

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 26/03/2028.

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA
CELULAR, MOLECULAR E MICROBIOLOGIA)**

**CARACTERIZAÇÃO DE BACTERÍÓFAGOS COMO ALTERNATIVA PARA O
TRATAMENTO CONVENCIONAL DE INFECÇÕES CAUSADAS POR *Klebsiella*
MULTIRRESISTENTES**

GIOVANE BÖERNER HYPOLITO

**Rio Claro – SP
2026**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA
CELULAR, MOLECULAR E MICROBIOLOGIA)**

**CARACTERIZAÇÃO DE BACTERÍOFAGOS COMO ALTERNATIVA PARA O
TRATAMENTO CONVENCIONAL DE INFECÇÕES CAUSADAS POR *Klebsiella*
MULTIRRESISTENTES**

GIOVANE BÖERNER HYPOLITO

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Biologia Celular, Molecular e Microbiologia).

Orientador: Dr. Henrique Ferreira.

Coorientador: Dra. Layla Farage Martins.

**Rio Claro – SP
2026**

H998c	Hypolito, Giovane Böerner Caracterização de bacteriófagos como alternativa para o tratamento convencional de infecções causadas por <i>Klebsiella</i> multirresistentes / Giovane Böerner Hypolito. -- Rio Claro, 2026 118 p. : il., tabs. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Rio Claro Orientador: Henrique Ferreira Coorientadora: Layla Farage Martins 1. Endolisina. 2. Despolimerase. 3. Fago. 4. Bioinformática. 5. MDR. I. Título.
-------	--

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

As bactérias multirresistentes estão disseminadas por todo o mundo, inclusive no Brasil, que já registrou diversos casos. O número de internações e infecções tende a aumentar cada vez mais, enquanto as opções terapêuticas diminuem em razão da disseminação de mecanismos de resistências à antibióticos. Com isso, é de extrema importância os estudos voltados para os tratamentos alternativos que podem ser usados inclusive em conjunto com os antibióticos. Um desses tratamentos é a utilização de bacteriófagos líticos que são predadores naturais de bactérias. Assim, esse trabalho investigou isolados de bacteriófagos que infectam *Klebsiella pneumoniae* para explorar suas características e fornecer subsídios para um possível uso desses vírus em tratamentos alternativos das infecções causadas por *Klebsiella* spp.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

Multidrug-resistant bacteria are widespread throughout the world, and several cases have already been recorded in Brazil. The trend in the number of hospitalizations and infections caused by them is increasing more and more. The use of antibiotics is becoming increasingly restricted, and the resistance of strains to them is growing. Therefore, studies focused on alternative treatments that can be used in conjunction with antibiotics are extremely important. One of these treatments is the use of bacteriophages, which are natural predators of bacteria. Thus, this work studied and investigated isolates of bacteriophages that infect *Klebsiella pneumoniae* to explore their characteristics and conclude whether there is a possibility of these viruses being used in the treatment of infections. If innovative characteristics are found, the study can be continued for the development of formulations that can be applied in the clinical area.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Caracterização de bacteriófagos como alternativa para o tratamento convencional de infecções causadas por *Klebsiella* multirresistentes

AUTOR: GIOVANE BÖERNER HYPOLITO

ORIENTADOR: HENRIQUE FERREIRA

COORIENTADORA: LAYLA FARAGE MARTINS

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas (Biologia Celular, Molecular e Microbiologia), área: Estrutura, Função e Produção de Biomoléculas pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. HENRIQUE FERREIRA (Participação Virtual)
Departamento de Biologia Geral E Aplicada / UNESP / Câmpus de Rio Claro - IB

Prof. Dr. MARCO AURÉLIO TAKITA (Participação Virtual)
Centro de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Citros Sylvio Moreira / Instituto Agronômico de Campinas

Profa. Dra. JÉSSICA DUARTE DA SILVA (Participação Virtual)
Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes / UNICAMP - Instituto de Biologia

Prof. Dr. MAURICIO BACCI JUNIOR (Participação Virtual)
Departamento de Biologia Geral e Aplicada / UNESP / Câmpus de Rio Claro - IB

Rio Claro, 26 de março de 2026.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a oportunidade que o Professor Henrique Ferreira me cedeu no seu laboratório desde a minha trajetória do mestrado. Foram muitos anos caminhando e aprendendo tanto na parte da pesquisa e da ciência como pessoa também. Obrigado a todos os companheiros de laboratório que conheci e se criaram laços de amizade, Caio, Natália, Mário, Marin, Carolina e a todos que passaram no laboratório.

Queria agradecer imensamente a minha família, meus pais e minhas irmãs que sempre me apoiaram em todas as escolhas que fiz na minha vida. A meus gatos, Pitoco e Catarina, pela companhia e carinho mesmo estando longe de casa. Queria agradecer ao meu companheiro, Michel, por estar sempre ao meu lado e que me sustentou todos esses anos não permitindo que eu caísse.

Por fim, gostaria de agradecer a UNESP que foi minha casa desde a graduação e foi a minha moradia durante toda a minha caminhada acadêmica. O presente trabalho foi desenvolvido com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) através da concessão de bolsa de estudo de Doutorado de número de processo 165770/2021-0.

