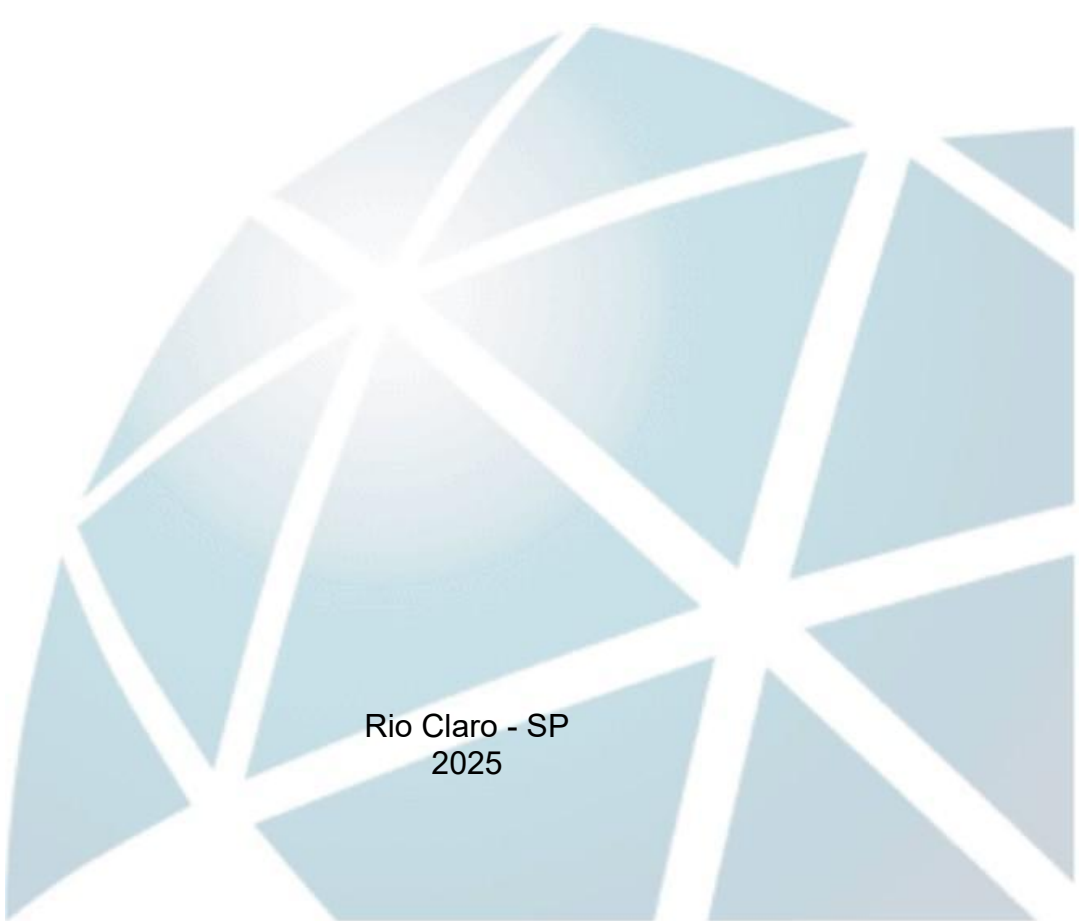




CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ANA CAROLINA DOS SANTOS MENDES LEMOS

**INVESTIGAÇÃO *IN SILICO* DO POTENCIAL DE
DESPOLIMERASES VIRAIS PARA USO EM
TRATAMENTO ALTERNATIVO DE INFECÇÕES
CAUSADAS POR *Klebsiella pneumoniae***



Rio Claro - SP
2025

ANA CAROLINA DOS SANTOS MENDES LEMOS

**INVESTIGAÇÃO *IN SILICO* DO POTENCIAL DE DESPOLIMERASES
VIRAIIS PARA USO EM TRATAMENTO ALTERNATIVO DE
INFECÇÕES CAUSADAS POR *Klebsiella pneumoniae***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Biociências – Câmpus de Rio Claro, da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, para obtenção do grau de Licenciada e
Bacharela em Ciências Biológicas.

Orientador(a): Prof. Dr. Henrique Ferreira

Coorientador(a): Me. Giovane Böerner Hypolito

Rio Claro - SP
2025

L557i

Lemos, Ana Carolina dos Santos Mendes

Investigação in silico do potencial de despolimerases virais para uso em tratamento alternativo de infecções causadas por *Klebsiella pneumoniae* / Ana Carolina dos Santos Mendes Lemos. -- Rio Claro, 2025

57 p.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado e licenciatura - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientador: Henrique Ferreira

Coorientador: Giovane Böerner Hypolito

1. Microbiologia molecular. 2. Bacteriófagos. 3. Noxas. 4. Biofilmes. 5. Bioinformática. I. Título.

ANA CAROLINA DOS SANTOS MENDES LEMOS

**INVESTIGAÇÃO *IN SILICO* DO POTENCIAL DE DESPOLIMERASES
VIRAIS PARA USO EM TRATAMENTO ALTERNATIVO DE
INFECÇÕES CAUSADAS POR *Klebsiella pneumoniae***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Biociências, Câmpus de Rio Claro, da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, para obtenção do grau de Licenciada e
Bacharela em Ciências Biológicas.

BANCA EXAMINADORA:

Me. Giovane Böerner Hypolito

Dr. Caio Felipe Cavicchia Zamunér

Dra. Carolina Crepaldi

Aprovado em: 7 de Novembro de 2025

Documento assinado digitalmente
 ANA CAROLINA DOS SANTOS MENDES LEMOS
Data: 26/11/2025 20:19:45-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Documento assinado digitalmente
 HENRIQUE FERREIRA
Data: 27/11/2025 08:08:27-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Assinatura do discente

Assinatura do orientador

Documento assinado digitalmente
 GIOVANE BOERNER HYPOLITO
Data: 27/11/2025 09:46:33-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Assinatura do coorientador

"Dedico aos meus pais e à minha irmã, que me apoiaram do início ao fim nesta jornada. Sem vocês, eu não seria quem sou"

AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares, Tarcisio, Ana Maria e Alessandra, expresso profundo agradecimento por todo o apoio e incentivo incondicional, fundamentais para minha formação e crescimento. Sou o que sou graças a tudo que me ensinaram. Aos meus amigos e companheiros de laboratório, Gabriel e João, agradeço pela ajuda no aprendizado, pela companhia constante e pelas risadas em todos os momentos. Vocês foram, e continuam sendo, muito importantes para mim. Aos amigos que estiveram ao meu lado durante toda a graduação - André, Caio, Catharina, Leonardo, Lívia, Maria Vitória, Natália e Tito -, e aos meus amigos de Taubaté - Thiago, Miguel e Matheus -, sou grata por cada momento compartilhado e me sinto imensamente sortuda por cada um deles. Todos vocês tornam minha vida mais leve e feliz, e sem vocês eu não teria chegado até aqui. Levarei no coração e na memória todas as experiências que vivemos juntos. À minha República Melitta, que foi meu lar por tanto tempo, deixo meu carinho especial por todas as vivências que marcaram essa etapa da minha vida. E a todos que, de alguma forma, fizeram parte deste caminho e não foram citados aqui, meu muito obrigada por me acompanharem nesta longa e difícil jornada; vocês estarão para sempre nas minhas lembranças.

Gostaria de expressar minha sincera gratidão aos membros do Laboratório de Genética de Microrganismos pelo apoio e ensinamentos ao longo desta jornada. Em especial, agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Henrique Ferreira, e ao meu coorientador, Me. Giovane Böerner Hypolito, pela oportunidade de realizar esta pesquisa, pelo conhecimento compartilhado e pela orientação ao longo do processo. O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brasil. Processo nº 2024/14407-0. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade do(s) autor(es) e não necessariamente refletem a visão da FAPESP.

"Research is formalized curiosity. It is poking and prying with a purpose. It is a seeking that he who wishes may know the cosmic secrets of the world and they that dwell therein."

— Zora Neale Hurston

RESUMO

A resistência antimicrobiana é um dos maiores desafios globais em saúde pública, e *Klebsiella pneumoniae* se destaca por sua capacidade de resistir a carbapenêmicos e formar biofilmes, dificultando o tratamento. Nesse cenário, despolimerases virais representam alternativas terapêuticas promissoras por degradarem polissacarídeos da cápsula (CPS) e do exopolissacarídeo (EPS), favorecendo a ação de fagos e antimicrobianos. Este trabalho teve como objetivo empregar abordagens *in silico* para identificar genes candidatos a despolimerases putativas em genomas de fagos de *K. pneumoniae*. Foram utilizadas ferramentas como DepoScope, DePP e PhageDPO, que apontaram sete fagos candidatos (KP5, KP10, KP21, KP29, KP40 e KP62) contendo potenciais genes de despolimerase, posteriormente validados por homologia (HHPred) e análises estruturais (AlphaFold), revelando domínios compatíveis com famílias funcionais como *pectin lyase*, *end tail spike* e *peptidase_S74*, característicos de enzimas degradadoras de EPS e CPS. No âmbito experimental, foram conduzidas reações de PCR para amplificação de genes completos e domínios específicos, testando diferentes condições com Taq DNA polimerase e Pfu, testando diferentes condições enzimáticas e intensificadores (betaína, DMSO e formamida). Obtiveram-se resultados positivos para os fagos KP5, KP10, KP21 e KP29, sendo a betaína fundamental para superar moldes ricos em GC e estruturas secundárias. Em conjunto, o estudo estabeleceu um pipeline robusto que integra prospecção bioinformática e validação inicial em laboratório, reforçando o potencial das despolimerases como estratégia antivirulência no combate a infecções hospitalares causadas por *K. pneumoniae* multirresistente.

Palavras-chave: bacteriófago; EPS; patógeno; biofilme.

ABSTRACT

Antimicrobial resistance is one of the greatest global challenges in public health, and *Klebsiella pneumoniae* stands out for its ability to resist carbapenems and form biofilms, making treatment difficult. In this scenario, viral depolymerases represent promising therapeutic alternatives because they degrade capsule polysaccharides (CPS) and exopolysaccharides (EPS), favoring the action of phages and antimicrobials. This study aimed to use *in silico* approaches to identify candidate genes for putative depolymerases in *K. pneumoniae* phage genomes. Tools such as DepoScope, DePP, and PhageDPO were used, which identified seven candidate phages (KP5, KP10, KP21, KP29, KP40, and KP62) containing potential depolymerase genes, which were subsequently validated by homology (HHPred) and structural analyses (AlphaFold), revealing domains compatible with functional families such as *pectin lyase*, *end tail spike*, and *peptidase_S74*, characteristic of EPS and CPS degrading enzymes. In the experimental setting, PCR reactions were conducted to amplify complete genes and specific domains, testing different conditions with Taq DNA polymerase and Pfu, testing different enzymatic conditions and enhancers (betaine, DMSO, and formamide). Positive results were obtained for phages KP5, KP10, KP21, and KP29, with betaine being essential for overcoming GC-rich templates and secondary structures. Overall, the study established a robust pipeline that integrates bioinformatic prospecting and initial laboratory validation, reinforcing the potential of depolymerases as an antivirulence strategy in combating hospital infections caused by multidrug-resistant.

Keywords: bacteriophage; EPS; pathogen; biofilm.

