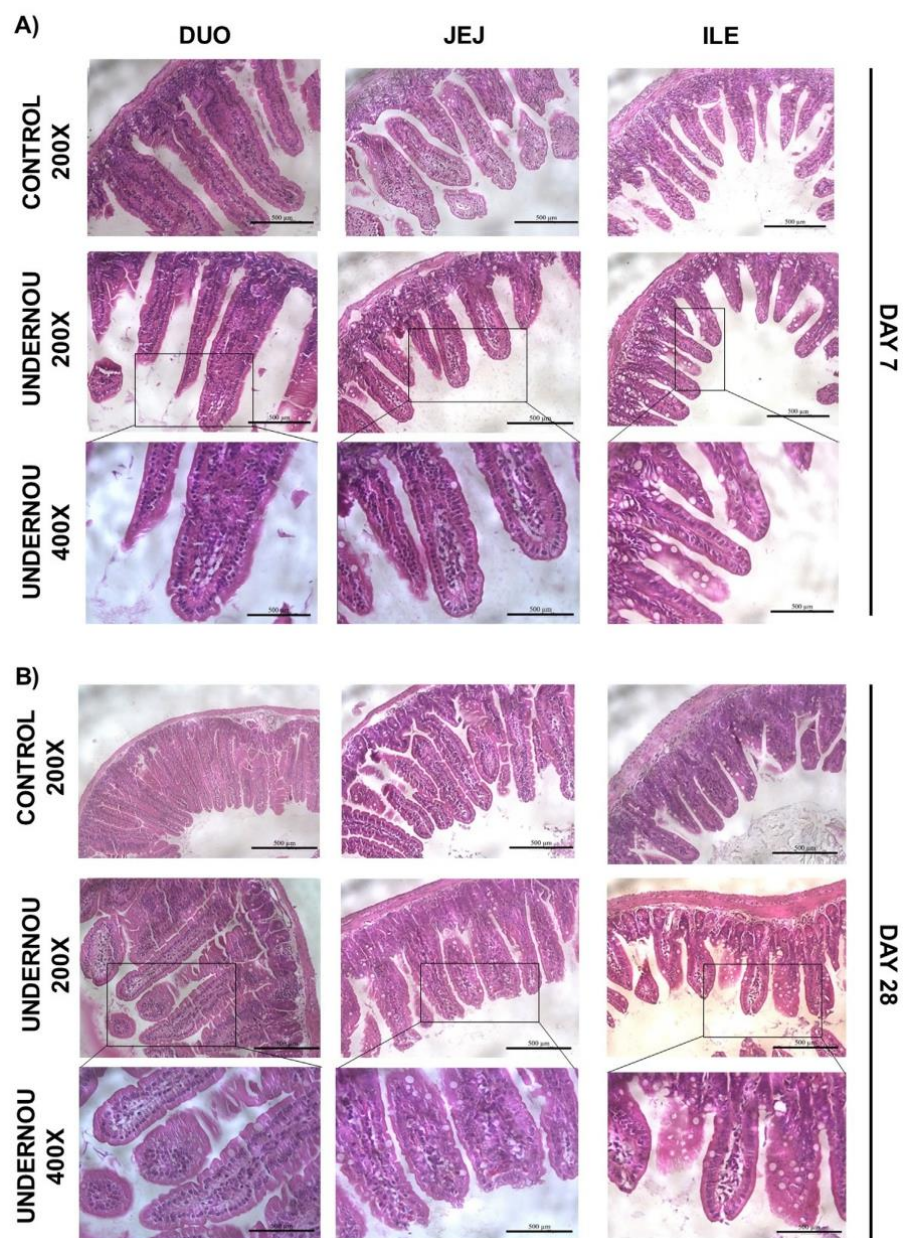
In the present study, we developed a new undernutrition-inducing diet for an in vivo model representative of the complementary feeding of undernourished children from 7 countries with low-socioeconomic status. This diet rapidly reduced weight, inhibited weight gain, compromised body energy reserves, and affected late-term growth without causing edema. At the intestinal level, the MAL-ED diet triggered blunting of the villus area in the duodenum and jejunum and increased paracellular permeability, indicating damage to the barrier function of the intestinal epithelium associated with increased concentrations of FAT/CD36 transcripts in the jejunum during acute period. During the chronic period, the consumption of the MAL-ED diet resulted in an increase in the total intestinal area, establishing an important adaptation of the intestinal epithelium.

Most in vivo models use diets with drastic changes in macronutrient, micronutrient, or energy levels. For example, protein deficiency models used diets with 0% [36], 0.7% [37], 2% [20], 4% [38,39], and 7% protein [24] to induce undernutrition, whereas experimental models of zinc deficiency used diets with  $<2$  ppm of zinc [21,40] and models of energy deficiency used diets with  $-15\%$  to  $-50\%$  energy compared with the control group [20,41,42].

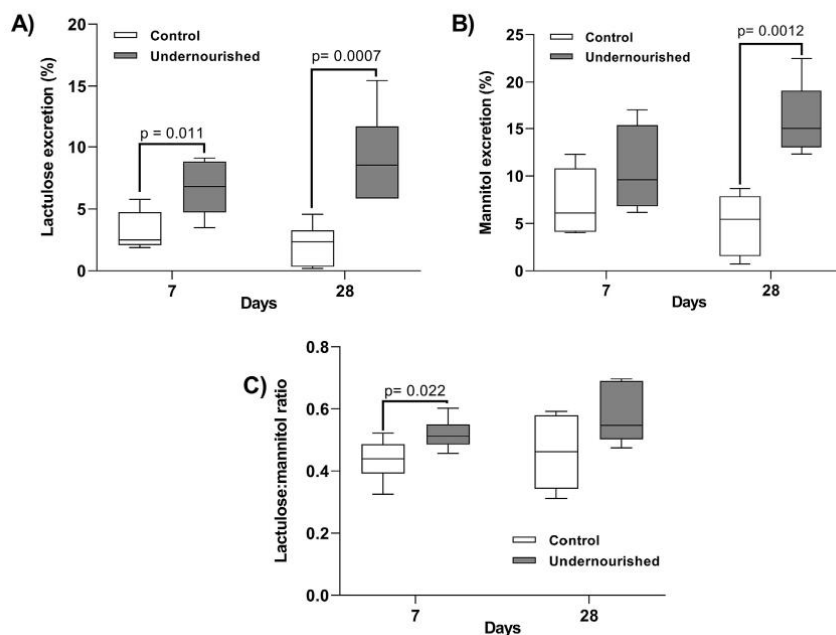
Experimental diets based on foods most consumed by undernourished children or low-income populations in certain regions of the world, such as the vegetable corn diet [16], M8 diet [17], and dewaxed brown rice diet [15], also have a high deficiencies of protein (approximately  $-65\%$ ), lipids ( $-50\%$  to  $-90\%$ ), and fiber ( $-56\%$  to  $-53.6\%$ ) and are rich in carbohydrates ( $+35\%$  to  $+37\%$ ). However, children with undernutrition, acute undernutrition, and chronic undernutrition have been shown to have fewer exorbitant macronutrients, micronutrients, and energy deficiencies in their diets than those in experimental diets [11].

The amount of protein in the complementary diet of undernourished children from 7 different countries varied only from  $-2.0\%$  to  $-6.6\%$  in relation to the diet of healthy children [11]. However, zinc deficiency ranged from  $-2.3\%$  to





**FIGURE 5.** Representative images of the duodenum, jejunum, and ileum after days 7 and 28 of MAL-ED diet consumption. (A) Representative images on day 7 and (B) Representative images on day 28 of the duodenum (DUO), jejunum (JEJ) and ileum (ILE) of the control and undernourished (UNDERNOU) groups. The images of the groups are at 200 $\times$  magnification and the image at 400 $\times$  magnification refers to the UNDERNOU group in all segments. The scale bar (black line) is 500  $\mu$ m. MAL-ED, Malnutrition-Enteric Diseases.



**FIGURE 6.** Intestinal permeability in animals that consumed control diet and MAL-ED diet in acute and chronic periods. (A) Lactulose excretion (%), (B) mannitol excretion (%), and (C) lactulose:mannitol ratio in control (white box) and undernourished (gray box) animals on day 7 and 28. Data correspond to one experiment ( $n = 7-8$ ), and values are presented as median, Q1-Q3 ( $P$  value specified in significant data, undernourished compared with control, Mann-Whitney  $U$  test). MAL-ED, Malnutrition-Enteric Diseases.