RESUMO

Os bacteriófagos (fagos) são antagonistas naturais de bactérias, o que os torna candidatos interessantes para terapias alternativas contra infecções. Além da partícula viral, as enzimas que eles geram representam alvos biotecnológicos promissores. O aumento de cepas bacterianas multirresistentes (MDR) intensificou a necessidade de novas técnicas de controle. Com isso, este estudo examinou as espécies de *Klebsiella spp.* e isolados de bacteriófagos depositados na coleção do laboratório para investigar suas propriedades em aplicações terapêuticas. Além disso, as enzimas virais endolisinas e depolimerases desses isolados foram investigadas com o objetivo de identificar, isolar, expressar e purificar buscando alvos com ação contra biofilme e peptidoglicano. **Capítulo 1:** este projeto buscou caracterizar bacteriófagos de *Klebsiella spp.*, uma espécie bacteriana de considerável preocupação global, para explorar seu potencial como alternativa terapêutica no combate a infecções. Análises de dados genômicos foram realizadas em isolados de fagos e cepas de *Klebsiella*, em conjunto com a caracterização biológica dos fagos sob diversas condições. Os resultados revelaram que os isolados de fagos são distintos entre si, identificando os gêneros *Webervirus*, *Drulisvirus*, *Koutsourovirus* e *Taipeivirus*, além de um novo gênero. Os fagos demonstraram estabilidade em diversas temperaturas (−80 °C, −20 °C, 4 °C, 20 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C) e em uma faixa de pH de 7,5 a 11,0. O espectro de infecção das cepas de *Klebsiella* examinadas apresentou um espectro limitado de hospedeiros. As linhagens reconhecidas de *Klebsiella* compreendem as subespécies *Klebsiella pneumoniae* e *Klebsiella quasipneumoniae*. Algumas das linhagens identificadas foram designadas como ST258 (KH1, KH55 e KH92). Genes associados à resistência a carbapenemases foram identificados em clones ST258, apesar de sua baixa pontuação de virulência. Os resultados destacam a importância da identificação de fagos que possam atingir eficazmente cepas multirresistentes e que sejam adequados para uso terapêutico. **Capítulo 2:** as enzimas de fagos são notáveis por sua capacidade de superar a resistência microbiana. O objetivo deste estudo foi examinar endolisinas e depolimerases derivadas de bacteriófagos de *Klebsiella* como um potencial tratamento para infecções causadas por *Klebsiella pneumoniae*. Endolisinas são enzimas que destroem o peptidoglicano bacteriano internamente, enquanto depolimerases degradam biofilmes, podendo ter como alvo o EPS, CPS e LPS da bactéria. Seis endolisinas virais foram identificadas, produzidas e avaliadas contra extratos de bactérias Gram-negativas em ágar e pelo ensaio de redução da turbidez de esferoplastos de *P. aeruginosa*. Apenas uma única enzima, isolada do fago KP62, demonstrou atividade enzimática. A atividade das depolimerases foi avaliada em uma camada de células hospedeiras de *Klebsiella*, não revelando

halo de degradação, o que indica que as enzimas purificadas não possuem atividade. A estrutura da endolisina KP26 revelou uma proporção significativa de α -hélices. Este estudo ilustra os desafios na obtenção de uma endolisina ou despolimerase funcionais, o que torna necessária a expansão da pesquisa nesta área para abordar as lacunas existentes e investigar as enzimas virais.

Palavras-chave: endolisina, despolimerase, fago, bioinformática, MDR.

ABSTRACT

Bacteriophages (phages) are natural antagonists of bacteria, making them interesting candidates for alternative therapies against infections. In addition to the viral particle, the enzymes they generate represent promising biotechnological targets. The increase in multidrug-resistant (MDR) bacterial strains has intensified the need for new control techniques. Therefore, this study examined *Klebsiella* spp. species and bacteriophage isolates deposited in the laboratory collection to investigate their properties in therapeutic applications. Furthermore, the viral enzymes of these isolates were investigated with the aim of identifying, isolating, expressing, and purifying them, seeking targets with action against biofilm and peptidoglycan. **Chapter 1:** This project sought to characterize bacteriophages of *Klebsiella* spp., a bacterial species of considerable global concern, to explore their potential as a therapeutic alternative in combating infections. Genomic data analyses were performed on phage isolates and *Klebsiella* strains, along with biological characterization of the phages under various conditions. The results revealed that the phage isolates are distinct from each other, identifying the genera Webervirus, Drulisvirus, Koutsourovirus, and Taipeivirus, in addition to a new genus. The phages demonstrated stability at various temperatures (−80 °C, −20 °C, 4 °C, 20 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C) and in a pH range of 7.5 to 11.0. The infection spectrum of the examined *Klebsiella* strains showed a limited host range. The recognized *Klebsiella* lineages comprise the subspecies *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella quasipneumoniae*. Some of the identified lineages were designated as ST258 (KH1, KH55, and KH92). Genes associated with carbapenemase resistance were identified in ST258 clones, despite their low virulence score. The results highlight the importance of identifying phages that can effectively target multidrug-resistant strains and are suitable for therapeutic use. **Chapter 2:** Phage enzymes are notable for their ability to overcome microbial resistance. The aim of this study was to examine endolysins and depolymerases derived from *Klebsiella* bacteriophages as a potential treatment for infections caused by *Klebsiella pneumoniae*. Endolysins are enzymes that destroy bacterial peptidoglycan internally, while depolymerases degrade biofilms, potentially targeting EPS, CPS, and LPS of the bacteria. Six viral endolysins were identified, produced, and evaluated against extracts of Gram-negative bacteria on agar and *Pseudomonas aeruginosa* spheroplasts. Only one enzyme, isolated from phage KP62, demonstrated enzymatic activity. The activity of the depolymerases was evaluated in a layer of *Klebsiella* host cells, revealing no degradation halo, indicating that the purified enzymes are not active. The structure of endolysin KP26 revealed a significant proportion of α -helices. This study illustrates the challenges in obtaining a functional endolysin

or depolymerase, making it necessary to expand research in this area to address existing gaps and investigate viral enzymes.

Keywords: endolysin, depolymerase, phage, bioinformatics, MDR.