Title in english: *In silico* investigation of the potential of viral depolymerases for use in alternative treatment of infections caused by *Klebsiella pneumoniae*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Painel representativo com uma visão geral esquemática do pipeline de análise bioinformática.....	19
Figura 2 – Combinações de domínios encontradas em arquiteturas de despolimerase de fagos, representadas em aminoácidos.....	32
Figura 3 – Modelagem da proteína KP5_CDS58 construída com o AlphaFold v1.5.5.....	35
Figura 4 – Modelagem da proteína KP10_CDS82 construída com o AlphaFold v1.5.5.....	36
Figura 5 – Modelagem da proteína KP10_CDS86 construída com o AlphaFold v1.5.5.....	37
Figura 6 – Modelagem da proteína KP21_CDS11 construída com o AlphaFold v1.5.5.....	38
Figura 7 – Modelagem da proteína KP29_CDS85 construída com o AlphaFold v1.5.5.....	39
Figura 8 – Modelagem da proteína KP40_CDS4 construída com o AlphaFold v1.5.5.....	40
Figura 9 – Modelagem da proteína KP62_CDS139 construída com o AlphaFold v1.5.5.....	41
Figura 10 – Eletroforese em gel de agarose (0,7%) do produto de PCRs obtidos com Taq DNA Polimerase.....	44
Figura 11 – Eletroforese em gel de agarose (0,7%) dos produtos de PCR obtidos com a DNA polimerase Phusion Pfu.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Linhagens dos bacteriófagos.....	17
Tabela 2 – Ciclo de amplificações em touchdown com Taq polimerase em gene inteiro.....	24
Tabela 3 – Ciclo de amplificações em touchdown com Taq polimerase em fragmentos de domínio.....	25
Tabela 4 – Ciclo de amplificações em touchdown com Pfu polimerase em gene inteiro.....	26
Tabela 5 – Ciclo de amplificações em touchdown com Pfu polimerase em fragmentos de domínio.....	27
Tabela 6 - Sete proteínas identificadas em cada genoma de fagos com ferramentas DePP, PhageDPO e DepoScope.....	29
Tabela 7 - Possíveis despolimerases produzidas pelos fagos identificadas pelas ferramentas.....	31

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Contextualização do tema.....	11
1.2 Problema de pesquisa	14
1.3 Objetivo Geral	14
1.4 Objetivos específicos	15
1.5 Justificativa	15
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
2.1 Isolados de <i>Klebsiella pneumoniae</i> e bacteriófagos.....	17
2.2 Processamento em bioinformática.....	18
2.3 Extração de DNA dos bacteriófagos	19
2.4 Isolamento dos genes de despolimerases.....	20
2.5 Reações de amplificações e protocolos	22
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
3.1 Análises de Bioinformática	28
4 CONCLUSÃO	45
REFERÊNCIAS.....	47

1 INTRODUÇÃO

1.1 Contextualização do tema

Um dos maiores desafios enfrentados pela indústria farmacêutica e pela área da saúde é o crescente surgimento de microrganismos com alta taxa de resistência a antibióticos e compostos antimicrobianos (Gajdács; Albericio, 2019; Laxminarayan; Duse; Wattal; Zaidi *et al.*, 2013). Entre eles, destacam-se as bactérias multirresistentes (MDR), capazes de resistir a diversos fármacos (Dennesen; Bonten; Weinstein, 1998). São particularmente preocupantes as bactérias Gram-negativas, que frequentemente desenvolvem resistência a praticamente todos os antibióticos disponíveis como opções terapêuticas (Laxminarayan; Duse; Wattal; Zaidi *et al.*, 2013). Dentre esses microrganismos, a *Klebsiella pneumoniae* tem recebido especial atenção. Já isolada no Brasil, essa bactéria constitui o microrganismo principal deste estudo e é capaz de produzir β -lactamases, enzimas que conferem resistência aos carbapenêmicos, antibióticos comumente utilizados no tratamento de infecções causadas por cepas multirresistentes (Peirano; Seki; Val Passos; Pinto *et al.*, 2009).

A *K. pneumoniae* foi descrita pela primeira vez por Friedlander (1882), a partir de amostras pulmonares de uma paciente infectada. Atualmente, é considerada uma das principais causadoras de infecções oportunistas em ambiente hospitalar, podendo também estar associada a infecções do trato urinário, sepse neonatal e pneumonia adquirida na comunidade (Gorrie; Mirceta; Wick; Judd *et al.*, 2018; Jarvis; Munn; Highsmith; Culver *et al.*, 1985; Jones, 2010). No Brasil, circulam linhagens endêmicas de *K. pneumoniae* pertencentes ao complexo clonal CG258 (ST11, ST258 e ST437), amplamente disseminadas em âmbito internacional e associadas à produção de carbapenemases (KPC, NDM, VIM e OXA-48-like) (Chen; Mathema; Chavda; Deleo *et al.*, 2014; Nakamura-Silva; Cerdeira; Oliveira-Silva; Da Costa *et al.*, 2022; Palmeiro; De Souza; Schorner; Passarelli-Araujo *et al.*, 2019; Wyres; Holt, 2016).

Além disso, esse microrganismo atua como reservatório de genes de resistência a antibióticos, os quais podem ser transferidos para outras bactérias Gram-negativas, reduzindo ainda mais a eficácia das terapias antimicrobianas (Lam; Wyres; Duchene; Wick *et al.*, 2018; Lam; Wick; Wyres; Gorrie *et al.*, 2018). A capacidade de *Klebsiella pneumoniae* em formar biofilmes representa um fator de defesa essencial,

uma vez que essas estruturas funcionam como barreiras protetoras contra agentes externos. A remoção ou degradação dessa matriz é fundamental para expor os receptores bacterianos e possibilitar a ligação eficiente dos fagos ao hospedeiro (Latka *et al.*, 2017). Nesse contexto, as despolimerases fágicas desempenham papel central e podem ser classificadas em duas principais categorias: hidrolases e liases. Ambas estão envolvidas na clivagem de diferentes tipos de polissacarídeos, incluindo os capsulares (CPSs), lipopolissacarídeos (LPSs), O-polissacarídeos e exopolissacarídeos (EPSs) presentes no biofilme (De la Fuente-Núñez *et al.*, 2014). Além disso, algumas dessas enzimas apresentam capacidade de degradar outros componentes, como polipeptídeos e lipídios (Fernandes & São-José, 2018).

O biofilme é constituído por uma matriz complexa composta por água, lipídios, proteínas, DNA extracelular e, principalmente, por substâncias poliméricas extracelulares (EPS). O EPS, por sua vez, é formado essencialmente por açúcares, polissacarídeos e glicoconjugados, sendo o principal componente responsável pela integridade estrutural e pela função protetora do biofilme. O biofilme favorece a adesão celular e a colonização de superfícies, funcionando como barreira protetora contra a fagocitose e a ação de antibióticos (Ochońska; Ścibik; Brzychczy-Włoch, 2021; Piperaki; Syrogiannopoulos; Tzouvelekis; Daikos, 2017; Livrelli; De Champs; Di Martino; Darfeuille-Michaud *et al.*, 1996; Podschun; Ullmann, 1992; Wyres *et al.*, 2016). Nesse contexto, tornam-se cada vez mais necessários estudos voltados à identificação de novos compostos capazes de inibir essas bactérias.

Os bacteriófagos, ou fagos, são vírus que utilizam bactérias como hospedeiras. Sua estrutura é composta por uma cabeça proteica de simetria icosaédrica, geralmente contendo DNA de dupla fita, e, em muitos casos, por uma cauda proteica (contrátil ou não), responsável pelo reconhecimento da célula-alvo e pela injeção do material genético (Nobrega *et al.*, 2018). Após a infecção, os fagos podem seguir o ciclo lítico, no qual redirecionam o metabolismo bacteriano para a produção de novas partículas virais, culminando na lise celular, ou o ciclo lisogênico, caracterizado pela integração do genoma viral ao hospedeiro (Bragg *et al.*, 2014). Os fagos são classificados em 47 famílias e 1199 gêneros (Lefkowitz, 2018; ICTV, 2022).

O crescente avanço da resistência bacteriana tem impulsionado o interesse na fagoterapia, proposta inicialmente por Frederick Twort e Félix d'Herelle entre 1915 e 1917 (Payaslian; Gradaschi; Piuri, 2021). Esse método terapêutico baseia-se no uso de fagos líticos específicos que infectam, replicam-se e destroem células bacterianas

resistentes (Aslam *et al.*, 2019). Estudos clínicos têm demonstrado resultados promissores em infecções multirresistentes, incluindo aquelas causadas por *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* (Uyttebroek *et al.*, 2022; Marçal *et al.*, 2023). O sucesso terapêutico depende de fatores como a escolha de fagos altamente específicos, vias adequadas de administração e métodos eficientes de liberação (Chan *et al.*, 2018). Contudo, falhas também foram relatadas, associadas ao uso de fagos inespecíficos, baixas doses administradas ou condições clínicas desfavoráveis (Bao *et al.*, 2020). Dessa forma, embora promissora, a fagoterapia exige ajustes criteriosos para alcançar eficácia consistente (Stacey *et al.*, 2022).

Ao contrário dos antibióticos, as despolimerases apresentam elevada especificidade para o hospedeiro, o que permite preservar a microbiota natural (Pan *et al.*, 2019; Majkowska-Skrobek *et al.*, 2018). Além de seu uso terapêutico, essas enzimas podem ser projetadas para aumentar a atividade degradante e até mesmo aplicadas como ferramentas de detecção bacteriana (Singh *et al.*, 2010). Existem duas formas principais de aplicação: (i) como proteínas de cauda pontiaguda (TSP), que fazem parte da estrutura dos virions e contêm domínios despolimerases, ou (ii) como enzimas livres, produzidas e aplicadas de forma independente (Drulis-Kawa *et al.*, 2015). No primeiro caso, quando fagos completos são administrados, eles podem se multiplicar em células hospedeiras sensíveis, liberando um número ainda maior de partículas virais com TSPs, o que pode ser vantajoso em infecções associadas a biofilmes, já que facilita a entrega das enzimas diretamente ao local-alvo (Topka-Bielecka, 2021; 105). Contudo, o uso de fagos inteiros levanta preocupações, como a transferência de genes de toxinas e resistência a antibióticos entre bactérias, além do risco de surgimento de resistência bacteriana aos fagos (Oechslin, 2018; Dabrowska *et al.*, 2019).

Em contrapartida, as despolimerases livres apresentam vantagens adicionais: são geneticamente estáveis, mantêm atividade em condições externas adversas e a probabilidade de desenvolvimento de resistência bacteriana contra elas é considerada baixa (Latka *et al.*, 2017; Reuter & Kruger, 2020; Deveau *et al.*, 2002). Além disso, por não estarem presas à estrutura viral, sua difusão tende a ser mais rápida e eficiente em comparação às despolimerases associadas a virions (Chan & Abedon, 2015). Assim, essas características reforçam o potencial das despolimerases como agentes complementares ou alternativos à fagoterapia no enfrentamento de infecções bacterianas resistentes.

Diante disso, estudos voltados à compreensão do biofilme e dos fatores de virulência de *K. pneumoniae* são fundamentais para o desenvolvimento de alternativas capazes de degradar essas estruturas. Essa abordagem mostra-se promissora a longo prazo em comparação com o uso de antibióticos, já que o biofilme desempenha papel central na virulência de microrganismos multirresistentes (Li; Li; Chen; Guo *et al.*, 2021; Piperaki; Syrogiannopoulos; Tzouveleki; Daikos, 2017; Vuotto; Longo; Balice; Donelli *et al.*, 2014). Assim, o presente estudo teve como objetivo explorar o potencial de despolimerases fágicas como estratégia alternativa para o enfrentamento da pneumonia causada por *K. pneumoniae*, patógeno de grande relevância clínica e impacto global em saúde pública. Para isso, a pesquisa concentrou-se na identificação, em nível *in silico*, de genes candidatos a despolimerases em genomas de bacteriófagos de *Klebsiella pneumoniae*.