−8.6% and energy intake ranged from +11.2% to −25.9% in the same population [11]. Furthermore, zinc deficiency and increased fiber concentrations have been linked to chronic undernutrition in children aged 24 mo [11]. Therefore, the new undernutrition-inducing MAL-ED diet with its moderate deficiency in energy, protein, lipids, and zinc and moderate increase in carbohydrates and fiber better represents the population of undernourished children undergoing complementary feeding.

Daily consumption of the MAL-ED diet caused clinical symptoms of undernutrition in newly weaned animals. Early weight loss and weight gain trigger changes in body composition and impair growth during the later period. Changes in body parameters are the initial clinical signs of undernutrition. In this study, we observed weight reduction, reduced weight gain, and impaired growth, which is in agreement with other models of nutritional deficiency reporting weight change and/or weight gain in the first week of induction [15,24,43] and less growth in the chronic period [18,24].

Body composition analysis has emerged as an important tool for assessing nutritional status; however, little is known about in vivo models. Ribeiro et al. [42] verified that RBD-induced undernutrition in newly weaned animals led to an early reduction in total body water, extracellular fluid, and energy reserves, whereas intracellular fluid was reduced only at an intermediate timepoint, and no changes in BMI were identified. A similar response was observed in the present study; however, intake of the MAL-ED diet rapidly reduced

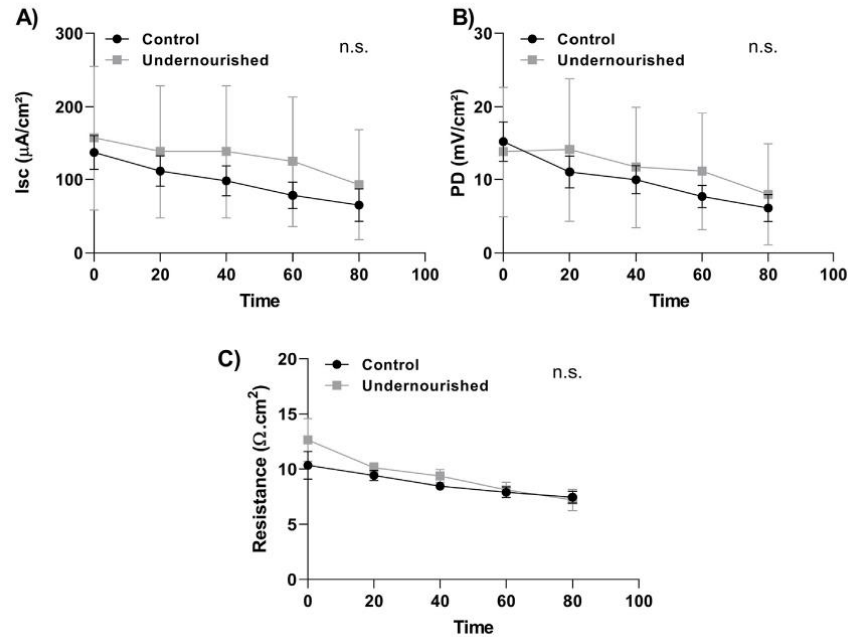
protein reserves and only in the chronic period did it compromise fat reserves.

In general, the metabolism of several organs during undernutrition is sustained mainly by the mobilization of fat, with protein reserves activated only when energy and protein consumption are insufficient to maintain protein metabolism [44]. However, one study [45] highlighted that pathologic conditions such as infection and inflammation may require an increased demand for amino acids, which in turn increase protein catabolism and rapidly reduces protein stores. These factors may have increased the catabolism of the protein reserves of the undernourished animals in this study, as undernutrition is associated with dysbiosis [24] and increased systemic inflammation [46–49]; however, further studies are needed to confirm this hypothesis.

Changes in the function and morphology of the intestinal epithelium are common during undernutrition, particularly villous atrophy, and disruption of the barrier function in the intestinal epithelium [24,43,50,51]. Our results corroborate the literature, especially in the acute period, where we observed a reduction in the area of the villi in the duodenum and jejunum, an increase in intestinal permeability, and damage to the integrity of the barrier function of the intestinal epithelium. Contrary to expectations, we observed an increase in the total intestinal area during the chronic period.

The increase in intestinal area occurred together with the absence of changes in the LM, depletion of fat reserves, and reestablishment of intracellular fluid in undernourished animals





**FIGURE 7.** Basal electrophysiology of jejunal segments after acute consumption of the control diet and MAL-ED diet. (A) Short-circuit current (Isc,  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ), (B) Potential difference (PD,  $\text{mV}/\text{cm}^2$ ), and (C) Basal transepithelial electrical resistance ( $\Omega\cdot\text{cm}^2$ ) of the control group (black line) and undernourished group (gray line) in 7 days' time. Values are presented as mean  $\pm$  SEM (n.s. =  $P > 0.05$ , undernourished compared with control; groups were compared point by point by Student's  $t$  test,  $n = 4$ ). MAL-ED, Malnutrition-Enteric Diseases; SEM, standard error of the mean.

during the chronic period. Intestinal function is maintained during longer periods of consumption of a multideficient diet even after identifying damage to the integrity of the intestinal epithelium during an intermediate period [42]. Furthermore, maintaining the function of organs that acquire energy and nutrients is essential for survival during undernutrition or famine [52]. Considering that intracellular fluid is related to oxygen consumption, caloric requirements, basal metabolic rate, and work performance [53], fat reserve depletion may have helped to reestablish intracellular fluid and maintain the morphology and function of the intestinal epithelium in the present study.

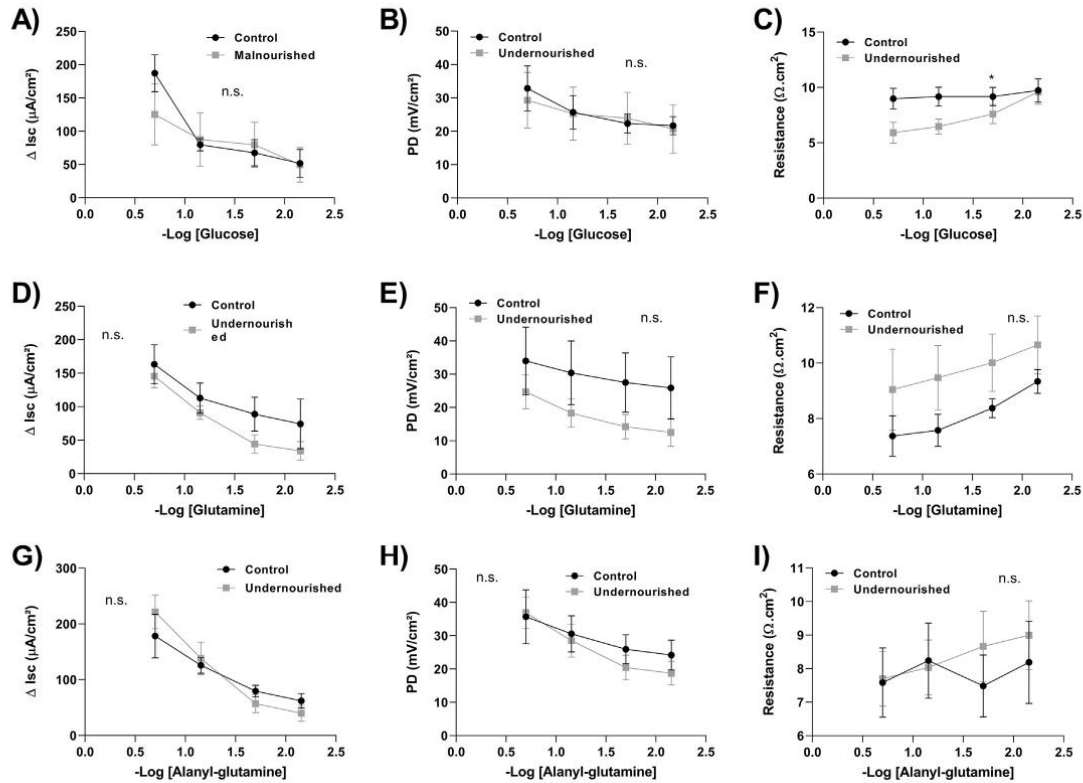
Alterations in the intestinal immune system, such as an increase in lymphocytes in the lamina propria [54] and an increase in the activity of  $\text{CD3}^+$  T cells and macrophages [55] have also been reported in children with severe acute undernutrition. However, we did not observe changes in the inflammatory infiltrate in any of the intestinal segments evaluated during either the acute or chronic period. A recent review [19] highlighted that the results in animal models are inconclusive regarding inflammatory cell infiltration in the intestinal submucosa, despite an *in vivo* model of severe protein undernutrition (2% protein) for 14 d generating an increase in fecal inflammation biomarkers [21]. Thus, inflammatory biomarkers may be more reliable in assessing whether the immune system is activated in the intestine.