Title: Characterization of bacteriophages as a potential alternative for the treatment of multidrug-resistant *Klebsiella* infections.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Árvore filogenética baseada na distância genômica construída pelo VICTOR. As comparações pareadas foram calculadas usando o método Genome-BLAST Distance Phylogeny (GBDP), usando a fórmula D0. Grifado em vermelho são os fagos usados nesse estudo..... 44
- Figura 2.** Árvore de proteoma construída pelo ViPTree. A árvore é baseada na similaridade das sequências dos genomas por tBLASTx. Os fagos utilizados nesse estudo estão com uma estrela em vermelho. 45
- Figura 3.** Agrupamento dos fagos de *Klebsiella* baseados em ANI usando o algoritmo MCL. Os nós representam um genoma de fago, enquanto as cores indicam os diferentes clusters formados por base da similaridade. Os fagos destacados com a seta vermelha são os fagos analisados esse trabalho..... 46
- Figura 4.** Agrupamento dos fagos de *Klebsiella* baseados em AAI usando o algoritmo MCL. Os nós representam um genoma de fago, enquanto as cores indicam os diferentes cluster formados por base da similaridade. Os fagos destacados com a seta vermelha são os fagos analisados nesse trabalho..... 46
- Figura 5.** Porcentagem de similaridade genômica entre os fagos. Os valores foram calculados utilizando o VIRIDIC. As coordenadas verticais e horizontais correspondem aos fagos estudados nesse trabalho..... 47
- Figura 6.** Análise de pangenoma utilizando o Roary. (A) Gráfico mostrando a quantidade de genes core e acessórios (shell e cloud) calculado pelo Roary. As linhagens de *Klebsiella* compartilham 3430 genes cores (presentes em pelo menos 7 dos 8 genomas). Os genes shell estão presentes entre 1 e 7 genomas, os quais 2485 foram identificados e os genes cloud presente em apenas 1 genoma (2658 genes). (B) Gráfico em barra mostrando o número de genes (eixo y) pelo número de genomas (eixo X). A maioria dos genes está distribuído em todos os genomas (acima de 3000 genes em 8 genomas) e em apenas um genoma (acima de 2500)..... 50
- Figura 7.** Matriz da análise de pangenoma pelo Roary. Na direita há a árvore filogenética e ao lado a matriz mostrando a presença de genes (azul) e a ausência (branco) presentes nas linhagens de *Klebsiella*..... 51
- Figura 8.** A estabilidade dos fagos em diversas condições de temperatura foi contabilizada em log PFU/mL. Os isolados de bacteriófagos foram incubados em diversas condições de temperatura e contabilizados por plaqueamento de camada dupla de ágar. As barras indicam o desvio padrão das amostras. 54

Figura 9. A estabilidade dos fagos em diversas condições de pH foi contabilizada em log PFU/mL. Os isolados de bacteriófagos foram incubados em diversas condições de pH e contabilizados por plaqueamento de camada dupla de ágar. As barras indicam o desvio padrão das amostras.....	55
Figura 10. Árvore de proteoma construída pelo ViPTree do fago KP47. A árvore é baseada na similaridade das sequências dos genomas por tBLASTx. O fago KP47 está representado pela estrela vermelha na árvore. É possível observar que ele forma um cluster com fagos pertencentes à família Drexlerviridae.....	56
Figura 11. Porcentagem de similaridade genômica entre os fagos de referência com o fago KP47. Os valores foram calculados utilizando o VIRIDIC. As coordenadas verticais e horizontais correspondem aos fagos estudados nesse trabalho.	57
Figura 12. Microscopia eletrônica do fago KP47 mostrando sua morfologia. As imagens mostram que o fago apresenta uma cabeça icosaédrica com uma cauda longa e fina, semelhante a morfologia de siphovirus.	58
Figura 13. Placa de lise do fago KP47.....	59
Figura 14. Curva de adsorção do fago KP47. O tempo 1 minuto foi normalizado para 100% de fago livre e foi utilizada a equação $\% \text{ fago livre} = ([\text{PFU/mL A1} - \text{PFU/mL amostra}]/\text{PFU/mL A1})*100$ para o cálculo dos outros tempos. É possível observar que em 6 minutos de contato com as células hospedeira 90% do fago KP47 já adsorveu.	59
Figura 15. Curva de crescimento de uma etapa do fago KP47. A fase latente pode ser observada até 10 minutos e o burst do fago durou 20 minutos (de 10 minutos até 30 minutos). A partir de 30 minutos o fago KP47 entra na fase estacionária.....	60
Figura 16. Estabilidade do fago KP47 em 10% de clorofórmio. O controle foi utilizado apenas o meio de cultivo TSB e o resultado foi normalizado como sendo 100% de sobrevivência. Houve uma queda de 40% de sobrevivência do fago KP47 durante uma hora de contato com o clorofórmio.	61
Figura 17. Curva de time-killing do fago KP47. Abaixo da MOI 1,5 a taxa de inibição decai bastante, ficando em torno de 0 praticamente.	61
Figura 18. Expressão das endolisinas virais visualizadas em gel de SDS-PAGE. As endolisinas foram inseridas em pET-28a e expressas em Escherichia coli Rosetta(DE3) e Escherichia coli BL21(DE3)pLysS (End KP62) na temperatura de 18 °C. (1) Padrão de expressão antes da indução. Indução com 1 mM de IPTG por 2 horas (2), 4 horas (3), por 16 horas (4). (5) Lisado celular por sonicação. (6) Pellet celular. (7) Sobrenadante (clarificado). (8) Flow-through. (9)	

Lavagem com 20 mM imidazol. (10) Lavagem com 40 mM imidazol. (11) Lavagem com 80 mM imidazol. (12) Eluição com 200 mM imidazole. (W) Detecção das endolisinas por Western Blot. (M) Peso molecular TrueColor High Range Protein Marker (10-245 kDa) Sinapse. A seta indicada a banda da endolisina purificada End KP40. 81

Figura 19. Expressão das despolimerases virais visualizadas em gel de SDS-PAGE. As despolimerases foram inseridas no vetor pET-28a e expressas em *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS na temperatura de 20 °C. (1) Padrão de expressão antes da indução. Indução por 4 (2). (3) Lavagem com 80 mM imidazol. (4) Resina. (M) Peso molecular TrueColor High Range Protein Marker (10-245 kDa) Sinapse. As setas indicam a banda das despolimerases. 81