1.2 Problema de pesquisa

Dado que as despolimerases desempenham papel fundamental ao permitir que bacteriófagos atravessem a barreira exopolissacarídica durante o processo de adsorção, este estudo busca identificar *in silico*, enzimas com potencial de aplicação como terapia alternativa, voltada à degradação da matriz de exopolissacarídeos (EPS) de *Klebsiella pneumoniae*.

1.3 Objetivo Geral

Empregar abordagens *in silico* baseadas em ferramentas de bioinformática para identificar genes candidatos a despolimerases putativas em genomas de bacteriófagos, visando subsidiar estudos posteriores de produção, purificação e avaliação da eficácia dessas enzimas na degradação de biofilmes de *Klebsiella pneumoniae*, como estratégia terapêutica alternativa.

1.4 Objetivos específicos

- a) Utilizar ferramentas de bioinformática para identificar genes codificadores de possíveis despolimerases nos genomas dos fagos KP5, KP10, KP21, KP29, KP40, KP47 e KP62, isolados de *Klebsiella pneumoniae*.

- b) Estabelecer um protocolo para a amplificação dos genes de despolimerases selecionados, utilizando a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

1.5 Justificativa

A indústria farmacêutica enfrenta grandes desafios no combate às bactérias multirresistentes, em razão da notável capacidade desses microrganismos de se adaptar e adquirir resistência a diferentes classes de antibióticos (Laxminarayan *et al.*, 2013). Como consequência, observa-se uma perda progressiva da eficácia dos fármacos disponíveis, reduzindo de forma significativa as opções terapêuticas no mercado. Diante desse cenário, em que a resistência bacteriana se consolida como um problema global crescente, os bacteriófagos despontam como uma estratégia promissora de controle biológico, com aplicações potenciais em humanos, animais, plantas e alimentos (Chanishvili; Tediashvili; Barrow, 2001; Leverentz; Conway; Camp; Janisiewicz *et al.*, 2003). Esse quadro crítico é agravado pela redução no investimento em pesquisas voltadas ao desenvolvimento de novos compostos antibacterianos. O alto custo e a complexidade envolvidos tornam o processo de inovação farmacêutica mais lento do que a velocidade com que as bactérias evoluem resistência e ampliam sua capacidade de infecção. Assim, o controle de bactérias multirresistentes, especialmente entre patógenos Gram-negativos, permanece como um dos maiores desafios para a saúde pública mundial (Chung, 2016; Dennesen; Bonten; Weinstein, 1998; Gajdács; Albericio, 2019). Nesse contexto, torna-se fundamental a busca por alternativas terapêuticas que possam substituir ou atuar em conjunto com antibióticos convencionais no tratamento de infecção como causadas pela *K. pneumoniae* (Yan; Mao; Xie, 2014). Essa bactéria é reconhecida como uma das principais causadoras de infecções hospitalares graves, frequentemente associada à resistência na maioria dos tratamentos disponíveis. Frente a esse desafio, as despolimerases virais surgem como uma alternativa promissora, pois apresentam ação específica contra a matriz de exopolissacarídeos (EPS), estrutura essencial para a formação do biofilme bacteriano. Esse biofilme contribui diretamente para a virulência da bactéria e para sua proteção contra antibióticos. Nesse sentido, a prospecção *in silico* de domínios de despolimerases em fagos específicos de *K. pneumoniae* configura-se como uma estratégia biotecnológica relevante. Essas enzimas, por possuírem alta especificidade no reconhecimento do EPS, têm potencial

para degradar o biofilme e, conseqüentemente, reduzir a resistência bacteriana, oferecendo novas perspectivas para o tratamento de infecções causadas por esse patógeno (Li; Li; Chen; Guo *et al.*, 2021).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Isolados de *Klebsiella pneumoniae* e bacteriófagos

Os bacteriófagos utilizados neste estudo foram isolados a partir de amostras de esgoto não filtradas provenientes de uma estação de tratamento de águas residuais localizada em Manchester, Reino Unido. Os isolados de *Klebsiella pneumoniae*, assim como os respectivos bacteriófagos, foram gentilmente fornecidos pelo Prof. Mark Charles Enright (Manchester Metropolitan University, Manchester – Reino Unido). No total, foram analisadas sete linhagens fágicas (Tabela 1), cujos dados genômicos, juntamente com os das bactérias hospedeiras correspondentes, estão disponíveis como parte dos resultados do projeto apoiado pela FAPESP (Processo nº 2018/21164-5). As linhagens de *K. pneumoniae* serão cultivadas em meio TSB (Tryptic Soy Broth, 17 g de Triptona, 3 g de Digestão Papaica de Farinha de Soja, 2,5 g de Glicose, 5 g de NaCl e 2,5 g de Fosfato Dipotássico para 1 L). Quando necessário, será adicionado ágar na concentração final de 15% para o preparo de meio sólido. Os bacteriófagos encontram-se preservados em tampão SM (100 mM NaCl; 10 mM MgSO₄; 50 mM Tris-HCl, pH 7.4; 0,01% ágar [v/v]) e armazenados a 4 °C até sua utilização.

Tabela 1 – Linhagens dos bacteriófagos com o tamanho do genoma e linhagem hospedeira de *K. pneumoniae*.

Fago	Tamanho do genoma (pb)	Linhagem hospedeira
KP5	51561	KH 1
KP10	49178	KH 11
KP21	43390	KH 7
KP29	51207	KH 1
KP40	43761	KH 1

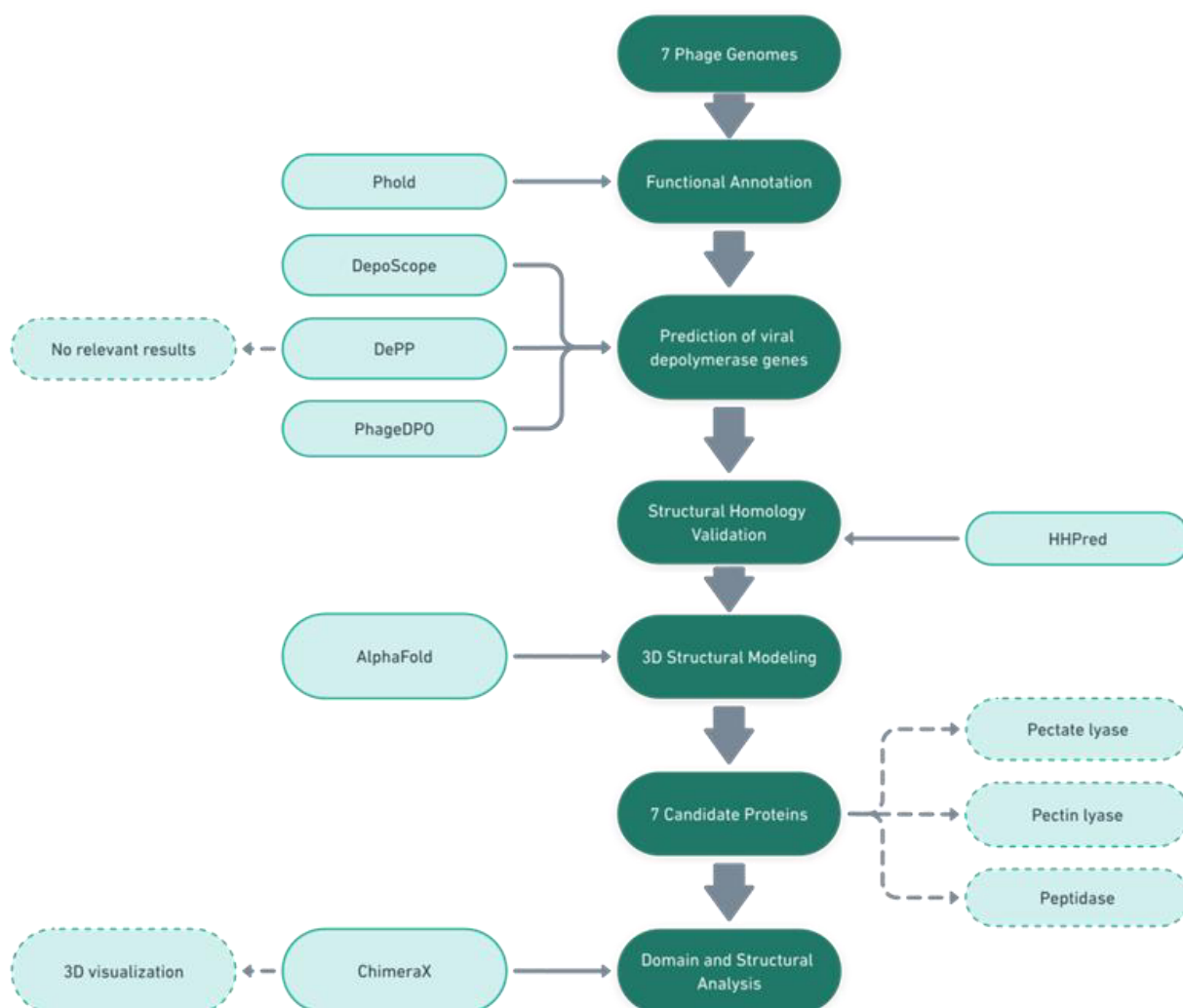
KP47	47396	KH 1
KP62	159455	KH 1

Fonte: elaborado pela autora.

2.2 Processamento em bioinformática

O DNA genômico dos fagos foi extraído por meio do método PCI/SDS (fenol/clorofórmio/álcool isoamílico [25:24:1] {v/v}) (Whittard *et al.*, 2021) e, posteriormente, sequenciado utilizando a plataforma Illumina Nextera XT. As sequências obtidas foram então montadas e anotadas com o auxílio de diferentes pipelines de bioinformática, incluindo Bowtie2, SPAdes, PharoKka e Phold (Langmead; Salzberg, 2012; Bankevich *et al.*, 2012; Bouras, 2022; Bouras, 2024). Para a prospecção de genes codificadores de despolimerases, foram analisadas sete sequências genômicas de bacteriófagos (Tabela 1). Na sequência, os genomas foram submetidos a um pipeline de predição funcional desenvolvido para identificar proteínas potencialmente envolvidas na degradação da cápsula bacteriana, como as despolimerases fágicas (Figura 1). A prospecção de sequências candidatas a despolimerases foi conduzida por meio de ferramentas baseadas em *machine learning*, especificamente PhageDPO, DePP e DepoScope (Vieira *et al.*, 2023; Magill; Skvortsov, 2023; Concha-Eloko *et al.*, 2024). Essas plataformas permitem a identificação de genes putativos de despolimerases a partir de genomas de fagos, utilizando bancos de dados treinados com enzimas já descritas na literatura. As sequências obtidas foram posteriormente avaliadas quanto à presença de domínios conservados utilizando a ferramenta HHpred (Zimmermann *et al.*, 2018) com busca por homologia. Para isso, aplicaram-se os parâmetros padrões, realizando buscas nos bancos de dados PDB_mmCIF70_25_may, Pfam-A_v37.4, UniProt-SwissProt-viral70_3_Nov_2021 e COG_KOG_v1.0. A modelagem tridimensional foi realizada com as ferramentas AlphaFold v1.5.5. e AlphaFold2-Multimer (Jumper *et al.*, 2021; Mirdita *et al.*, 2022). Os modelos obtidos foram posteriormente inspecionados no ChimeraX v1.10.1 (Meng *et al.*, 2023), o que possibilitou avaliar tanto a conformação estrutural quanto a confiabilidade preditiva.