Regarding intestinal electrophysiology, the MAL-ED diet did not change the Isc, TR, or PD, both basally and during the cotransport of glucose and peptides/dipeptides. Undernutrition

commonly causes an increase in basal Isc in the tissues of the jejunum and ileum [56,57], indicating a secretory state [52], and an increase in Isc when glucose is added to the mucosal side of the undernourished intestine [43,56,58]; however, these results were not observed in all experimental models of undernutrition.

Chronic caloric restriction ( $\sim 70\%$ ) for 270 d increased the intestinal transport of glucose, fructose, and proline per milligram of tissue, whereas caloric restriction for 24 d only increased fructose absorption [59]. Furthermore, acute undernutrition caused by RBD decreased basal Isc in the ileum of weanling mice [43], and when consumed for a chronic period, it did not change the basal Isc in the jejunum [51]. A bovine experimental model of infection with *Cryptosporidium parvum* showed that glutamine transport is compensated for by the expression of the transporter in the crypts after villous blunting [60]. In this sense, our results show the maintenance of intestinal electrophysiology even with the blunting of villi during the acute period in the jejunum.

In agreement with the electrophysiologic results, we did not observe any alterations in the expression of PEPT-1 or SGLT-1 during acute undernutrition. The expression of carbohydrate and protein transporters increases with the amount of dietary nutrients [59]. For example, high-carbohydrate diets increase the concentrations of SGLT-1 transcripts, whereas protein-deficient diets increase PEPT-1 expression [52]. However, no studies to date have identified changes in the expression of these transporters after the consumption of a low-protein, high-carbohydrate diet [42,43]. This result suggests that even with the blunting of the villi during the acute period, glucose and



**FIGURE 8.** Electrophysiology of the dose-response curve of glucose, glutamine, and alanyl-glutamine after acute consumption of the control diet and MAL-ED diet. Response of (A) Short-circuit current (Isc,  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ), (B) Potential difference (PD,  $\text{mV}/\text{cm}^2$ ), and (C) Transepithelial electrical resistance ( $\Omega\cdot\text{cm}^2$ ) to increasing glucose concentrations; response of (D) Short-circuit current (Isc,  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ), (E) Potential difference (PD,  $\text{mV}/\text{cm}^2$ ), and (F) Transepithelial electrical resistance ( $\Omega\cdot\text{cm}^2$ ) to increasing concentrations of glutamine; and response of (G) Short-circuit current (Isc,  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ), (H) Potential difference (PD,  $\text{mV}/\text{cm}^2$ ), and (I) Transepithelial electrical resistance ( $\Omega\cdot\text{cm}^2$ ) to increasing concentrations of alanyl-glutamine in the jejunum of the group control (black line) and undernourished (gray line) within 7 d. Values are presented as mean  $\pm$  SEM (n.s. =  $P > 0.05$ , undernourished compared with control, groups were compared point by point by Student's *t* test,  $n = 4-6$ ). MAL-ED, Malnutrition-Enteric Diseases; SEM, standard error of the mean.

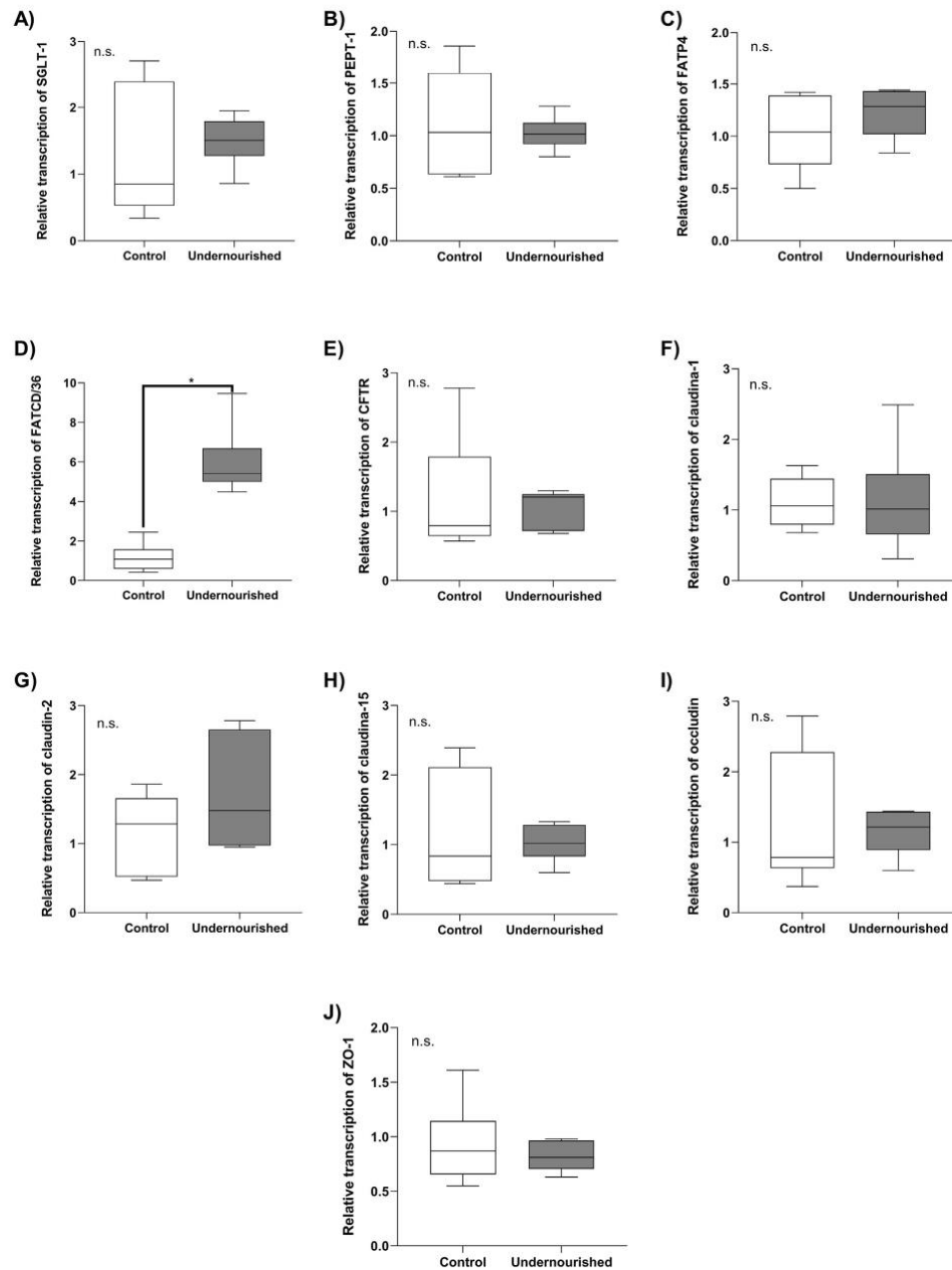
peptide transporters are maintained, probably to maintain adequate uptake of essential nutrients for survival, as suggested by Ferraris [59].

Furthermore, an important study [61] has shown that maternal-fetal protein restriction positively regulates cell proliferation in all intestinal segments and increases the abundance of SGLT-1, GLUT-2, and PEPT-1 transporters only in the duodenum of adult animals, suggesting a physiological adaptation to increase carbohydrate and peptide absorption in more proximal segments. Thus, the analysis of transporters in other intestinal segments, mainly in the duodenum, is of great importance for a better understanding of the pathophysiology of nutrient transport in the MAL-ED diet.