Figura 20. Ensaio de degradação de peptidoglicano pela sobreposição de extrato de Gram-negativa. (A) Placa de Petri com o extrato de Gram-negativa espalhado em que foi depositado 10 uL das endolisinas purificadas (End KP5, End KP10, End KP21, End KP29 e End KP40) e Controle Negativo (tampão A). (B) Placa de Petri contendo TSB + 1 mM IPTG com o repique das linhagens recombinantes de endolisinas. As células foram permeabilizadas com vapor de clorofórmio para liberar as endolisinas para o exterior e foi espalhado o extrato de Gram-negativa para a formação do halo de degradação de peptidoglicano. (C) Placa de Petri com o extrato de Gram-negativa espalhado em que foi depositado 10 uL da End KP62 em que é possível observar o halo de degradação. Para o controle foi utilizado PBS 1X..... 82

Figura 21. Atividade muralítica normalizada $[(DO_{600} \text{ tratada})/(DO_{600} \text{ inicial})]$ das endolisinas End KP5, End KP10, End KP21, End KP29 e End KP40 contra esferoplastos de *Pseudomonas aeruginosa*. Atividade muralítica da End KP62 contra PG de *Klebsiella pneumoniae* KH1. 83

Figura 22. Avaliação da estrutura secundária da enzima End KP62 por dicroísmo circular. O eixo Y representa a Elipicidade Molar por Resíduo (MRE). O espectro de cima indica que a End KP62 é formada principalmente por α -hélice devido a um pico negativo em torno de 208 e 222 nm. A avaliação térmica da enzima foi feita por dicroísmo em que foi possível ver a perda da estrutura helicoidal da enzima com o aumento da temperatura no espectro de baixo. 84

Figura 23. Ensaio de degradação de EPS pelo método spot. (A) Placa de Petri com tapete de *Klebsiella quasipneumoniae* KH1, as despolimerases purificadas (Desp KP5-47, Desp KP10, Desp KP40 e Desp KP62) foram depositadas para a observação do halo de degradação. (B) Placa de Petri com tapete de *Klebsiella pneumoniae* KH11. Controle Negativo (CN, tampão A).

(C) Propagação dos bacteriófagos KP5, KP10, KP40 e KP62 com o halo de degradação de EPS, mostrando a ação das despolimerases produzidas pelos fagos. 86

Figura S 1. Mapa genômico dos bacteriófagos KP5, KP10, KP21, KP29, KP40, KP47 e KP62. Os mapas foram gerados pelo pyCircIzize. 104

Figura S 2. *Visualização das similaridades genômicas entre os bacteriófagos analisados com o KP47 gerada pelo ViPTree. As linhas coloridas indicam regiões de similaridade entre sequências, sendo a coloração relacionada à intensidade de identidade detectada. O padrão de alinhamento evidencia conservação genômica, reorganizações estruturais e modularidade típica da evolução de fagos.* 109

Figura S 3. Curva de time-killing do fago KP47 realizada medindo a absorbância. .. 109

Figura S 4. Resultado do ResFinder com os genes de resistências identificados nas linhagens de *Klebsiella pneumoniae* e *Klebsiella quasipneumoniae*. 109

Figura S 5. Perfil plasmidial das linhagens de *Klebsiella* spp. predito *in silico* pelo PlasmidFinder, indicando os replicons e grupos de incompatibilidade identificados. ...113

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Características genômicas dos fagos de *Klebsiella*. A tabela apresenta os isolados utilizados nesse trabalho; o comprimento do genoma (em pares de base, bp); e o conteúdo de GC (em porcentagem, %GC) para cada isolado de bacteriófago analisado..... 41
- Tabela 2.** Resumo da anotação genômica dos bacteriófagos feita pelo Phold. A tabela apresenta a classificação funcional dos genes codificadores (CDS) identificados, incluindo genes relacionados a estrutura (Connector, Head and packaging e Tail) e metabolismo (DNA, RNA and nucleotide metabolism, Moron, auxiliary metabolic gene and host takeover e Lysis). Também são exibidos fatores de virulência (VFDB_Virulence_Factors), resistência a antimicrobianos (CARD_AMR), genes anti-CRISPR (ACR_anti_crispr) e sistemas de defesa (Defensefinder e Netflax). 41
- Tabela 3.** Classificação dos isolados dos bacteriófagos de *Klebsiella* em nível de família e gênero pelo PhaGCN. 47
- Tabela 4.** Características genômicas provenientes da anotação dos genomas das linhagens de *Klebsiella*. A tabela apresenta a quantidade de contigs, o número total de bases de cada genoma. Além da quantidade de sequências codificantes (CDS), rRNA, tRNA, tmRNA e regiões repetitivas. 48
- Tabela 5.** Características genômicas, de virulência e de resistência das linhagens de *Klebsiella* geradas pelo Kleborate. A tabela apresenta a identificação da espécie do grupo filogenético (Species) e do tipo de sequência (ST). Apresentação de métricas de montagem do genoma das linhagens (N50) e tamanho total em pares de base (Total Size). Cálculo do score de virulência e de resistência, além da identificação de qual tipo de cápsula (K-locus) e lipopolissacarídeo (O-locus). 52
- Tabela 6.** Host range dos bacteriófagos de *Klebsiella*. Em vermelho são as linhagens resistentes (R) à infecção e em verde as linhagens sensíveis (S). 53

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	18
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
Bactérias multirresistentes	19
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	20
Bacteriófagos e enzimas virais.....	22
REFERÊNCIAS	28
CAPÍTULO 1 – CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA E BIOLÓGICA DE BACTERIÓFAGOS INFECTANTES DE <i>Klebsiella spp.</i> E SUAS CÉLULAS HOSPEDEIRAS	
RESUMO	34
ABSTRACT	35
INTRODUÇÃO	36
MATERIAIS E MÉTODOS	36
Isolados de <i>Klebsiella</i> e fagos	36
Sequenciamento do genoma dos fagos e das bactérias	37
Análises de bioinformática dos genomas dos fagos	37
Análises de bioinformática dos genomas das <i>Klebsiella</i>	38
Ensaio de estabilidade de pH, temperatura e clorofórmio dos fagos	38
<i>Host range</i> dos isolados de fagos	39
Curva de crescimento em uma etapa	39
Curva de adsorção	39
Curva de time-killing	40
RESULTADOS	40
Caracterização genômica dos fagos	40
Filogenia e agrupamento dos fagos	42
Caracterização genômica das linhagens de <i>Klebsiella</i>	48