Figura 1 - Painel representativo com uma visão geral esquemática do pipeline de análise bioinformática. O fluxo de trabalho integrou ferramentas bioinformáticas para identificar e validar proteínas candidatas com potencial atividade depolimerase.



Fonte: elaborado pela autora.

2.3 Extração de DNA dos bacteriófagos

O material genético dos fagos foi obtido a partir dos lisados utilizando o protocolo clássico de extração com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1 [v/v]) (Whittard *et al.*, 2021). Para cada isolado, 1,5 mL do lisado fágico foi centrifugado a 13.000 xg por 10 min a 4 °C. Em seguida, 1 mL do sobrenadante foi transferido para tubos de microcentrífuga de 2 mL, aos quais foi adicionado igual volume de fenol (pH 8.0). Após serem vortexados por 30 s e centrifugados (13.000 xg, 10 min, 4 °C), a fase aquosa foi cuidadosamente coletada e transferida para tubos de 1,5 mL. Nessa etapa,

adicionou-se o mesmo volume de fenol:clorofórmio (1:1 [v/v]), seguido de vortex (30 s) e centrifugação (13.000 xg, 10 min, 4 °C). A fase aquosa foi novamente recuperada e submetida a nova extração, desta vez com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1 [v/v]) (Whittard *et al.*, 2021), repetindo-se o processo de agitação (30 s) e centrifugação (13.000 xg, 20 min, 4 °C). O sobrenadante final foi então utilizado para a precipitação do DNA em tubos de microcentrífuga 1,5 mL, mediante adição de 2 volumes de etanol absoluto gelado e 1/10 do volume de acetato de sódio 3 M (pH 5.2) recém preparado. As amostras permaneceram a –20 °C por 16 h, para permitir a completa precipitação do material genético. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas (13.000 xg, 20 min, 4 °C), o sobrenadante descartado e o pellet contendo DNA lavado duas vezes com 1 mL de etanol 70% (v/v) gelado. Após as lavagens, o material foi seco em estufa a 45 °C por 2 h e, por fim, ressuspensionado em 100 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA). O DNA purificado foi utilizado nas etapas subsequentes de amplificação de genes de despolimerases.

2.4 Isolamento dos genes de despolimerases

Com base nas sequências selecionadas por *machine learning*, foram desenhados primers específicos (Quadro 1), avaliados quanto à estabilidade, possibilidade de formação de estruturas secundárias, temperatura de *melting* (T_m) e outras propriedades, empregando-se o software *GeneRunner* v.6.5.52. Os primers foram desenhados para amplificar tanto o CDS inteiro ao qual a despolimerase foi identificada e apenas o domínio com ação enzimática de despolimerase. A amplificação dos genes foi realizada utilizando a DNA polimerase Pfu (Cellco) ou Platus Taq DNA polimerase (Sinapse). As reações de PCR do tipo *touchdown* foram conduzidas em um termociclador Bio-Rad, modelo T100, e os parâmetros de ciclagem empregados estão descritos nas Tabelas 2 e 4. Os fragmentos resultantes foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 0,7%, possibilitando a detecção das bandas correspondentes ao tamanho esperado. A visualização e o registro dos géis foram feitos em um transiluminador *Azure Biosystems C600*. As amplificações foram conduzidas utilizando um protocolo de PCR do tipo *touchdown* (Korbie & Mattick, 2008), com modificações ajustadas conforme o tamanho de cada sequência.

Quadro 1 – Primers para a amplificação das despolimerases identificadas.

Primer	Sequência 5'-3'	Amplicon
KP5_CDS58_EcoRI_F	AAAGAATTCATGGCACTATACAGACAAGGC	2556
KP5_CDS58_XhoI_R	TTTCTCGAGTTAGTTCTCCAGAATATATCG	
KP5_CDS58_XhoI_R_Dom (*)	TTTCTCGAGTCAGTTGCCAGTATAGCTTCTG	642
KP10_CDS86_EcoRI_F	AAAGAATTCATGAACCTTTTTGCGTCGGAC	1539
KP10_CDS86_HindIII_R	TTTAAGCTTTTATGCTACCACCTCCCACGA	
KP10_CDS86_HindIII_R_Dom (*)	TTTAAGCTTTCACGCGTCGCTATCGAGTA	351
KP21_CDS11_EcoRI_F	AAAGAATTCATGTCGTTGGTGGATTAGTT	1992
KP21_CDS11_XhoI_R	TTTCTCGAGTCACACTGTCACAGGGTTAGCGCT	
KP21_CDS11_XhoI_R_Dom (*)	TTTCTCGAGTCAAGTCTTAGTCAGCCGCC	1521
KP29_CDS85_EcoRI_F	AAAGAATTCATGGCACTATACAGACAAGGC	2652
KP29_CDS85_XhoI_R	TTTCTCGAGTTACATCTCTAACTTTTCTTCAATGG	
KP40_CDS4_BamHI_F	TTTGGATCCATGTCTTTAGTTAATGTGATATATCC C	1695
KP40_CDS4_XhoI_R	TTTCTCGAGCTACTGGGCTAACTCAGCAAT	
KP40_CDS4_XhoI_R_Dom (*)	TTTCTCGAGTCACCCACCTGACGGTTCGG	1481
KP62_CDS139_EcoRI_F	AAAGAATTCATGAATCCGCAATTTAGTCAG	1842
KP62_CDS139_XhoI_R	TTTCTCGAGTTATACTACAGCACCAGTCGC	
KP62_CDS139_HindIII_R_Dom(*)	TTTAAGCTTTTATAATTCGTAAGTTCCCCCA	1662

(*) Para as amplificações referentes aos fragmentos de domínio, foi utilizado o mesmo primer Forward empregado nas reações de gene inteiro. Dessa forma, cada amplicon

correspondente ao domínio foi obtido a partir da combinação do primer Forward do gene completo com o primer Reverse específico de cada domínio.

Fonte: elaborado pela autora.

2.5 Reações de amplificações e protocolos

A amplificação por PCR foi realizada afim de obter as sequências das despolimerases em quantidade e qualidade adequadas para viabilizar sua clonagem no vetor e, posteriormente, permitir a expressão heteróloga das proteínas. Essa etapa foi essencial para isolar especificamente os genes completos e seus domínios catalíticos a partir do DNA fágico, gerando fragmentos compatíveis com os sítios de restrição necessários à construção dos plasmídeos recombinantes. As amplificações foram conduzidas utilizando Taq DNA polimerase ou DNA polimerase Pfu conforme as recomendações do fabricante (Quadro 2 e 3), garantindo eficiência e fidelidade adequadas para as etapas subsequentes. Ambas as reações seguiram um protocolo de PCR *touchdown* (Korbie & Mattick, 2008), onde nessas reações, tanto os fragmentos correspondentes aos genes completos quanto aqueles referentes apenas aos domínios associados à degradação de açúcares foram amplificados a partir do DNA extraído dos fagos previamente purificados (Tabelas 2, 3, 4 e 5).

Quadro 2 - Reação de amplificação para os genes KP5_CDS58_Domínio, KP21_CDS11_Gene_Inteiro e KP21_CDS11_Domínio com Taq.

Reagentes	Quantidade
Taq DNA polimerase	1 U
Primers F e R	1 μ M
dNTPs	200 μ M

Tampão 10x	Diluído para 1X (5 µL)
DNA molde	~20 ng
H2O MiliQ autoclavada	q.s.p 50 µL
Volume final	50 µL

Fonte: elaborado pela autora.

Quadro 3 - Reação de amplificação dos genes KP5_CDS58_Gene_Inteiro, KP5_CDS58_Domínio, KP10_CDS86_Domínio, KP29_CDS85_Gene_Inteiro e KP21_CDS11_Gene_Inteiro com Pfu suplementado com Betaína.

Reagentes	Quantidade
Pfu DNA polimerase	1 U
Primers F e R	1 µM
dNTPs	200 µM
Tampão 10x	Diluído para 1X (5 µL)
Betaína	1 M
DNA molde	~20 ng

H2O MiliQ autoclavada	q.s.p 50 µL
Volume final	50 µL

Fonte: elaborado pela autora.

Tabela 2 - Ciclo de amplificações positivas em *touchdown* com a utilização de Taq Polimerase dos fragmentos de gene inteiro selecionados de despolimerases.

Repetições	Etapa	KP5		KP21	
		Temperatura (°C)	Tempo (m)	Temperatura (°C)	Tempo (m)
	Desnaturação inicial	95	2:30	95	2:30
4	Desnaturação	95	0:45	95	0:45
	Anelamento	60	0:45	60	0:45
	Extensão*	72	3	72	2
30	Desnaturação	95	0:45	95	0:45
	Anelamento	60	0:45	60	0:45
	Extensão*	72	3	72	2
	Extensão final*	72	6	72	4

(*) A etapa de extensão a 72 °C teve sua duração ajustada conforme o tamanho de cada amplicon. Para as reações com a polimerase Taq, considerou-se o tempo de 1 minuto a cada 1000 pb de fragmento. Já a extensão final foi realizada com o tempo correspondente ao dobro do definido para a extensão inicial.

Fonte: elaborado pela autora.

Tabela 3 - Ciclo de amplificações positivas em *touchdown* com a utilização de Taq Polimerase dos fragmentos de domínio selecionados de despolimerases.

Repetições	Etapa	KP5		KP21	
		Temperatura (°C)	Tempo (m)	Temperatura (°C)	Tempo (m)
	Desnaturação inicial	95	2:30	95	2:30
4	Desnaturação	95	0:45	95	0:45
	Anelamento	60	0:45	60	0:45
	Extensão*	72	1	72	2
30	Desnaturação	95	0:45	95	0:45
	Anelamento	60	0:45	60	0:45
	Extensão*	72	1	72	2
	Extensão final*	72	2	72	4

(*) A etapa de extensão a 72 °C teve sua duração ajustada conforme o tamanho de cada amplicon. Para as reações com a polimerase Taq, considerou-se o tempo de 1 minuto a cada

1000 pb de fragmento. Já a extensão final foi realizada com o tempo correspondente ao dobro do definido para a extensão inicial.

Fonte: elaborado pela autora.

Tabela 4 - Ciclo de amplificações positivas em *touchdown* com a utilização de PFU Polimerase dos fragmentos de gene inteiro selecionados de despolimerases.

Repetições	Etapa	KP5		KP21		KP29	
		Temperatura (°C)	Tempo (m)	Temperatura (°C)	Tempo (m)	Temperatura (°C)	Tempo (m)
4	Desnaturação inicial	95	2:30	95	2:30	95	2:30
	Desnaturação	92	0:45	92	0:45	92	0:45
	Anelamento	65	1	65	1	65	1
	Extensão*	72	3	72	2	72	6
30	Desnaturação	95	0:45	95	0:45	95	0:45
	Anelamento	50	1	50	1	50	1
	Extensão*	72	3	72	2	72	6
	Extensão final*	72	6	72	4	72	12

(*) A etapa de extensão a 72 °C teve sua duração ajustada conforme o tamanho de cada amplicon. Para as reações com a polimerase Pfu, considerou-se o tempo de 30 segundos para cada 500 pb de fragmento. Já a extensão final foi realizada com o tempo correspondente ao dobro do definido para a extensão inicial.