Selective permeability in the gut is essential for the precise regulation of physiological processes [62]. Nutrient absorption depends on a complex system of tight junction proteins. Claudin-2 and -15 demonstrated important roles in sodium feedback to the intestinal lumen, ensuring adequate absorption

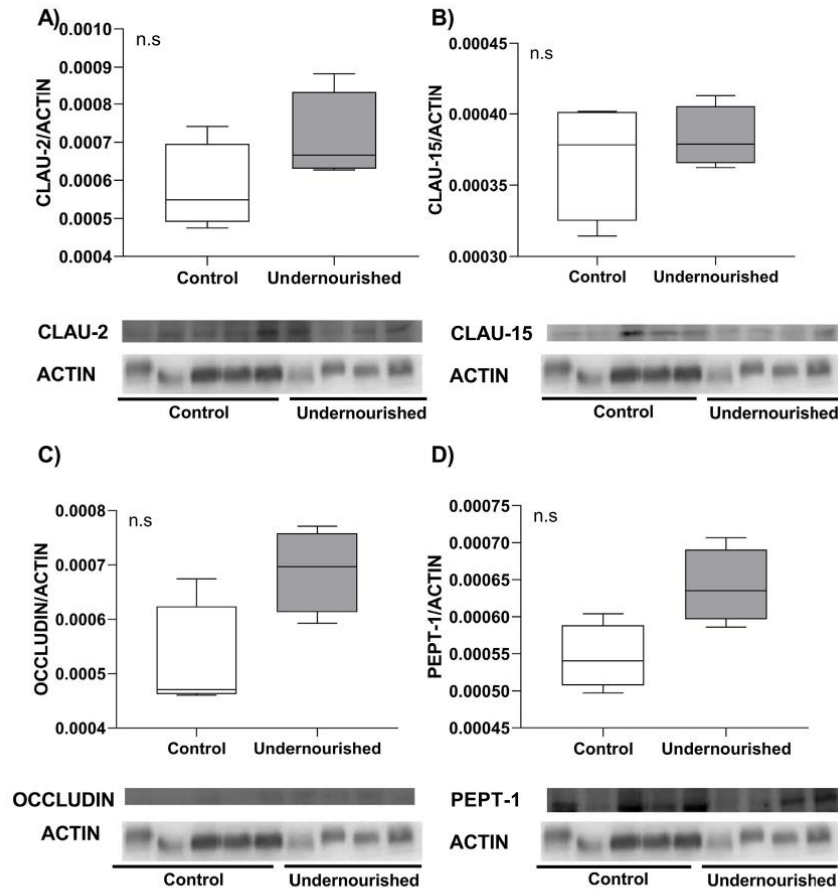
of carbohydrates, proteins, and lipids [22]. The role of tight junction proteins in undernutrition is complex, and variation in expression depends on the type of experimental model and intestinal portion evaluated [24,43,51]. Our results showed no changes in the expression of claudin-1, -2, -15, ZO-1, or occludin, even with increased paracellular permeability during the acute period of MAL-ED consumption.

The paracellular flux of molecules larger than 0.6 nm, such as lactulose, occurs through the leakage pathway, whereas molecules smaller than 0.6 nm are transported paracellularly through the pore pathway [62]. The molecular structure of the leakage pathway remains poorly understood, but its permeability appears to be regulated by occludin, tricellulin, ZO-1, and perijunctional actomyosin [62]. The increase in paracellular permeability in this study may be due to the response of other intestinal segments, as well as alterations in other tight junction and adherent junction proteins that were not evaluated. For example, one study [63] showed that lesions and disruption of



**FIGURE 9.** Transcript concentrations of intestinal transporters, ion channel and tight junction forming proteins after acute consumption of the MAL-ED diet and control diet. Relative transcript of concentrations of (A) SGLT-1, (B) PEPT-1, (C) FATP4, (D) FAT/CD36, (E) CFTR, (F) claudin-1, (G) claudin-2, (H) claudin-15, (I) occludin, and (J) ZO-1 from jejunal mucosal scrapings from control (white box) and undernourished (gray box) animals on day 7. Data are representative of an experimental line ( $n = 8$ ) and are presented as median, Q1-Q3 (\* $P < 0.05$ , Mann-Whitney  $U$  test, undernourished compared with control). MAL-ED, Malnutrition-Enteric Diseases; n.s., not significant.





**FIGURE 10.** Protein expression of tight junction proteins and peptide transporters after acute consumption of the MAL-ED and control diets. Graphic representation of the protein expression of (A) claudin-2, (B) claudin-15, (C) occludin, and (D) PEPT-1 in jejunal mucosa scrapings from control (white box) and undernourished (gray box) animals on day 7. Values are presented as median, Q1-Q3 (n.s. =  $P > 0.05$ , Mann-Whitney  $U$  test, undernourished compared with control,  $n = 4-5$ ). MAL-ED, Malnutrition-Enteric Diseases.

the intestinal epithelial barrier in children with severe acute undernutrition were associated with reduced claudin-4 expression and a lack of labeling of E-cadherin, a protein at the adherent junction responsible for maintaining the integrity of the intestinal epithelium.

Another important finding of our study was the increase in the transcript concentrations of the FAT/CD36 transporter, a transporter of long-chain fatty acids and cholesterol [64]. Bile acid metabolism is altered in children with environmental enteropathy, a condition that causes undernutrition [65]. It is speculated that fatty acid transport may be altered in protein-energy undernutrition; however, the expression of fatty acid transporters during undernutrition has not been evaluated [66]. The increase in FAT/CD36 mRNA concentrations in acute undernutrition induced by the MAL-ED diet may be indicative of an attempt to increase lipid uptake to increase energy uptake and maintain homeostasis. Further studies are needed to better understand lipid absorption during undernutrition.

Metabolomic analysis revealed that the consumption of the MAL-ED diet during the chronic period was associated with a reduction in dimethylamine and taurine concentrations. Dimethylamine is a metabolite derived from choline degradation by the intestinal microbiota [67]. In environmental enteropathy, the excretion of metabolites derived from the gut microbiota is usually reduced due to the blunting of villi [68]. In contrast, protein undernutrition in mice increases metabolites derived from the intestinal microbiota, including dimethylamine [21, 67]. The increase in microbiota-derived metabolites has been associated with a concomitant reduction in choline, indicating that the intestinal microbiota increase choline metabolism after protein undernutrition [21]. Furthermore, dimethylamine has been linked to inflammatory diseases [69], systemic infections [70], and nonsurvivors compared to survivors with septic shock [69]. Therefore, the low concentration of dimethylamine after chronic consumption of the MAL-ED diet is not related to villous atrophy but to the nonuse of choline as a source of energy for the

**TABLE 3**<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR assignments for metabolites in urine samples at 500 MHz.

Compound	<sup>1</sup> H; Multiplicity: <i>J</i> (Hz)	HMBC ( <sup>13</sup> C- <sup>1</sup> H) (ppm)	Control median [Q1–Q3] Creatinine M/M <sup>1</sup>	Undernourished median [Q1–Q3] Creatinine M/M <sup>1</sup>	VIP score	<i>P</i> value
Lactate <sup>2</sup>	1.33 (d: 6.9) (4.12 (q:6.9))	63.23	0.616 [0.496–0.695]	0.277 [0.262–0.396]	0.7	0.002
Succinate <sup>2</sup>	2.41 (s)	181.04	0.153 [0.129–0.180]	0.098 [0.075–0.135]	0.5	0.014
Dimethylamine <sup>2</sup>	2.72 (s)	37.55	229.407 [175.737–272.969]	0.163 [0.147–0.205]	1.3	0.000
Creatinine	4.05 (s)	188.9; 169.9; 56.08	—	—	—	—
Taurine <sup>2</sup>	3.28 (t: 6.7) (3.42 (t: 6.7))	50.11 (38.08)	4.285 [3.862–4.848]	3.736 [2.775–5.078]	1.9	0.008
Betaine	3.26 (s) (3.90)	56.12; 69.05	0.247 [0.217–0.270]	0.218 [0.167–0.292]	0.6	0.065
Pyruvate <sup>2</sup>	2.35 (s)	n.d.	0.210 [0.190–0.243]	0.174 [0.113–0.223]	0.3	0.008

Abbreviations: d, doublet; HMBC, heteronuclear multiple bond correlation; n.d., not detected; NMR, nuclear magnetic resonance; PLS-DA, partial least squares-discriminant analysis; q, quadruplet; s, singlet; t, triplet; VIP, variable importance in the projection.

Table shows the comparison of metabolite contents with *P* values of statistical tests and VIP score from PLS-DA.