Caracterização da virulência e resistência das <i>Klebsiella</i>	51
Caracterização biológica dos isolados de fagos	52
O fago KP47 pertence a um novo gênero	55
Caracterização biológica do fago KP47	58
DISCUSSÃO	62
CONSIDERAÇÕES FINAIS	64
REFERÊNCIAS	65
CAPÍTULO 2 – INVESTIGAÇÃO DE ENZIMAS FÁGICAS ISOLADAS DOS	
BACTERIÓFAGOS KP5, KP10, KP21, KP29, KP40 E KP62 DE <i>KLEBSIELLA</i> .73	
RESUMO	73
ABSTRACT	74
INTRODUÇÃO	75
MATERIAIS E MÉTODOS	75
Análises de bioinformática	75
Identificação e isolamento dos genes de despolimerases e endolisinas	75
Expressão e purificação das enzimas	76
Atividade enzimática das despolimerases	77
Medição da atividade muralítica das endolisinas	77
Ensaio da atividade das endolisinas em extrato de Gram-negativa	78
Dicroísmo circular	78
RESULTADOS	78
Análise estrutural <i>in silico</i> das endolisinas	78
Expressão e purificação das despolimerases e endolisinas	79
Caracterização enzimática das endolisinas	81
Caracterização estrutural da endolisina End KP62.....	83
Caracterização enzimática das despolimerases	85
DISCUSSÃO	86

CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	88
REFERÊNCIAS	89
ANEXOS	101

INTRODUÇÃO

Um problema global significativo são as fatalidades associadas a infecções causadas por bactérias resistentes a antibióticos. Outra preocupação é a proliferação desses microrganismos e a crescente resistência a antibióticos, principalmente aos antibióticos que são utilizados como último recurso em uma infecção. Em 2014, a Organização Mundial da Saúde (OMS) identificou esse problema como um perigo global para a saúde (Urban-Chmiel *et al.*, 2022). Dentre esses microrganismos destaca-se pela sua significativa resistência a muitos antibióticos a bactéria *Klebsiella pneumoniae*. Ela já foi identificada no Brasil, inclusive linhagens resistentes a carbapenêmicos (Dennesen; Bonten; Weinstein, 1998; Peirano *et al.*, 2009; Palmeiro *et al.*, 2019; Martins; Toleman; Gales, 2020; Nakamura-Silva *et al.*, 2022)

A *Klebsiella pneumoniae* foi identificada por Edwin Klebs em 1875 durante o exame das vias aéreas de vítimas de pneumonia; no entanto, a espécie foi formalmente nomeada posteriormente por Friedlander em 1882. A *K. pneumoniae* é um importante agente etiológico de infecções oportunistas em ambientes hospitalares, associada a infecções do trato urinário, sepse neonatal e pneumonia adquirida na comunidade (PAC) (Jarvis *et al.*, 1985; Jones, 2010; Gorrie *et al.*, 2018). Além dos problemas hospitalares, essas bactérias servem como reservatórios de genes de resistência a antibióticos, que podem ser transmitidos a outras bactérias Gram-negativas, tornando o uso de antibióticos progressivamente ineficaz (Lam *et al.*, 2018).

Os bacteriófagos, ou fagos, são vírus que têm como alvo bactérias e, consequentemente, são os predadores naturais das bactérias. Sendo assim, uma alternativa aos antibióticos para o tratamento das infecções bacterianas é o uso dos fagos como agente antimicrobiano, conhecido como fagoterapia. No entanto, o advento e a implementação de antibióticos levaram a um declínio na pesquisa e na terapia com fagos (Chanishvili *et al.*, 2001; Gill; Hyman, 2010; 2018). Não sendo o bastante, os fagos produzem enzimas de interesse biotecnológico que podem ser usadas em conjunto com a fagoterapia ou com antibióticos. Essas enzimas são as despolimerases e as endolisinas que tem como alvo a degradação do biofilme bacteriano e a parede celular de peptidoglicano, respectivamente (Schmelcher; Donovan; Loessner, 2012; Yan; Mao; Xie, 2014; Knecht; Veljkovic; Fieseler, 2019; Abdelrahman *et al.*, 2021; Rahman *et al.*, 2021; Singh *et al.*, 2022; Maciejewska *et al.*, 2023; Cheetham *et al.*, 2024; Zheng; Zhang, 2024).

Com isso, esse trabalho investigou linhagens de bacteriófagos de *Klebsiella spp.* depositadas na coleção do laboratório para explorar suas características voltadas para a terapia.

Além disso, foi investigado a enzimas virais desses isolados para isolar, expressar e purificar enzimas com atividade contra biofilme e peptidoglicano.