Fonte: elaborado pela autora.

Tabela 5 - Ciclo de amplificação *touchdown* com a utilização de PFU Polimerase dos fragmentos de domínios selecionados de despolimerases.

Repetições	Etapa	KP5		KP10	
		Temperatura (°C)	Tempo (m)	Temperatura (°C)	Tempo (m)
	Desnaturação inicial	95	2:30	95	2:30
5	Desnaturação	92	0:45	9	0:45
	Anelamento	65	1	65	1
	Extensão*	72	2	72	1
30	Desnaturação	95	0:45	95	0:45
	Anelamento	50	1	50	1
	Extensão*	72	2	72	2
	Extensão final*	72	4	72	2

(*) A etapa de extensão a 72 °C teve sua duração ajustada conforme o tamanho de cada amplicon. Para as reações com a polimerase Pfu, considerou-se o tempo de 30 segundos para cada 500 pb de fragmento. Já a extensão final foi realizada com o tempo correspondente ao dobro do definido para a extensão inicial.

Fonte: elaborado pela autora.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análises de Bioinformática

A avaliação de genes candidatos a despolimerases nos genomas fágicos foi realizada com as ferramentas PhageDPO (Vieira *et al.*, 2023), DePP (Magill; Skvortsov, 2023) e DepoScope (Concha-Eloko *et al.*, 2024) (Tabela 6). Na análise pelo PhageDPO, foram identificadas 7 possíveis despolimerases: KP5_CDS58, KP10_CDS82, KP10_CDS86, KP21_CDS11, KP29_CDS85, KP40_CDS4 e KP62_CDS139, todas apresentando valores de predição superiores a 93% de probabilidade positiva para atividade de despolimerase. Já o DepoScope apresentou um resultado intermediário, identificando quatro genes como despolimerases potenciais: KP21_CDS11, KP29_CDS85, KP40_CDS4 e KP62_CDS139. Por outro lado, a análise realizada com a ferramenta DePP resultou em baixos percentuais de confiança para os genes avaliados, com valores variando entre 13% e 15%. Esse resultado pode refletir tanto o maior rigor de seus critérios preditivos quanto possíveis limitações no reconhecimento de determinadas famílias de proteínas. É importante destacar que os testes iniciais da ferramenta foram desenvolvidos a partir de um conjunto de 50 sequências de despolimerases de fagos, que eram majoritariamente, de Podovirus, que infectam bactérias Gram-negativas patogênicas da família *Pectobacteriaceae* (Magill; Skvortsov, 2023). Como a *K. pneumoniae* pertence à família Enterobacteriaceae isso pode indicar uma limitação da ferramenta para a identificação de despolimerase de fagos que infectam essa família.

Tabela 6 - Representação das sete proteínas identificadas em cada genoma de fagos após análise nas ferramentas DePP, PhageDPO e DepoScope.

Fago	CDS	DePP (%)	PhageDPO (%)	DepoScope (%)
KP5	58	16	100	10
KP10	82	15	99	10

KP10	86	14	93	10
KP21	11	16	99	100
KP29	85	16	99	100
KP40	4	13	99	90
KP62	139	14	100	90

Fonte: elaborado pela autora.

Para conferir a robustez das predições, os genes selecionados foram validados por homologia estrutural no HHpred (Zimmermann *et al.*, 2018), utilizando os bancos de dados previamente mencionados. Essa análise permitiu identificar domínios de ligação a açúcares e outros domínios conservados compatíveis com a atividade de despolimerase. Foram considerados significativos os *hits* anotados como pectato liase, pectina liase ou peptidase (Tabela 7), que correspondem a componentes estruturais característicos de despolimerases (Azeredo *et al.*, 2016). De acordo com o modo de ação, as despolimerases fágicas podem ser divididas em duas categorias principais: hidrolases e liases (Azeredo *et al.*, 2016). As polissacarídeo liases atuam clivando ligações glicosídicas do tipo (1,4) por meio de um mecanismo de β -eliminação (Sutherland, 1995; Michaud *et al.*, 2003). Dentro desse grupo, destacam-se as pectinas e pectato liases, enzimas pectolíticas capazes de degradar o ácido galacturônico, um dos principais constituintes dos polissacarídeos bacterianos e das paredes celulares vegetais (Friedrich & Whitfield, 2005; Garron & Cygler, 2010). Embora classicamente descritas em organismos vegetais e bacterianos (Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 2014), essas enzimas são também frequentemente codificadas por fagos, desempenhando papel crucial na penetração do biofilme bacteriano. Além disso, foram identificados domínios relacionados a hidrolases, em especial peptidases, enzimas que atuam sobre ligações peptídicas (Azeredo *et al.* 2016). Esse tipo de enzima é capaz de degradar o polipeptídeo capsular poli- γ -glutamato, um polímero sintetizado por algumas bactérias Gram-positivas, como *Bacillus* spp. (Kimura & Itoh, 2003; Candela & Fouet, 2006).

Tabela 7 – Possíveis despolimerases produzidas pelos fagos, identificadas pelas ferramentas DePP, DepoScope e PhageDPO. Sete isolados de fagos (KP5, KP10, KP21, KP29, KP40, KP47 e KP62) apresentaram proteínas com potencial a atividade despolimerase. Os domínios enzimáticos previstos, determinados pela análise de homologia HHpred, corresponderam às famílias de despolimerases conhecidas: pectina liase, pectato liase e peptidase.

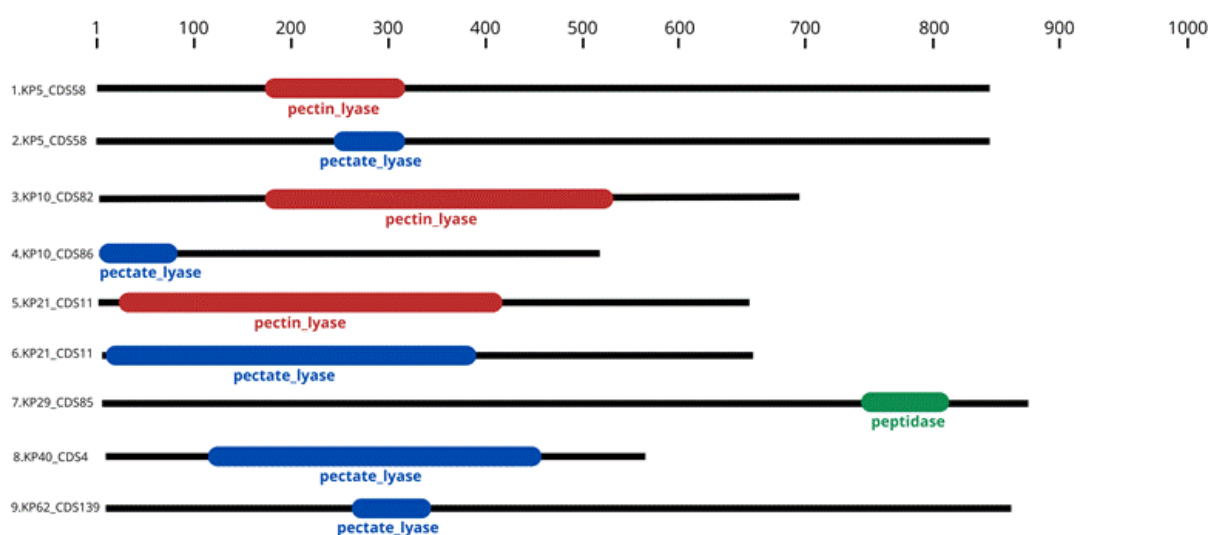
Fago	CDS	Aminoácidos	Domínio	Atividade	Alvo
KP5	58	845	Pectato liase e pectina liase	Degradar ácido hialurônico	EPS
KP10	82	695	Pectato liase e pectina liase	Degradar ácido hialurônico	EPS
KP10	86	695	Pectato liase e pectina liase	Degradar ácido hialurônico	EPS
KP21	11	657	Pectato liase e pectina liase	Degradar ácido hialurônico	EPS
KP29	85	877	Peptidase	Degradar ácido polissialico	CPS
KP40	4	558	Pectato liase	Degradar ácido hialurônico	EPS
KP62	139	859	Pectato liase	Degradar ácido hialurônico	EPS

Fonte: elaborado pela autora.

Esses domínios estão diretamente associados à degradação do exopolissacarídeo (EPS) bacteriano de *K. pneumoniae*, como o ácido galacturônico e o ácido polissialico, elemento essencial na formação de biofilmes, reforçando a relevância funcional das proteínas identificadas. Em particular, a detecção de

domínios compatíveis com enzimas pectolíticas corrobora com estudos anteriores que apontam a predominância desse grupo entre as despolimerases fágicas (Azeredo *et al.*, 2016), sugerindo que esses mecanismos de degradação de polímeros também possam ocorrer em *K. pneumoniae*.

Figura 2 - Distribuição dos domínios de atividade de despolimerase ao longo das enzimas identificadas. Os domínios *pectin_lyase* foram encontrados nos fagos KP5_CDS58, KP10_CDS82 e KP21_CDS11. Os domínios *pectate_lyase* foram encontrados nos fagos KP5_CDS58, KP10_CDS86, KP21_CDS11, KP40_CDS4 e KP62_CDS139 e *peptidase* em KP29_CDS85. Escala representa de 1 a 1000 aminoácidos.



Fonte: elaborado pela autora via Canva.com.

A distribuição dos domínios ao longo das sequências proteicas (Figura 2), representadas até 1000 aminoácidos, revelou variação significativa entre os fagos analisados. Em KP5_CDS58, foram identificados domínios de pectina liase e pectato liase, ambos associados à degradação de polissacarídeos da parede bacteriana. Situação semelhante foi observada em KP21_CDS11, que também apresentou simultaneamente os dois tipos de domínios, indicando maior versatilidade enzimática. No genoma de KP10, dois genes distintos se destacaram: KP10_CDS82, contendo um domínio de pectina liase, e KP10_CDS86, associado a pectato liase, reforçando a diversidade funcional dentro de um mesmo fago. Outros fagos apresentaram domínios específicos: KP29_CDS85 exibiu um domínio de peptidase, localizado na região C-