<sup>1</sup> Median and interquartile range – median [Q1–Q3]; Creatinine M/M – were obtained from 12 control samples and 20 malnourished samples from day 28.

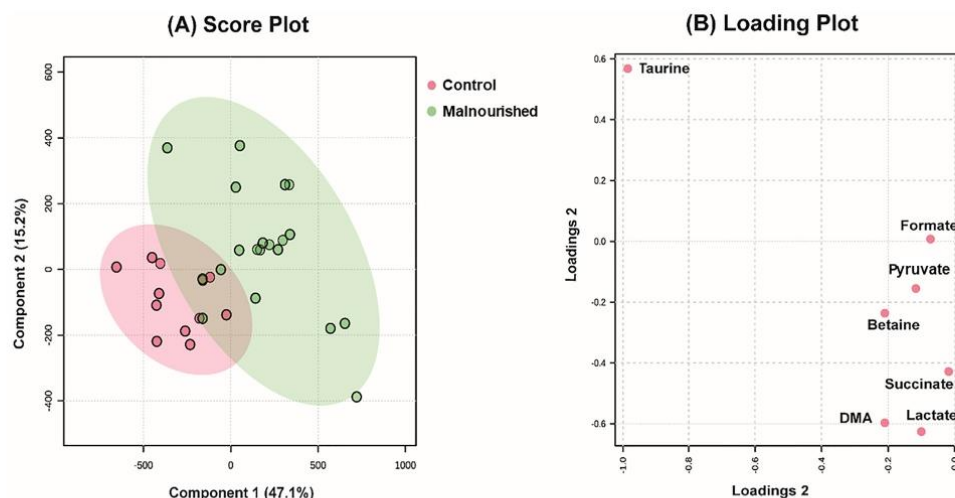
<sup>2</sup> Significant differences by Welch's *t* and Mann-Whitney *U* tests (*P* < 0.05).

intestinal microbiota, which probably reduces the risk of systemic infection and inflammatory disease.

Taurine is a nitrogenous compound with several physiological functions in the body, including carbohydrate and lipid metabolism [71], anti-inflammatory action [72], antioxidant activity, and increased muscle contraction, and it also plays an important role as a neurotransmitter in the central nervous system [73]. The low excretion of taurine in undernourished animals may indicate the metabolic dysfunction of the various body systems mentioned above; however, measuring the systemic concentration in this case would be more appropriate. The present study also observed a reduction in lactate, succinate, and pyruvate

concentrations after chronic consumption of the MAL-ED diet. These metabolites are involved in energy and muscle metabolism [67], suggesting a possible reduction in these pathways in undernourished animals.

The limitations of this study include the lack of analysis of undernutrition biomarkers such as anti-LPS IgA, zonulin, and intestinal fatty acid binding protein (I-FABP), which have been associated with childhood chronic undernutrition [46], as well as the absence of microbiota analysis to verify whether the new model generates dysbiosis, a condition associated with undernutrition [24]. Analysis of the baseline electrophysiological parameters in portions of the duodenum, ileum, and



**FIGURE 11.** Metabolic profile determined by nuclear magnetic resonance of animals submitted to consumption of the MAL-ED or control diet. A) PLS-DA score and (B) Loading of graphs based on Urine Display metabolic profiles after 28 d of consumption of the control (AIN-93M) and MAL-ED (undernourished) diets. Data are representative of an experimental line (*n* = 4–8). DMA, dimethylamine; MAL-ED, Malnutrition-Enteric Diseases; PLS-DA, partial least squares-discriminant analysis.



colon could also explain which segments contributed to the increase in paracellular permeability indicated by the lactulose and mannitol test. Furthermore, evaluating the electrophysiologic parameters in cotransport, the expression of intestinal transporters of peptides and carbohydrates, and tight junction proteins in the duodenum and ileum in the acute period would contribute to a better understanding of intestinal physiology during the consumption of a multideficiency diet. However, this study breaks new ground by developing a new experimental diet for undernutrition that represents the clinics of undernourished children undergoing complementary feeding in 7 low-income countries. This diet has emerged as a valuable experimental tool that can be used to better understand the pathophysiology of undernutrition and its association with enteric infections and environmental enteropathy and to search for more appropriate treatments for these pathologies [3]. Furthermore, we identified that moderate undernutrition had a greater impact on the intestinal morphofunctional barrier in the acute period, with important morphologic adaptations in the intestinal epithelium during the chronic period.

In conclusion, we developed an innovative diet for undernutrition based on the composition of the diet of undernourished children, followed in a cohort study, with a moderate deficiency in energy, protein, lipids, and zinc and a moderate increase in carbohydrates and fiber, capable of generating undernutrition in animals. The new MAL-ED diet reduced weight, compromised growth, and increased energy reserves in a more chronic period without causing edema or normal serum albumin concentrations. This diet damaged the integrity of the intestinal epithelial barrier, reduced the absorptive area associated with increased concentrations of FAT/CD36 mRNA during the acute period, and increased the total intestinal area and paracellular permeability during the chronic period. Thus, we propose a new clinically relevant murine model of undernutrition for the complementary feeding phase that can be used to better understand the relationship between undernutrition and enteric infections.

### Acknowledgments

We thank Professor Gerlyane Brito and Professor Diane Cavalcante for their technical support and scientific advice in histological analyses. We also thank the financial support agency. We also thank Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM (EDITAL N. 013/2022 – PRODUTIVIDADE – CT&I), the Postgraduate Program in Chemistry at the Federal University of Amazonas (PPGQ-UFAM), and Nuclear Magnetic Resonance Laboratory (NMRLab) of the Analytical Center of UFAM for the financial support, fellowships, and infrastructure for metabolomic analysis.

### Author contributions

The authors' responsibilities were as follows – SAR, BLM, AAML: designed the survey; SAR, ELRB, MLQ, XMQCF, LMVCM, JKdS, TMdF, HNV, CCdA, ADCS, FRMdM, AAdS: conducted the study; AAS, MOB: provided and conducted electrical bioimpedance; SAR, MAC, AH, BLM: data analysis and interpretation; SAR, BLM, AAML: wrote the article and have final responsibility for the content; and all authors: read and approved the final manuscript.

### Conflict of interest

AAML reports financial support was provided by National Council for Scientific and Technological Development and reports equipment, drugs, or supplies provided by the Bill & Melinda Gates Foundation. All other authors report no conflicts of interest.

### Funding

This study was funded by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq; n° 426032/2018-7). The CNPq did not participate in the conception, analysis or writing of this article. The Etiology, Risk Factors and Interactions of Enteric Infections and Malnutrition and the Consequences for Child Health and Development Project (MAL-ED) was a collaborative project supported by the Bill & Melinda Gates Foundation, the Foundation for the National Institutes of Health, and the National Institutes of Health/Fogarty International Center (grant number OPP47075).

### Data availability

Data described in the manuscript, code book, and analytic code will be made available upon request pending application and approval.

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.tjn.2024.02.001>.

### References

- [1] M. Garenne, D. Willie, B. Maire, O. Fontaine, R. Eeckels, A. Briand, et al., Incidence and duration of severe wasting in two African populations, *Public Health Nutr* 12 (11) (2009) 1974–1982, <https://doi.org/10.1017/S1368980009004972>.
- [2] R.L. Guerrant, M.D. DeBoer, S.R. Moore, R.J. Scharf, A.A.M. Lima, The impoverished gut—a triple burden of diarrhoea, stunting and chronic disease, *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 10 (4) (2013) 220–229, <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.239>.
- [3] R.L. Guerrant, D.T. Bolick, J.R. Swann, Modeling enteropathy or diarrhea with the top bacterial and protozoal pathogens: differential determinants of outcomes, *ACS Infect. Dis.* 7 (5) (2021) 1020–1031, <https://doi.org/10.1021/acinfed.0c00831>.
- [4] J.R. Galler, C.P. Bryce, M.L. Zichlin, G. Fitzmaurice, G.D. Eaglesfield, D.P. Waber, Infant malnutrition is associated with persisting attention deficits in middle adulthood, *J. Nutr.* 142 (4) (2012) 788–794, <https://doi.org/10.3945/jn.111.145441>.
- [5] M.D. DeBoer, A.A.M. Lima, R.B. Oría, R.J. Scharf, S.R. Moore, M.A. Luna, et al., Early childhood growth failure and the developmental origins of adult disease: do enteric infections and malnutrition increase risk for the metabolic syndrome? *Nutr. Rev.* 70 (11) (2012) 642–653, <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2012.00543.x>.
- [6] UNICEF, WHO, World Bank Group, Levels and trends in child malnutrition, Joint Child Malnutrition Estimates, 2021.
- [7] D. Headey, R. Heidkamp, S. Osendarp, M. Ruel, N. Scott, R. Black, et al., Impacts of COVID-19 on childhood malnutrition and nutrition-related mortality, *Lancet* 396 (10250) (2020) 519–521, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31647-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31647-0).
- [8] C.G. Victora, L. Adair, C. Fall, P.C. Hallal, R. Martorell, L. Richter, et al., Maternal and child undernutrition: consequences for adult health and human capital, *Lancet* 371 (9609) (2008) 340–357, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61692-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61692-4).
- [9] K.G. Dewey, S.L. Huffman, Maternal, infant, and young child nutrition: combining efforts to maximize impacts on child growth and micronutrient status, *Food Nutr. Bull.* 30 (2 Suppl) (2009) S187–S189, <https://doi.org/10.1177/15648265090302s201>.