REFERÊNCIAS

- Abdelrahman, F., M. Easwaran, O. I. Daramola, S. Ragab, S. Lynch, T. J. Oduselu, F. M. Khan, A. Ayobami, F. Adnan, E. Torrents, S. Sanmukh and A. El-Shibiny (2021). "Phage-Encoded Endolysins." Antibiotics (Basel) **10**(2).
- Acar, J. and B. Rostel (2001). "Antimicrobial resistance: an overview." Rev Sci Tech **20**(3): 797-810.
- Adams, M. J., E. J. Lefkowitz, A. M. King, B. Harrach, R. L. Harrison, N. J. Knowles, A. M. Kropinski, M. Krupovic, J. H. Kuhn, A. R. Mushegian, M. L. Nibert, S. Sabanadzovic, H. Sanfacon, S. G. Siddell, P. Simmonds, A. Varsani, F. M. Zerbini, R. J. Orton, D. B. Smith, A. E. Gorbalenya and A. J. Davison (2017). "50 years of the International Committee on Taxonomy of Viruses: progress and prospects." Arch Virol **162**(5): 1441-1446.
- Brisse, S., V. Passet and P. A. D. Grimont (2014). "Description of *Klebsiella* quasipneumoniae sp. nov., isolated from human infections, with two subspecies, *Klebsiella* quasipneumoniae subsp. quasipneumoniae subsp. nov. and *Klebsiella* quasipneumoniae subsp. similipneumoniae subsp. nov., and demonstration that *Klebsiella* singaporensis is a junior heterotypic synonym of *Klebsiella* variicola." Int J Syst Evol Microbiol **64**(Pt 9): 3146-3152.
- Brisse, S. and J. Verhoef (2001). "Phylogenetic diversity of *Klebsiella* pneumoniae and *Klebsiella* oxytoca clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic DNA, gyrA and parC genes sequencing and automated ribotyping." Int J Syst Evol Microbiol **51**(Pt 3): 915-924.
- Carattoli, A. (2013). "Plasmids and the spread of resistance." Int J Med Microbiol **303**(6-7): 298-304.
- Chanishvili, N., T. Chanishvili, M. Tediashvili and P. A. Barrow (2001). "Phages and their application against drug-resistant bacteria." Journal of Chemical Technology and Biotechnology **76**(7): 689-699.

Chaudhary, V., P. Kajla, D. Lather, N. Chaudhary, P. Dangi, P. Singh and R. Pandiselvam (2024). "Bacteriophages: a potential game changer in food processing industry." Crit Rev Biotechnol **44**(7): 1325-1349.

Cheetham, M. J., Y. Huo, M. Stroyakovski, L. Cheng, D. Wan, A. Dell and J. M. Santini (2024). "Specificity and diversity of *Klebsiella pneumoniae* phage-encoded capsule depolymerases." Essays Biochem **68**(5): 661-677.

Chen, L., B. Mathema, J. D. Pitout, F. R. DeLeo and B. N. Kreiswirth (2014). "Epidemic *Klebsiella pneumoniae* ST258 is a hybrid strain." mBio **5**(3): e01355-01314.

Chen, W., L. M. Han, X. Z. Chen, P. C. Yi, H. Li, Y. Y. Ren, J. H. Gao, C. Y. Zhang, J. Huang, W. X. Wang, Z. L. Hu and C. M. Hu (2024). "Engineered endolysin of *Klebsiella pneumoniae* phage is a potent and broad-spectrum bactericidal agent against "ESKAPEE" pathogens." Front Microbiol **15**: 1397830.

Clokic, M. R., A. D. Millard, A. V. Letarov and S. Heaphy (2011). "Phages in nature." Bacteriophage **1**(1): 31-45.

Cortes, G., N. Borrell, B. de Astorza, C. Gomez, J. Saulea and S. Alberti (2002). "Molecular analysis of the contribution of the capsular polysaccharide and the lipopolysaccharide O side chain to the virulence of *Klebsiella pneumoniae* in a murine model of pneumonia." Infect Immun **70**(5): 2583-2590.

D'Herelle, F. (2007). "On an invisible microbe antagonistic toward dysenteric bacilli: brief note by Mr. F. D'Herelle, presented by Mr. Roux. 1917." Res Microbiol **158**(7): 553-554.

Fevre, C., V. Passet, F. X. Weill, P. A. Grimont and S. Brisse (2005). "Variants of the *Klebsiella pneumoniae* OKP chromosomal beta-lactamase are divided into two main groups, OKP-A and OKP-B." Antimicrob Agents Chemother **49**(12): 5149-5152.

FRIEDLANDER, C. (1882). Ueber die Schizomyceten bei der acuten fibrosen Pneumonie, Arch. path, Anat.

Giedraitiene, A., A. Vitkauskienė, R. Naginiene and A. Pavilionis (2011). "Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria." Medicina (Kaunas) **47**(3): 137-146.

Gu, J., X. Liu, Y. Li, W. Han, L. Lei, Y. Yang, H. Zhao, Y. Gao, J. Song, R. Lu, C. Sun and X. Feng (2012). "A method for generation phage cocktail with great therapeutic potential." PLoS One **7**(3): e31698.

Haeggman, S., S. Lofdahl, A. Paauw, J. Verhoef and S. Brisse (2004). "Diversity and evolution of the class A chromosomal beta-lactamase gene in *Klebsiella pneumoniae*." Antimicrob Agents Chemother **48**(7): 2400-2408.

Hatfull, G. F., R. M. Dedrick and R. T. Schooley (2022). "Phage Therapy for Antibiotic-Resistant Bacterial Infections." Annu Rev Med **73**: 197-211.

Herridge, W. P., P. Shibu, J. O'Shea, T. C. Brook and L. Hoyles (2020). "Bacteriophages of *Klebsiella* spp., their diversity and potential therapeutic uses." J Med Microbiol **69**(2): 176-194.

Holt, K. E., H. Wertheim, R. N. Zadoks, S. Baker, C. A. Whitehouse, D. Dance, A. Jenney, T. R. Connor, L. Y. Hsu, J. Severin, S. Brisse, H. Cao, J. Wilksch, C. Gorrie, M. B. Schultz, D. J. Edwards, K. V. Nguyen, T. V. Nguyen, T. T. Dao, M. Mensink, V. L. Minh, N. T. Nhu, C. Schultsz, K. Kuntaman, P. N. Newton, C. E. Moore, R. A. Strugnell and N. R. Thomson (2015). "Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health." Proc Natl Acad Sci U S A **112**(27): E3574-3581.

King, A. M., E. Lefkowitz, M. J. Adams and E. B. Carstens (2011). Virus taxonomy: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Elsevier.

Knecht, L. E., M. Veljkovic and L. Fieseler (2019). "Diversity and Function of Phage Encoded Depolymerases." Front Microbiol **10**: 2949.