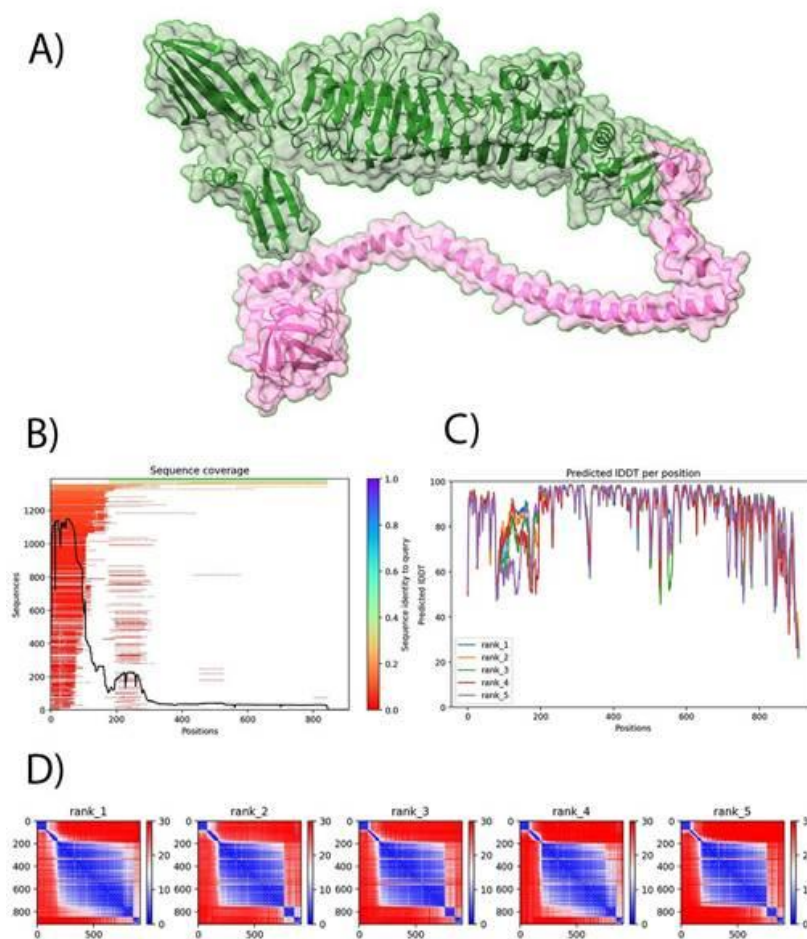
terminal, sugerindo um papel complementar na degradação de polímeros capsulares; enquanto KP40_CDS4 e KP62_CDS139 mostraram apenas domínios de pectato liase, distribuídos em regiões distintas de suas proteínas. Observamos que os domínios de pectato liase e pectina liase estão todos concentrados da extremidade N-terminal até a região central da enzima. Essa diversidade na distribuição e no tipo de domínios sugere que, embora cada fago mantenha sua especificidade natural de hospedeiro, as despolimerases codificadas apresentam variação estrutural e funcional. Esses arranjos distintos podem refletir diferentes mecanismos de interação com os polissacarídeos bacterianos, indicando que cada enzima possui potencial único de atuação na degradação de componentes da cápsula ou do biofilme.

Após a seleção dos genes candidatos por ferramentas baseadas em *machine learning* (PhageDPO, DePP e DepoScope) e a validação por homologia no HHPred, foram gerados os modelos tridimensionais das sete proteínas putativas de despolimerases. Essa etapa permitiu avaliar a conformação estrutural e a confiabilidade preditiva, além de identificar regiões com potencial de interação com açúcares - uma característica funcional típica de diversas despolimerases (Pires *et al.*, 2016).

A análise tridimensional predita pelo AlphaFold v.1.5.5. (Jumper *et al.*, 2021; Mirdita *et al.*, 2022) revelou que as proteínas candidatas apresentam padrões estruturais característicos de despolimerases. O modelo KP5_CDS58 (Figura 3) exibiu uma conformação central em β -hélice, compatível com enzimas pectinolíticas (Zheng *et al.*, 2021). Estrutura semelhante foi observada em KP10_CDS82 (Figura 4) e KP10_CDS86 (Figura 5), ambas com arquitetura de β -hélice, embora a primeira apresente maior extensão no domínio N-terminal. No caso de KP21_CDS11 (Figura 6), o modelo indicou a presença combinada de domínios relacionados a pectina e pectato liases, sustentados por folhas- β que formam a base da atividade catalítica (Zheng *et al.*, 2021). Diferentemente, KP29_CDS85 (Figura 7) apresentou um arranjo em que o domínio C-terminal é majoritariamente composto por α -hélices, condizente com sua anotação como peptidase. Já os modelos KP40_CDS4 (Figura 8) e KP62_CDS139 (Figura 9) exibiram conformações típicas de pectato liases, também dominadas por estruturas em β -hélice, sugerindo alta conservação estrutural entre essas enzimas. Os modelos tridimensionais reforçam que as proteínas analisadas compartilham a dobra estrutural comum às despolimerases de fagos, como observamos, por exemplo, na caracterização de modelos de despolimerases de

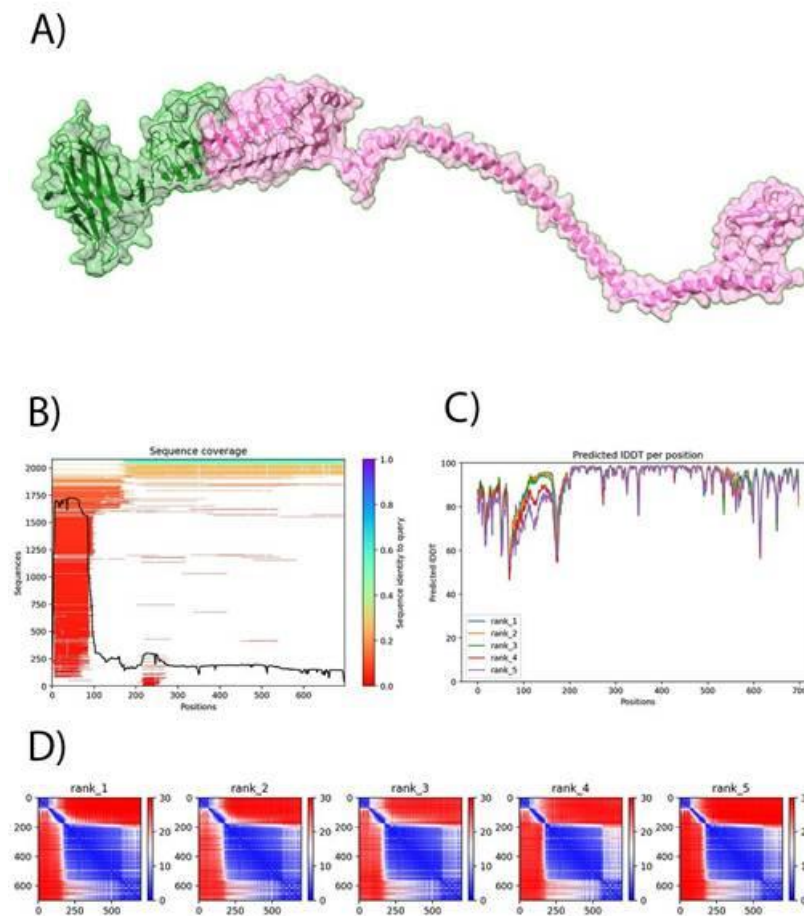
Escherichia coli (Kim, Y. *et al.*, 2023; Efimov, A. D. *et al.*, 2022; Pas, C., 2024). Estes conjuntos apresentam variações topológicas que podem refletir especificidades no reconhecimento de substratos. As análises evidenciaram uma alta similaridade na organização terciária entre as proteínas, reforçando a robustez das predições e sustentando a hipótese de que possam desempenhar atividade enzimática relevante na degradação dos componentes do EPS de *K. pneumoniae*. Os sete genes candidatos a possíveis despolimerases são considerados promissores para futuras etapas de clonagem, expressão e caracterização funcional.

Figura 3 - Modelagem estrutural da proteína KP5_CDS58, obtida com o AlphaFold v1.5.5. **A)** Representação tridimensional da proteína visualizada no ChimeraX. A proteína está destacada em verde, observa-se ao longo do arranjo tridimensional a presença do gene característico do tipo β -hélice associado a estruturas comumente descritas em despolimerases de fagos. Além disso, quatro domínios α -hélice estão distribuídos ao longo da sequência, intercalados por regiões de *loops*. O provável domínio funcional de ligação e degradação de açúcares encontra-se destacado em rosa (aminoácidos 187–322). **B)** Gráfico de cobertura da sequência, indicando a distribuição e profundidade de alinhamentos utilizados na predição estrutural. **C)** Valores previstos de IDDT por posição, demonstrando elevada confiabilidade da modelagem para a maior parte da sequência. **D)** Matrizes de Predicted Aligned Error (PAE) para os cinco modelos gerados, evidenciando consistência nas regiões estruturais principais e alta robustez das predições.



Fonte: elaborado pela autora com a utilização de AlphaFold v1.5.5. e AlphaFold2-Multimer.

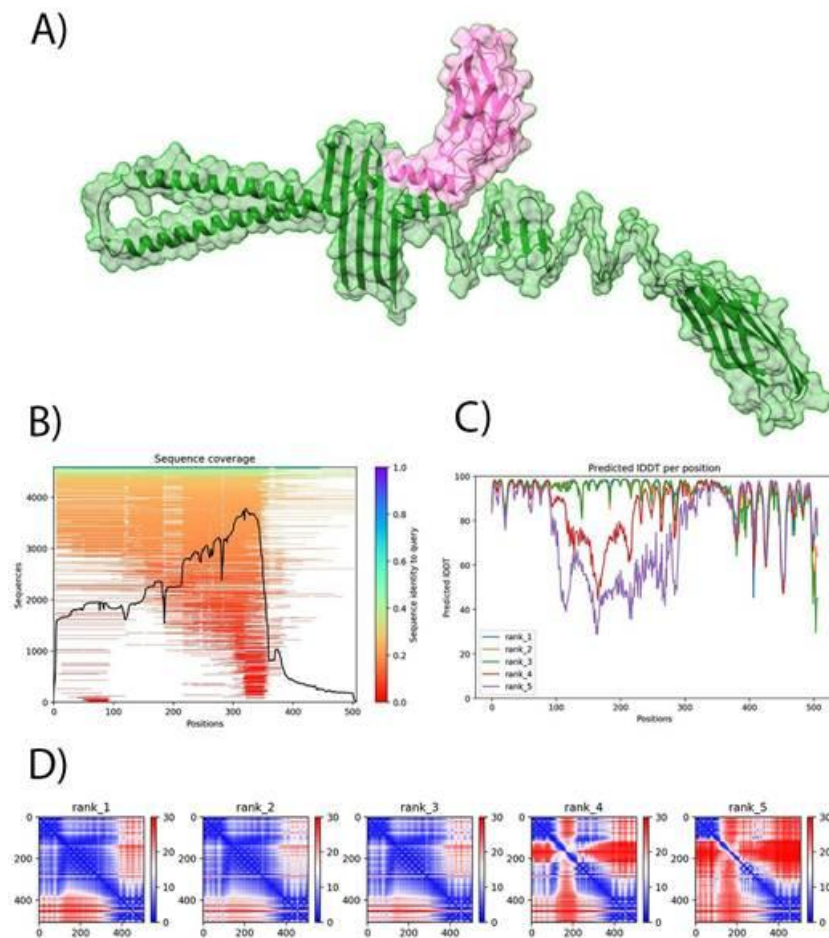
Figura 4 - Modelagem estrutural da proteína KP10_CDS82, construída com o AlphaFold v1.5.5. **A)** Estrutura tridimensional da proteína visualizada no ChimeraX. A proteína está destacada em verde, é possível observar um domínio característico do tipo β -hélice ao longo de seu arranjo, associado a estruturas típicas de despolimerases de fagos. Ao longo da proteína, destaca-se três domínios α -hélice distribuídos ao longo da sequência, intercalados por *loops*. O provável domínio funcional de ligação e degradação de açúcares encontra-se destacado em rosa (aminoácidos 173–524). **B)** Gráficos de Predicted Aligned Error (PAE) para os cinco modelos gerados, evidenciando consistência estrutural e baixo erro nas regiões principais. **C)** Gráfico de cobertura da sequência, indicando profundidade de alinhamento e identidade em relação à proteína consultada. **D)** Valores previstos de IDDT por posição, mostrando alta confiabilidade do modelo para a maior parte da sequência.



Fonte: elaborado pela autora com a utilização de AlphaFold v1.5.5. e AlphaFold2-Multimer.