- [10] WHO/UNICEF, Complementary Feeding of Young Children in Developing Countries: A Review of current scientific knowledge, 1998 [Internet]. Available from: <https://www.enonline.net/compfeedingreview>.
- [11] B.L.L. Maciel, P.N. Costa, J.Q. Filho, S.A. Ribeiro, F.A.P. Rodrigues, A.M. Soares, et al., Higher energy and zinc intakes from complementary feeding are associated with decreased risk of undernutrition in children from South America, Africa, and Asia, *J. Nutr.* 151 (1) (2021) 170–178, <https://doi.org/10.1093/jn/nxaa271>.
- [12] R.K. Campbell, V.M. Aguayo, Y. Kang, L. Dzied, V. Joshi, J. Waid, et al., Infant and young child feeding practices and nutritional status in Bhutan, *Matern. Child Nutr.* 14 (3) (2018) e12580, <https://doi.org/10.1111/mcn.12580>.
- [13] G. Ersino, C.J. Henry, G.A. Zello, Suboptimal feeding practices and high levels of undernutrition among infants and young children in the rural communities of Halaba and Zeway, Ethiopia, *Food Nutr. Bull.* 37 (3) (2016) 409–424, <https://doi.org/10.1177/0379572116658371>.
- [14] A. Owais, B. Schwartz, D.G. Kleinbaum, P.S. Suchdev, A.S. Faruque, S.K. Das, et al., Minimum acceptable diet at 9 months but not exclusive breastfeeding at 3 months or timely complementary feeding initiation is predictive of infant growth in rural Bangladesh, *PLOS ONE* 11 (10) (2016) e0165128, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165128>.
- [15] J. Raymond, M. Agaba, C. Mollay, J.W. Rose, N. Kassim, Analysis of nutritional adequacy of local foods for meeting dietary requirements of children aged 6–23 months in rural central Tanzania, *Arch. Public Health* 75 (2017) 60, <https://doi.org/10.1186/s13690-017-0226-4>.
- [16] N.R. Teodósio, E.S. Lago, S.A. Romani, R.C. Guedes, A regional basic diet from northeast Brazil as a dietary model of experimental malnutrition, *Arch. Latinoam. Nutr.* 40 (4) (1990) 533–547.
- [17] T. May, K.C. Klatt, J. Smith, E. Castro, M. Manary, M.A. Caudill, et al., Choline supplementation prevents a hallmark disturbance of kwashiorkor in weanling mice fed a maize vegetable diet: hepatic steatosis of undernutrition, *Nutrients* 10 (5) (2018) 653, <https://doi.org/10.3390/nu10050653>.
- [18] L.V. Blanton, M.R. Charbonneau, T. Salih, M.J. Barratt, S. Venkatesh, O. Ilkaveya, et al., Gut bacteria that prevent growth impairments transmitted by microbiota from malnourished children, *Science* 351 (6275) (2016) aad3311, <https://doi.org/10.1126/science.aad3311>.
- [19] S. Attia, M. Feenstra, N. Swain, M. Cuesta, R.H.J. Bandsma, Starved guts: morphologic and functional intestinal changes in malnutrition, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 65 (5) (2017) 491–495, <https://doi.org/10.1097/mpg.0000000000001629>.
- [20] C.Y. Park, S. Park, M.S. Kim, H.K. Kim, S.N. Han, Effects of mild calorie restriction on lipid metabolism and inflammation in liver and adipose tissue, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 490 (3) (2017) 636–642, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.06.090>.
- [21] J. Mayneris-Perkachs, D.T. Bolick, J. Leng, G.L. Medlock, G.L. Kolling, J.A. Papin, et al., Protein- and zinc-deficient diets modulate the murine microbiome and metabolic phenotype, *Am. J. Clin. Nutr.* 104 (5) (2016) 1253–1262, <https://doi.org/10.3945/ajcn.116.131797>.
- [22] M. Wada, A. Tamura, N. Takahashi, S. Tsukita, Loss of claudins 2 and 15 from mice causes defects in paracellular Na<sup>+</sup> flow and nutrient transport in gut and leads to death from malnutrition, *Gastroenterology* 144 (2) (2013) 369–380, <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.10.035>.
- [23] T. Chalvon-Demersay, P.C. Even, C. Chaumontet, J. Piedcoq, B. Viollet, C. Gaudichon, et al., Modifying the dietary carbohydrate-to-protein ratio alters the postprandial macronutrient oxidation pattern in liver of AMPK-deficient mice, *J. Nutr.* 147 (9) (2017) 1669–1676, <https://doi.org/10.3945/jn.117.250803>.
- [24] E.M. Brown, M. Włodarska, B.P. Willing, P. Vonaesch, J. Han, L.A. Reynolds, et al., Diet and specific microbial exposure trigger features of environmental enteropathy in a novel murine model, *Nat. Commun.* 6 (2015) 7806, <https://doi.org/10.1038/ncomms8806>.
- [25] M. Schwarzer, K. Makki, G. Storelli, I. Machuca-Gayet, D. Srutkova, P. Hermanova, et al., Lactobacillus plantarum strain maintains growth of infant mice during chronic undernutrition, *Science* 351 (6275) (2016) 854–857, <https://doi.org/10.1126/science.aad8588>.
- [26] M.S. Carle, Validation of bioimpedance spectroscopy by assessing, PhD Thesis, University of Alabama, 2010.
- [27] U. Erben, C. Loddikenemper, K. Doerfel, S. Spieckermann, D. Haller, M.M. Heimesaat, et al., A guide to histomorphological evaluation of intestinal inflammation in mouse models, *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 7 (8) (2014) 4557–4576.
- [28] M.S. Barboza Jr., T.M.J. Silva, R.L. Guerrant, A.A.M. Lima, Measurement of intestinal permeability using mannitol and lactulose in children with diarrheal diseases, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 32 (12) (1999) 1499–1504, <https://doi.org/10.1590/s0100-879x1999001200008>.
- [29] A.M. Soares, Secreção paracelular de sódio durante a absorção de substratos sódio dependente em mucosa ileal de coelho montada em câmara de Ussing, 1996. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1996.
- [30] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔCT</sup> method, *Methods* 25 (4) (2001) 402–408, <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- [31] F.A.P. Rodrigues, A.D.D.C. Santos, P.H.Q.S. de Medeiros, M.M.G. Prata, T.C.S. Santos, J.A. da Silva, et al., Gingerol suppresses sepsis-induced acute kidney injury by modulating methylsulfonylmethane and dimethylamine production, *Sci. Rep.* 8 (1) (2018) 12154, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30522-6>.
- [32] M. Posada-Ayala, I. Zubiri, M. Martín-Lorenzo, A. Sanz-Maroto, D. Molero, L. Gonzalez-Calero, et al., Identification of a urine metabolomic signature in patients with advanced-stage chronic kidney disease, *Kidney Int* 85 (1) (2014) 103–111, <https://doi.org/10.1038/ki.2013.328>.
- [33] L. Da Silva, M. Godejohann, F.P. Martin, S. Collino, A. Bürkle, M. Moreno-Villanueva, et al., High-resolution quantitative metabolome analysis of urine by automated flow injection NMR, *Anal. Chem.* 85 (12) (2013) 5801–5809, <https://doi.org/10.1021/ac4004776>.
- [34] J. Trygg, E. Holmes, T. Lundstedt, Chemometrics in metabolomics, *J. Proteome Res.* 6 (2) (2007) 469–479, <https://doi.org/10.1021/pr060594q>.
- [35] H. Pelantová, M. Bugánová, J. Anýž, B. Železná, L. Maletínská, D. Novák, et al., Strategy for NMR metabolomic analysis of urine in mouse models of obesity—from sample collection to interpretation of acquired data, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 115 (2015) 225–235, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.06.036>.
- [36] K. Corware, V. Yardley, C. Mack, S. Schuster, H. Al-Hassi, S. Herath, et al., Protein energy malnutrition increases arginase activity in monocytes and macrophages, *Nutr. Metab. (Lond.)* 11 (1) (2014) 51, <https://doi.org/10.1186/1743-7075-11-51>.
- [37] J. Eyzaguirre-Velásquez, L. Olavarría-Ramírez, C. González-Arancibia, C. Díaz-Merino, R. Ariz, S. López, et al., Protein malnutrition during juvenile age increases ileal and colonic permeability in rats, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 64 (5) (2017) 707–712, <https://doi.org/10.1097/mpg.0000000000001324>.
- [38] D.T. Bolick, T. Chen, L.A. Alves, Y. Tong, D. Wu, L.T. Joyner II, et al., Intestinal cell kinase is a novel participant in intestinal cell signaling responses to protein malnutrition, *PLOS ONE* 9 (9) (2014) e106902, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106902>.
- [39] D.T. Bolick, G.L. Kolling, J.H. Moore, L.A. de Oliveira, K. Tung, C. Philipson, et al., Zinc deficiency alters host response and pathogen virulence in a mouse model of enteroregulatory Escherichia coli-induced diarrhea, *Gut Microbes* 5 (5) (2014) 618–627, <https://doi.org/10.4161/19490976.2014.969642>.
- [40] I.N. Núñez, C.M. Galdeano, E. Carmuega, R. Weill, A. de Moreno de LeBlanc, G. Perdigón, Effect of a probiotic fermented milk on the thymus in BALB/c mice under non-severe protein-energy malnutrition, *Br. J. Nutr.* 110 (3) (2013) 500–508, <https://doi.org/10.1017/s0007114512005302>.
- [41] F. Pan, L. Zhang, M. Li, Y. Hu, B. Zeng, H. Yuan, et al., Predominant gut Lactobacillus murinus strain mediates anti-inflammatory effects in calorie-restricted mice, *Microbiome* 6 (1) (2018) 54, <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0440-5>.
- [42] S.A. Ribeiro, F.A.P. Rodrigues, M.A.F. Clementino, H.D.N. Veras, R.C.L. Siqueira, P.H.Q.S. de Medeiros, et al., Consumption of a multi-deficient diet causes dynamic changes in the intestinal morphofunctional barrier, body composition and impaired physical development in post-weaning mice, *Br. J. Nutr.* 129 (5) (2023) 745–758, <https://doi.org/10.1017/s0007114522001271>.
- [43] I.C. Sampaio, P.H. Medeiros, F.A. Rodrigues, P.A. Cavalcante, S.A. Ribeiro, J.S. Oliveira, et al., Impact of acute undernutrition on growth, ileal morphology and nutrient transport in a murine model, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 49 (10) (2016) e5340, <https://doi.org/10.1590/1414-431x20165340>.
- [44] A. Briend, T. Khara, C. Dolan, Wasting and stunting—similarities and differences: policy and programmatic implications, *Food Nutr. Bull.* 36 (1 Suppl) (2015) S15–S23, <https://doi.org/10.1177/15648265150361s103>.