Krul, D., L. S. Rodrigues, A. C. Siqueira, D. Mesa, E. M. Dos Santos, T. M. Vasconcelos, R. N. Spalanzani, R. Cardoso, M. C. Ricieri, F. de Araujo Motta, D. Conte and L. M. Dalla-Costa (2024). "High-risk clones of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* recovered from pediatric patients in Southern Brazil." Braz J Microbiol **55**(2): 1437-1443.

Kumari, S., K. Harjai and S. Chhibber (2009). "Efficacy of bacteriophage treatment in murine burn wound infection induced by *Klebsiella pneumoniae*." J Microbiol Biotechnol **19**(6): 622-628.

Latka, A., P. G. Leiman, Z. Drulis-Kawa and Y. Briers (2019). "Modeling the Architecture of Depolymerase-Containing Receptor Binding Proteins in *Klebsiella* Phages." Front Microbiol **10**: 2649.

Lefkowitz, E. J., D. M. Dempsey, R. C. Hendrickson, R. J. Orton, S. G. Siddell and D. B. Smith (2018). "Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)." Nucleic Acids Res **46**(D1): D708-D717.

Linnerborg, M., A. Weintraub, M. J. Albert and G. Widmalm (2001). "Depolymerization of the capsular polysaccharide from *Vibrio cholerae* O139 by a lyase associated with the bacteriophage JA1." Carbohydr Res **333**(4): 263-269.

Majkowska-Skrobek, G., A. Łatka, R. Berisio, B. Maciejewska, F. Squeglia, M. Romano, R. Lavigne, C. Struve and Z. Drulis-Kawa (2016). "Capsule-targeting depolymerase, derived from *Klebsiella* KP36 phage, as a tool for the development of anti-virulent strategy." Viruses **8**(12): 324.

Martins, W., M. A. Toleman and A. C. Gales (2020). "Clinical utilization of bacteriophages: a new perspective to combat the antimicrobial resistance in Brazil." Braz J Infect Dis **24**(3): 239-246.

- Merino, S., S. Camprubi, S. Alberti, V. J. Benedi and J. M. Tomas (1992). "Mechanisms of *Klebsiella pneumoniae* resistance to complement-mediated killing." Infect Immun **60**(6): 2529-2535.
- Miller, W. R. and C. A. Arias (2024). "ESKAPE pathogens: antimicrobial resistance, epidemiology, clinical impact and therapeutics." Nat Rev Microbiol **22**(10): 598-616.
- Nguyen, H. M., S. Watanabe, S. Sharmin, T. Kawaguchi, X. E. Tan, D. L. Wannigama and L. Cui (2023). "RNA and Single-Stranded DNA Phages: Unveiling the Promise from the Underexplored World of Viruses." Int J Mol Sci **24**(23).
- Oliveira, H., J. Azeredo, R. Lavigne and L. D. Kluskens (2012). "Bacteriophage endolysins as a response to emerging foodborne pathogens." Trends in Food Science & Technology **28**(2): 103-115.
- Oliveira, H., L. D. Melo, S. B. Santos, F. L. Nobrega, E. C. Ferreira, N. Cerca, J. Azeredo and L. D. Kluskens (2013). "Molecular aspects and comparative genomics of bacteriophage endolysins." J Virol **87**(8): 4558-4570.
- Oliveira, H., C. Sao-Jose and J. Azeredo (2018). "Phage-Derived Peptidoglycan Degrading Enzymes: Challenges and Future Prospects for In Vivo Therapy." Viruses **10**(6).
- Olszak, T., M. M. Shneider, A. Latka, B. Maciejewska, C. Browning, L. V. Sycheva, A. Cornelissen, K. Danis-Wlodarczyk, S. N. Senchenkova, A. S. Shashkov, G. Gula, M. Arabski, S. Wasik, K. A. Miroshnikov, R. Lavigne, P. G. Leiman, Y. A. Knirel and Z. Drulis-Kawa (2017). "The O-specific polysaccharide lyase from the phage LKA1 tailspike reduces *Pseudomonas* virulence." Sci Rep **7**(1): 16302.
- Paterson, D. L. and R. A. Bonomo (2005). "Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update." Clin Microbiol Rev **18**(4): 657-686.
- Peirano, G., L. Chen, B. N. Kreiswirth and J. D. D. Pitout (2020). "Emerging Antimicrobial-Resistant High-Risk *Klebsiella pneumoniae* Clones ST307 and ST147." Antimicrob Agents Chemother **64**(10).
- Peirano, G., L. M. Seki, V. L. Val Passos, M. C. F. Pinto, L. R. Guerra and M. D. Asensi (2009). "Carbapenem-hydrolysing β -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil." Journal of Antimicrobial Chemotherapy **63**(2): 265-268.
- Pires, D. P., A. R. Costa, G. Pinto, L. Meneses and J. Azeredo (2020). "Current challenges and future opportunities of phage therapy." FEMS Microbiol Rev **44**(6): 684-700.
- Poranen, M. M., S. Mantynen and C. Ictv Report (2017). "ICTV Virus Taxonomy Profile: Cystoviridae." J Gen Virol **98**(10): 2423-2424.
- Rahman, M. U., W. Wang, Q. Sun, J. A. Shah, C. Li, Y. Sun, Y. Li, B. Zhang, W. Chen and S. Wang (2021). "Endolysin, a Promising Solution against Antimicrobial Resistance." Antibiotics (Basel) **10**(11).