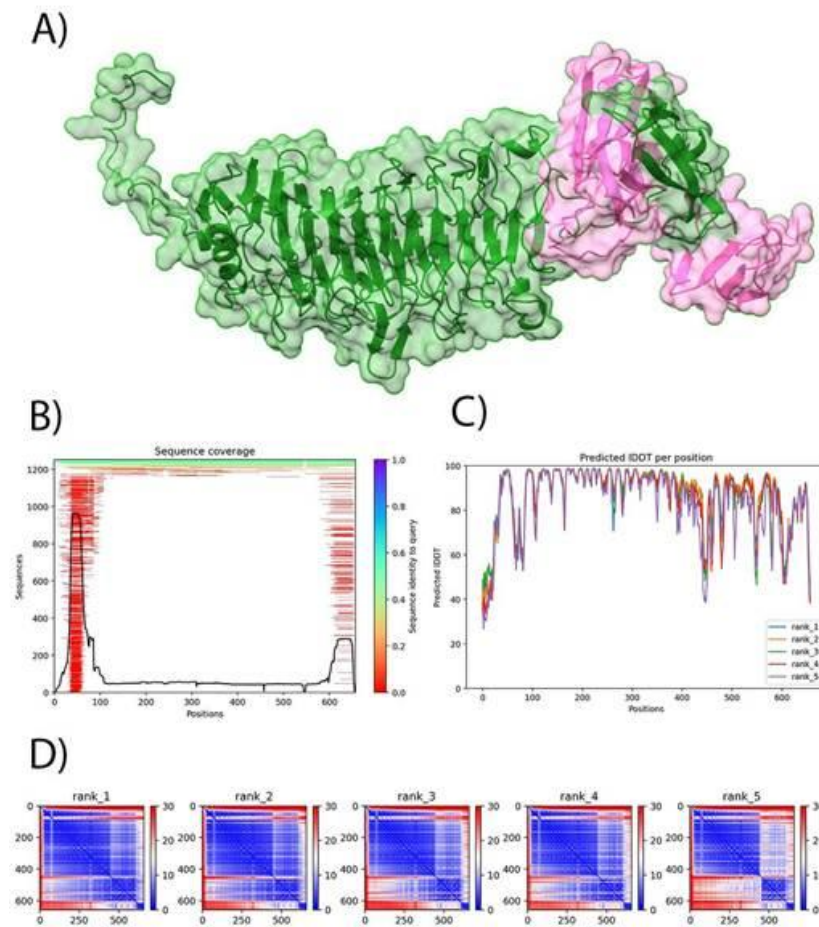
Figura 5 - Modelagem estrutural da proteína KP10_CDS86, construída com o AlphaFold v1.5.5. **A)** Estrutura tridimensional da proteína visualizada no ChimeraX.

A proteína está destacada em verde, ao longo de seu arranjo tridimensional observa-se um domínio do tipo β -hélice, típico de enzimas associadas a atividade de despolimerases. Além disso, são observados domínios α -hélice distribuídos ao longo da cadeia, intercalados por *loops*. O provável domínio funcional de ligação/degradação de açúcares encontra-se destacado em rosa (aminoácidos 1–87). **B)** Gráficos de Predicted Aligned Error (PAE) para os cinco modelos obtidos, indicando consistência e menor erro estrutural em regiões bem definidas. **C)** Gráfico de cobertura da sequência, evidenciando profundidade de alinhamento e identidade com a proteína consultada. **D)** Valores previstos de IDDT por posição, com alta confiabilidade estrutural ao longo da sequência.



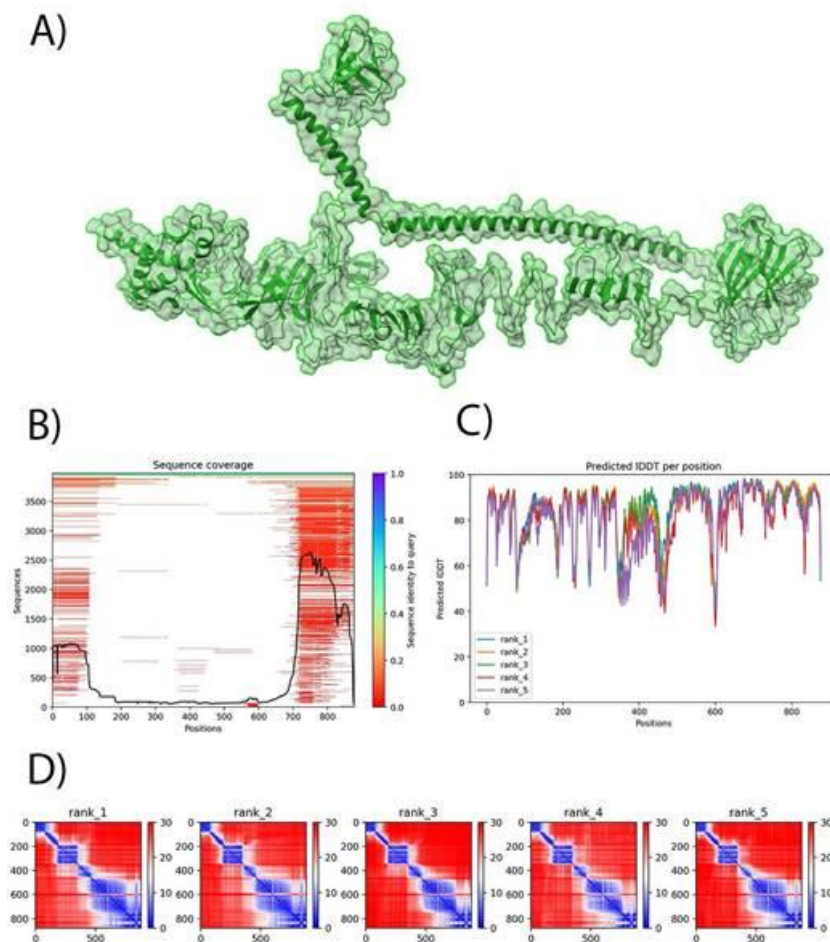
Fonte: elaborado pela autora com a utilização de AlphaFold v1.5.5. e AlphaFold2-Multimer.

Figura 6 - Modelagem estrutural da proteína KP21_CDS11, construída com o AlphaFold v1.5.5. **A)** Estrutura tridimensional da proteína visualizada no ChimeraX. A proteína está destacada em verde, e apresenta um domínio do tipo β -hélice ao longo de seu arranjo, característico de enzimas ligadas à atividade de despolimerases. Além disso, são observados domínios α -hélice distribuídos ao longo da cadeia, intercalados por *loops*. O domínio funcional associado à quebra de açúcares encontra-se destacado em rosa (aminoácidos 9–407). **B)** Gráfico de Predicted Aligned Error (PAE) para os cinco modelos gerados, indicando regiões com maior confiabilidade estrutural. **C)** Cobertura da sequência, mostrando a profundidade e identidade de alinhamento. **D)** Valores previstos de IDDT por posição, evidenciando alta confiabilidade estrutural na maior parte da proteína.



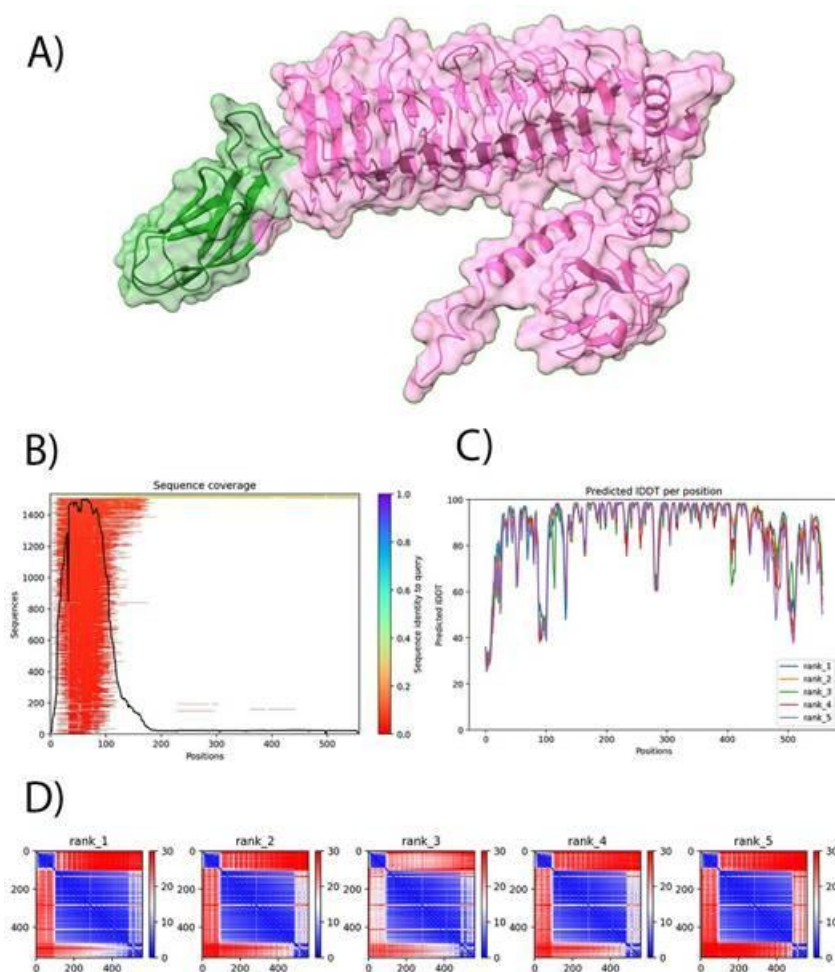
Fonte: elaborado pela autora com a utilização de AlphaFold v1.5.5. e AlphaFold2-Multimer.

Figura 7 - Modelagem estrutural da proteína KP29_CDS85, construída com o AlphaFold v1.5.5. **A)** Estrutura tridimensional visualizada no ChimeraX. A proteína está destacada em verde, ao longo de sua cadeia observa-se domínios α -hélice distribuídos ao longo da sequência, intercalados por *loops*. O domínio funcional associado à quebra de açúcares foi identificado em uma região extensa, correspondente aos aminoácidos 679–810. Devido ao seu tamanho e complexidade, optou-se pela clonagem apenas do gene completo previsto. **B)** Gráfico de Predicted Aligned Error (PAE), evidenciando a confiabilidade da predição estrutural. **C)** Cobertura da sequência, indicando a profundidade de alinhamentos usados no modelo. **D)** Valores previstos de IDDT por posição, com alta confiança na maior parte da estrutura proteica.