- [45] S. Attia, C.J. Versloot, W. Voskuil, S.J. van Vliet, V. Di Giovanni, L. Zhang, et al., Mortality in children with complicated severe acute malnutrition is related to intestinal and systemic inflammation: an observational cohort study, *Am. J. Clin. Nutr.* 104 (5) (2016) 1441–1449, <https://doi.org/10.3945/ajcn.116.130518>.
- [46] R.L. Guerrant, A.M. Leite, R. Pinkerton, P.H.Q.S. Medeiros, P.A. Cavalcante, M. DeBoer, et al., Biomarkers of environmental enteropathy, inflammation, stunting, and impaired growth in children in Northeast Brazil, *PLOS ONE* 11 (9) (2016) e0158772, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158772>.
- [47] A.A.M. Lima, R.B. Oriá, A.M. Soares, J.Q. Filho, F. de Sousa Jr., C.B. Abreu, et al., Geography, population, demography, socioeconomic, anthropometry, and environmental status in the MAL-ED cohort and case-control study sites in Fortaleza, Ceará, Brazil, *Clin. Infect. Dis.* 59 (Suppl 4) (2014) S287–S294, <https://doi.org/10.1093/cid/ciu438>.
- [48] C.A.A. de Queiroz, S.G.C. Fonseca, P.B. Frota, L.L. Figueiredo, K.S. Aragão, C.E.C. Magalhães, et al., Zinc treatment ameliorates diarrhea and intestinal inflammation in undernourished rats, *BMC Gastroenterol* 14 (2014) 136, <https://doi.org/10.1186/1471-230x-14-136>.
- [49] M.G. Coulthard, Oedema in kwashiorkor is caused by hypoalbuminaemia, *Paediatr. Int. Child Health* 35 (2) (2015) 83–89, <https://doi.org/10.1179/2046905514y.0000000154>.
- [50] N.L. Lima, A.M. Soares, R.M.S. Mota, H.S.A. Monteiro, R.L. Guerrant, A.A.M. Lima, Wasting and intestinal barrier function in children taking alanyl-glutamine-supplemented enteral formula, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 44 (3) (2007) 365–374, <https://doi.org/10.1097/mpg.0b013e31802eecd>.
- [51] P.M. Ueno, R.B. Oriá, E.A. Maier, M. Guedes, O.G. de Azevedo, D. Wu, et al., Alanyl-glutamine promotes intestinal epithelial cell homeostasis in vitro and in a murine model of weanling undernutrition, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 301 (4) (2011) G612–G622, <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00531.2010>.
- [52] R.P. Ferraris, H.V. Carey, Intestinal transport during fasting and malnutrition, *Annu. Rev. Nutr.* 20 (2000) 195–219, <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.20.1.195>.
- [53] C.P. Earthman, J.R. Matthie, P.M. Reid, I.T. Harper, E. Ravussin, W.H. Howell, A comparison of bioimpedance methods for detection of body cell mass change in HIV infection, 1985, *J. Appl. Physiol.* 88 (3) (2000) 944–956, <https://doi.org/10.1152/jappl.2000.88.3.944>.
- [54] D. Burman, The jejunal mucosa in kwashiorkor, *Arch. Dis. Child.* 40 (213) (1965) 526–531, <https://doi.org/10.1136/adc.40.213.526>.
- [55] F.K. Welsh, S.M. Farmery, K. MacLennan, M.B. Sheridan, G.R. Barclay, P.J. Guillou, J.V. Reynolds, Gut barrier function in malnourished patients, *Gut* 42 (3) (1998) 396–401, <https://doi.org/10.1136/gut.42.3.396>.
- [56] A. Young, R.J. Levin, Diarrhoea of famine and malnutrition: investigations using a rat model. 1. Jejunal hypersecretion induced by starvation, *Gut* 31 (1) (1990) 43–53, <https://doi.org/10.1136/gut.31.1.43>.
- [57] N. Darmon, M. Heyman, C. Candall, M.A. Blaton, J.F. Desjeux, Anaphylactic intestinal response to milk proteins during malnutrition in guinea pigs, *Am. J. Physiol.* 270 (3 Pt 1) (1996) G442–G448, <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1996.270.3.g442>.
- [58] N. Darmon, M.A. Pélissier, M. Heyman, R. Albrecht, J.F. Desjeux, Oxidative stress may contribute to the intestinal dysfunction of weanling rats fed a low protein diet, *J. Nutr.* 123 (6) (1993) 1068–1075, <https://doi.org/10.1093/jn/123.6.1068>.
- [59] R.P. Ferraris, Dietary and developmental regulation of intestinal sugar transport, *Biochem. J.* 360 (Pt 2) (2001) 265–276, <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3600265>.
- [60] A. Blikslager, E. Hunt, R. Guerrant, M. Rhoads, R. Argenzio, Glutamine transporter in crypts compensates for loss of villus absorption in bovine cryptosporidiosis, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 281 (3) (2001), <https://doi.org/10.1152/ajpgi.2001.281.3.g645>. G645–G645.
- [61] D.F. Pinheiro, P.D.G. Pacheco, P.V. Alvarenga, J. Buratini Jr., A.C.S. Castilho, P.F. Lima, et al., Maternal protein restriction affects gene expression and enzyme activity of intestinal disaccharidases in adult rat offspring, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 46 (3) (2013) 287–292, <https://doi.org/10.1590/1414-431x20122561>.
- [62] A. Horowitz, S.D. Chanez-Paredes, X. Haest, J.R. Turner, Paracellular permeability and tight junction regulation in gut health and disease, *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 20 (7) (2023) 417–432, <https://doi.org/10.1038/s41575-023-00766-3>.
- [63] B. Amadi, E. Besa, K. Zyambo, P. Kaonga, J. Louis-Auguste, K. Chandwe, et al., Impaired barrier function and autoantibody generation in malnutrition enteropathy in Zambia, *EBioMedicine* 22 (2017) 191–199, <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.07.017>.
- [64] D.Y. Hui, E.D. Labonté, P.N. Howles, Development and physiological regulation of intestinal lipid absorption. III. Intestinal transporters and cholesterol absorption, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 294 (4) (2008) G839–G843, <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00061.2008>.
- [65] X. Zhao, K.D.R. Setchell, R. Huang, I. Mallawaarachchi, L. Ehsan, E. Dobrzykowski III, et al., Bile acid profiling reveals distinct signatures in undernourished children with environmental enteric dysfunction, *J. Nutr.* 151 (12) (2021) 3689–3700, <https://doi.org/10.1093/jn/txab321>.
- [66] E.N. Smit, F.A.J. Muskiet, E.R. Boersma, The possible role of essential fatty acids in the pathophysiology of malnutrition: a review, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 71 (4) (2004) 241–250, <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2004.03.019>.
- [67] J. Mayneris-Perxachs, J.R. Swann, Metabolic phenotyping of malnutrition during the first 1000 days of life, *Eur. J. Nutr.* 58 (3) (2019) 909–930, <https://doi.org/10.1007/s00394-018-1679-0>.
- [68] M. Farràs, K. Chandwe, J. Mayneris-Perxachs, B. Amadi, J. Louis-Auguste, E. Besa, et al., Characterizing the metabolic phenotype of intestinal villus blunting in Zambian children with severe acute malnutrition and persistent diarrhea, *PLOS ONE* 13 (3) (2018) e0192092, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192092>.
- [69] B. Mickiewicz, P. Tam, C.N. Jenne, C. Leger, J. Wong, B.W. Winston, et al., Integration of metabolic and inflammatory mediator profiles as a potential prognostic approach for septic shock in the intensive care unit, *Crit. Care* 19 (1) (2015) 11, <https://doi.org/10.1186/s13054-014-0729-0>.
- [70] J. De Buck, R. Shaykhtudinov, H.W. Barkema, H.J. Vogel, Metabolomic profiling in cattle experimentally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, *PLOS ONE* 9 (11) (2014) e111872, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111872>.
- [71] S. Murakami, Role of taurine in the pathogenesis of obesity, *Mol. Nutr. Food Res.* 59 (7) (2015) 1353–1363, <https://doi.org/10.1002/mnfr.201500067>.
- [72] T. Kato, S. Okita, S. Wang, M. Tsunekawa, N. Ma, The effects of taurine administration against inflammation in heavily exercised skeletal muscle of rats, *Adv. Exp. Med. Biol.* 803 (2015) 773–784, [https://doi.org/10.1007/978-3-319-15126-7\\_62](https://doi.org/10.1007/978-3-319-15126-7_62).
- [73] M. Zhang, I. Izumi, S. Kagamimori, S. Sokejima, T. Yamagami, Z. Liu, et al., Role of taurine supplementation to prevent exercise-induced oxidative stress in healthy young men, *Amino Acids* 26 (2) (2004) 203–207, <https://doi.org/10.1007/s00726-003-0002-3>.