- Roe, C. C., A. J. Vazquez, E. P. Esposito, R. Zarrilli and J. W. Sahl (2019). "Diversity, Virulence, and Antimicrobial Resistance in Isolates From the Newly Emerging *Klebsiella pneumoniae* ST101 Lineage." Front Microbiol **10**: 542.
- Rosenblueth, M., L. Martinez, J. Silva and E. Martinez-Romero (2004). "*Klebsiella variicola*, a novel species with clinical and plant-associated isolates." Syst Appl Microbiol **27**(1): 27-35.
- Schleifer, K. H. (2008). "The International Union of Microbiological Societies, IUMS." Res Microbiol **159**(1): 45-48.
- Schmelcher, M., D. M. Donovan and M. J. Loessner (2012). "Bacteriophage endolysins as novel antimicrobials." Future Microbiol **7**(10): 1147-1171.
- Siringan, P., P. L. Connerton, N. J. Cummings and I. F. Connerton (2014). "Alternative bacteriophage life cycles: the carrier state of *Campylobacter jejuni*." Open Biol **4**(3): 130200.
- Squeglia, F., B. Maciejewska, A. Łatka, A. Ruggiero, Y. Briers, Z. Drulis-Kawa and R. Berisio (2020). "Structural and functional studies of a *Klebsiella* phage capsule depolymerase tailspike: mechanistic insights into capsular degradation." Structure **28**(6): 613-624. e614.
- Struve, C., M. Bojer and K. A. Krogfelt (2008). "Characterization of *Klebsiella pneumoniae* type 1 fimbriae by detection of phase variation during colonization and infection and impact on virulence." Infect Immun **76**(9): 4055-4065.
- Struve, C., M. Bojer and K. A. Krogfelt (2009). "Identification of a conserved chromosomal region encoding *Klebsiella pneumoniae* type 1 and type 3 fimbriae and assessment of the role of fimbriae in pathogenicity." Infect Immun **77**(11): 5016-5024.
- Turner, D., A. N. Shkoporov, C. Lood, A. D. Millard, B. E. Dutilh, P. Alfenas-Zerbini, L. J. van Zyl, R. K. Aziz, H. M. Oksanen, M. M. Poranen, A. M. Kropinski, J. Barylski, J. R. Brister, N. Chanisvili, R. A. Edwards, F. Enault, A. Gillis, P. Knezevic, M. Krupovic, I. Kurtboke, A. Kushkina, R. Lavigne, S. Lehman, M. Lobočka, C. Moraru, A. Moreno Switt, V. Morozova, J. Nakavuma, A. Reyes Munoz, J. Rumnieks, B. L. Sarkar, M. B. Sullivan, J. Uchiyama, J. Wittmann, T. Yigang and E. M. Adriaenssens (2023). "Abolishment of morphology-based taxa and change to binomial species names: 2022 taxonomy update of the ICTV bacterial viruses subcommittee." Arch Virol **168**(2): 74.
- Twort, F. W. (1936). "Further Investigations on the Nature of Ultra-Microscopic Viruses and their Cultivation." J Hyg (Lond) **36**(2): 204-235.
- Urban-Chmiel, R., A. Marek, D. Stepień-Pysniak, K. Wiczorek, M. Dec, A. Nowaczek and J. Osek (2022). "Antibiotic Resistance in Bacteria-A Review." Antibiotics (Basel) **11**(8).
- van Duin, D., C. A. Arias, L. Komarow, L. Chen, B. M. Hanson, G. Weston, E. Cober, O. B. Garner, J. T. Jacob, M. J. Satlin, B. C. Fries, J. Garcia-Diaz, Y. Doi, S. Dhar, K. S. Kaye, M. Earley, A. M. Hujer, K. M. Hujer, T. N. Domitrovic, W. C. Shropshire, A. Dinh, C. Manca, C. L. Luterbach, M. Wang, D. L. Paterson, R. Banerjee, R. Patel, S. Evans, C. Hill, R. Arias, H. F. Chambers, V. G. Fowler, Jr., B. N. Kreiswirth, R. A. Bonomo and I. Multi-Drug Resistant Organism Network (2020). "Molecular and clinical epidemiology of carbapenem-resistant

Enterobacterales in the USA (CRACKLE-2): a prospective cohort study." Lancet Infect Dis **20**(6): 731-741.

van Hoek, A. H., D. Mevius, B. Guerra, P. Mullany, A. P. Roberts and H. J. Aarts (2011). "Acquired antibiotic resistance genes: an overview." Front Microbiol **2**: 203.

Verma, V., K. Harjai and S. Chhibber (2009). "Restricting ciprofloxacin-induced resistant variant formation in biofilm of *Klebsiella pneumoniae* B5055 by complementary bacteriophage treatment." J Antimicrob Chemother **64**(6): 1212-1218.

Wang, M., M. Earley, L. Chen, B. M. Hanson, Y. Yu, Z. Liu, S. Salcedo, E. Cober, L. Li, S. S. Kanj, H. Gao, J. M. Munita, K. Ordonez, G. Weston, M. J. Satlin, S. L. Valderrama-Beltran, K. Marimuthu, M. E. Stryjewski, L. Komarow, C. Luterbach, S. H. Marshall, S. D. Rudin, C. Manca, D. L. Paterson, J. Reyes, M. V. Villegas, S. Evans, C. Hill, R. Arias, K. Baum, B. C. Fries, Y. Doi, R. Patel, B. N. Kreiswirth, R. A. Bonomo, H. F. Chambers, V. G. Fowler, Jr., C. A. Arias, D. van Duin and I. Multi-Drug Resistant Organism Network (2022). "Clinical outcomes and bacterial characteristics of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* complex among patients from different global regions (CRACKLE-2): a prospective, multicentre, cohort study." Lancet Infect Dis **22**(3): 401-412.

Wittebole, X., S. De Roock and S. M. Opal (2014). "A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens." Virulence **5**(1): 226-235.

Wyres, K. L., R. R. Wick, C. Gorrie, A. Jenney, R. Follador, N. R. Thomson and K. E. Holt (2016). "Identification of *Klebsiella* capsule synthesis loci from whole genome data." Microb Genom **2**(12): e000102.

Xing, S., T. Ma, X. Zhang, Y. Huang, Z. Mi, Q. Sun, X. An, H. Fan, S. Wu, L. Wei and Y. Tong (2017). "First complete genome sequence of a virulent bacteriophage infecting the opportunistic pathogen *Serratia rubidaea*." Arch Virol **162**(7): 2021-2028.

Zheng, T. and C. Zhang (2024). "Engineering strategies and challenges of endolysin as an antibacterial agent against Gram-negative bacteria." Microb Biotechnol **17**(4): e14465.