## ANEXO D – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa ao Projeto Resistência

UFC - HOSPITAL  
UNIVERSITÁRIO WALTER  
CANTÍDIO DA UNIVERSIDADE



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Matriz de cartões TaqMan e cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas aplicadas ao controle e profilaxia de resistência aos antimicrobianos em bactérias Gram-negativas no Hospital Universitário em Fortaleza, CE, Brasil

**Pesquisador:** Aldo Ângelo Moreira Lima

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 03300218.2.3001.5045

**Instituição Proponente:** Hospital Universitário Walter Cantídio/ Universidade Federal do

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.276.113

#### Apresentação do Projeto:

Este estudo irá desenvolver e inovar novos métodos moleculares para o controle e combate em isolados amostrais de bactérias Gram-negativas (GNB) adquiridas na unidade de terapia intensiva (UTI) e resistentes aos antimicrobianos beta-lactâmicos e fluoroquinolonas em uso no Hospital Universitário em Fortaleza, CE, Brasil. Serão analisadas nesse estudo cepas de GNBs resistentes aos antimicrobianos beta-lactâmicos e fluoroquinolonas, isoladas de pacientes internados na UTI clínica do HUWC, que apresentem quadro infeccioso em diferentes sítios e cujo agente etiológico envolvido seja identificado laboratorialmente. Serão incluídos 350 isolados bacterianos provenientes (Cêpas de bactéria de cultura) de: 1) infecções de corrente sanguínea (hemocultura - HCU) e outros sítios de infecção considerados nobres, como líquidos cefalorraquidiano (LCR), pleural, peritoneal, pericárdio, sinovial, entre outros; 2) infecções do trato urinário; 3) cultura de secreções, como lavado bronco-alveolar, aspirado traqueal, escarro, fragmentos de pele, órgãos e ossos, drenagens e abscessos, ferida cirúrgica e outros sítios anatômicos que apresentem indícios de infecção quando avaliados pelo clínico; 4) culturas de swab retal para vigilância, sem infecção aparente.

#### Hipótese:

Postula-se que o desenvolvimento e inovação de novos métodos moleculares para a identificação,

**Endereço:** Rua Capitão Francisco Pedro, 1290

**Bairro:** Rodolfo Teófilo

**CEP:** 60.430-370

**UF:** CE

**Município:** FORTALEZA

**Telefone:** (85)3366-8589

**Fax:** (85)99267-4630

**E-mail:** cephuwc@huwc.ufc.br

## ANEXO E – Comprovante de submissão do artigo técnico do anexo B

For consideration in *Molecular Microbiology*

Page 1 of 44

**Molecular Microbiology**

Research Article

### Transcriptomic Remodeling and Survival Strategies of Extensively Drug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Under Meropenem Pressure

<b>Submission ID</b>	bce728a8-3aa8-40ff-a7f5-7a425a4b6476
<b>Submission Version</b>	Initial Submission
<b>PDF Generation</b>	03 May 2025 13:27:09 EST by Atypon ReX

---

#### Authors

**Xhaulla Maria Quariguasi Cunha Fonseca**

[CRediT](#)  
Investigation, Writing - original draft, Methodology, Validation, Visualization

**Affiliations**

- Infectious Diseases Laboratory, Institute of Biomedicine, Department of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, 60430-270, Brazil
- Medical Science Postgraduation Program, Department of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, 60430-270, Brazil

---

**Marco Clementino**  
*Corresponding Author*  
*Submitting Author*

[ORCID](#)  
<https://orcid.org/0000-0002-0628-8047>

[CRediT](#)  
Conceptualization, Investigation, Writing - original draft, Methodology, Validation, Visualization, Writing - review & editing, Formal analysis, Project administration, Data curation, Supervision

**Affiliations**

- Infectious Diseases Laboratory, Institute of Biomedicine, Department of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, 60430-270, Brazil
- Molecular Toxinology Laboratory, Institute of Biomedicine, Department of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, 60430-270, Brazil

---

**Rafhaella Nogueira Della Guardia Gondim**

[CRediT](#)  
Investigation, Methodology

**Affiliations**

- Molecular Toxinology Laboratory, Institute of Biomedicine, Department of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, 60430-270, Brazil