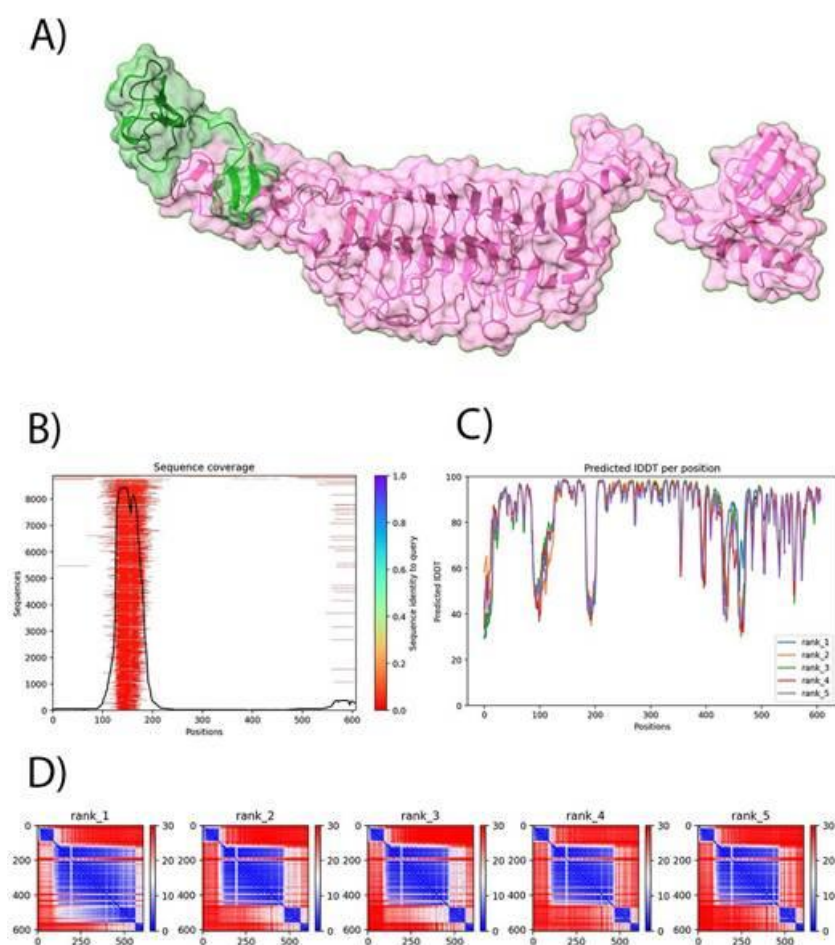
Fonte: elaborado pela autora com a utilização de AlphaFold v.1.5.5. e AlphaFold2-Multimer.

Figura 8 - Modelagem estrutural da proteína KP40_CDS4, construída com o AlphaFold v1.5.5. **A)** Estrutura tridimensional visualizada no ChimeraX. A proteína está destacada em verde, observa-se ao longo de seu arranjo um domínio do tipo β -hélice, acompanhado por dois domínios α -hélice distribuídos ao longo da sequência, intercalados por *loops*. O domínio associado à degradação de açúcares foi identificado entre os aminoácidos 102–437, também destacado em rosa. **B)** Gráfico de Predicted Aligned Error (PAE), evidenciando a confiabilidade dos alinhamentos usados no modelo. **C)** Cobertura da sequência, mostrando a distribuição de alinhamentos ao longo da proteína. **D)** Valores previstos de IDDT por posição, indicando alta confiança estrutural na maioria das regiões do modelo.



Fonte: elaborado pela autora com a utilização de AlphaFold v1.5.5. e AlphaFold2-Multimer.

Figura 9 - Modelagem estrutural da proteína KP62_CDS139, construída com o AlphaFold v1.5.5. **A)** Estrutura tridimensional visualizada no ChimeraX. A proteína está destacada em verde, ao longo de seu arranjo observa-se um domínio do tipo β -hélice, acompanhado por domínios α -hélice distribuídos ao longo da sequência, intercalados por *loops*. O domínio de degradação de açúcares foi identificado entre os aminoácidos 264–334, destacado em rosa. **B)** Gráfico de Predicted Aligned Error (PAE), indicando a confiabilidade dos alinhamentos empregados para a predição estrutural. **C)** Cobertura da sequência, evidenciando a representatividade dos alinhamentos ao longo da proteína. **D)** Valores previstos de IDDT por posição, que demonstram alta confiabilidade estrutural para a maior parte da sequência.



Fonte: elaborado pela autora com a utilização de AlphaFold v1.5.5. e AlphaFold2-Multimer.

Após a seleção de sete genes de despolimerases, foram conduzidas reações de PCR visando a amplificação tanto da sequência completa quanto do domínio de cada gene. A Taq DNA polimerase foi inicialmente utilizada em um protocolo de PCR *touchdown* (Korbie & Mattick, 2008) (Quadro 2), resultando em amplificações positivas para quatro alvos: KP5_CDS58_Gene_Inteiro, KP5_CDS58_Domínio, KP21_CDS11_Gene_Inteiro e KP21_CDS11_Domínio (Figura 10; Tabelas 2 e 3). Nessas reações, tanto os fragmentos correspondentes aos genes completos quanto aqueles referentes apenas aos domínios associados à degradação de açúcares foram amplificados a partir do DNA extraído dos fagos previamente purificados.

Foram realizadas reações de PCR com Pfu DNA polimerase associada à Betaína 1M, em um protocolo otimizado de PCR *touchdown* (Korbie & Mattick, 2008) (Quadro 3), com o objetivo de ampliar o espectro de genes obtidos a partir dos primers

previamente desenhados. Com essa abordagem, foram observadas amplificações positivas para: KP5_CDS58_Gene_Inteiro, KP5_CDS58_Domínio, KP10_CDS86_Domínio, KP29_CDS85_Gene_Inteiro e KP21_CDS11_Gene_Inteiro (Figura 11; Tabelas 4 e 5).

De forma consolidada, observou-se que o gene KP5_CDS58, tanto em sua versão completa quanto no domínio, foi amplificado de maneira consistente em todas as condições testadas, utilizando-se tanto a Taq DNA polimerase quanto a Pfu associada à Betaína, o que confirma a robustez dos primers desenhados (Figuras 10 e 11; Quadros 2 e 3). Para o gene KP10_CDS86, a amplificação positiva foi restrita ao domínio e somente quando empregada a condição com Pfu + Betaína (Tabela 5; Figura 11; Quadro 3). Outras abordagens, incluindo o uso de Taq, Pfu com formamida (10%), Pfu com DMSO (3%) ou a combinação de formamida (10%) e DMSO (3%), não resultaram em amplificação detectável. Em relação ao gene KP21_CDS11, o fragmento correspondente ao gene inteiro foi amplificado com sucesso em ambas as condições testadas (Taq e Pfu + Betaína), enquanto o domínio pôde ser obtido exclusivamente por meio da reação com Taq DNA polimerase (Figura 10; Quadros 2 e 3). Já o gene KP29_CDS85 apresentou amplificação positiva apenas para a sequência completa, e unicamente na condição com Pfu + Betaína (Figura 11; Quadro 3; Tabela 4). Assim como no caso de KP10, as tentativas empregando Taq, Pfu com formamida (10%), Pfu com DMSO (3%) ou suas combinações não geraram resultados satisfatórios. Por outro lado, os genes KP40_CDS4 e KP62_CDS139 (gene inteiro e domínio) não apresentaram quaisquer amplificações em nenhuma das condições testadas.

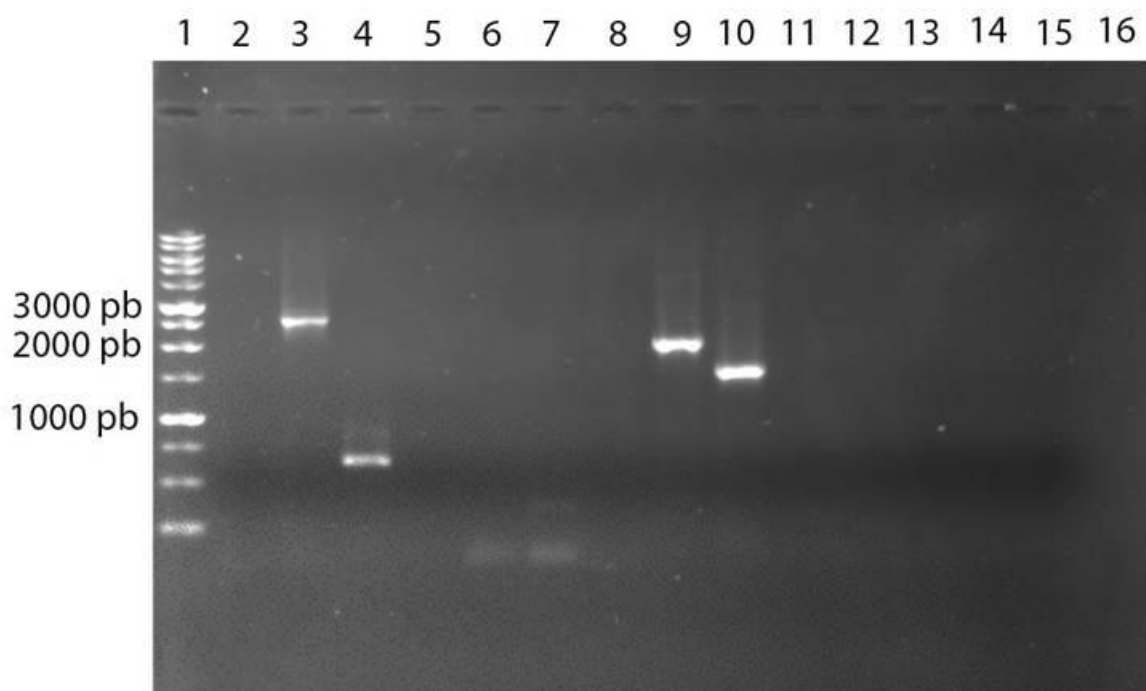
Os experimentos demonstraram que a eficiência de amplificação variou de acordo com o gene alvo e com as condições empregadas. Esses resultados evidenciam que a adição de Betaína 1M às reações com Pfu DNA polimerase foi determinante para a obtenção de amplificações em genes que não apresentaram resultados positivos nas condições padrão com Taq ou com outras adições de co-solventes. Além disso, observa-se que alguns genes (ex.: KP5) apresentam maior facilidade de amplificação, enquanto outros (ex.: KP40 e KP62) se mostraram refratários, possivelmente em decorrência de características intrínsecas da sequência, como elevado conteúdo GC, presença de estruturas secundárias estáveis ou falhas no desenho dos primers.

A utilização de aditivos como Betaína, DMSO e formamida é relatada de forma recorrente como uma estratégia eficaz para contornar as limitações observadas na amplificação de regiões de DNA ricas em GC ou que apresentam estruturas secundárias estáveis, frequentemente responsáveis por interromper a atividade das DNA polimerases (Henke, 1997; Lorenz, 2012). Em moldes ricos em GC, a dificuldade de separação entre as duas fitas e a tendência de formação de estruturas secundárias que competem com o anelamento dos primers tornam a amplificação especialmente desafiadora. Nessa perspectiva, a Betaína exerce um papel fundamental ao reduzir a energia necessária para a dissociação das fitas de DNA (Rees *et al.*, 1993), enquanto o DMSO e a formamida contribuem de forma semelhante, promovendo a desestabilização das ligações de hidrogênio entre as fitas complementares e favorecendo, assim, a progressão da reação (Geiduschek & Herskovits, 1961). Assim, não surpreende que genes como KP10 e KP29 tenham sido amplificados apenas na condição com Pfu + Betaína, evidenciando a relevância desse aditivo para sequências mais desafiadoras.

Além disso, é relatado que reações com baixo rendimento podem ter sua eficiência aumentada quando são adicionados intensificadores como Betaína (1 M), DMSO (1–10%) ou formamida (1–10%). No entanto, deve-se considerar que concentrações elevadas destes compostos podem comprometer a atividade da Taq DNA polimerase e possivelmente de outras polimerases, conforme observado por Varadaraj e Skinner (1994). Dessa forma, fica evidente que a otimização das condições de PCR precisa ser conduzida de maneira criteriosa, uma vez que o êxito da amplificação depende não apenas do desenho dos primers, mas também da escolha adequada da enzima, do aditivo, dos parâmetros experimentais empregados e de boas práticas de pipetagens.

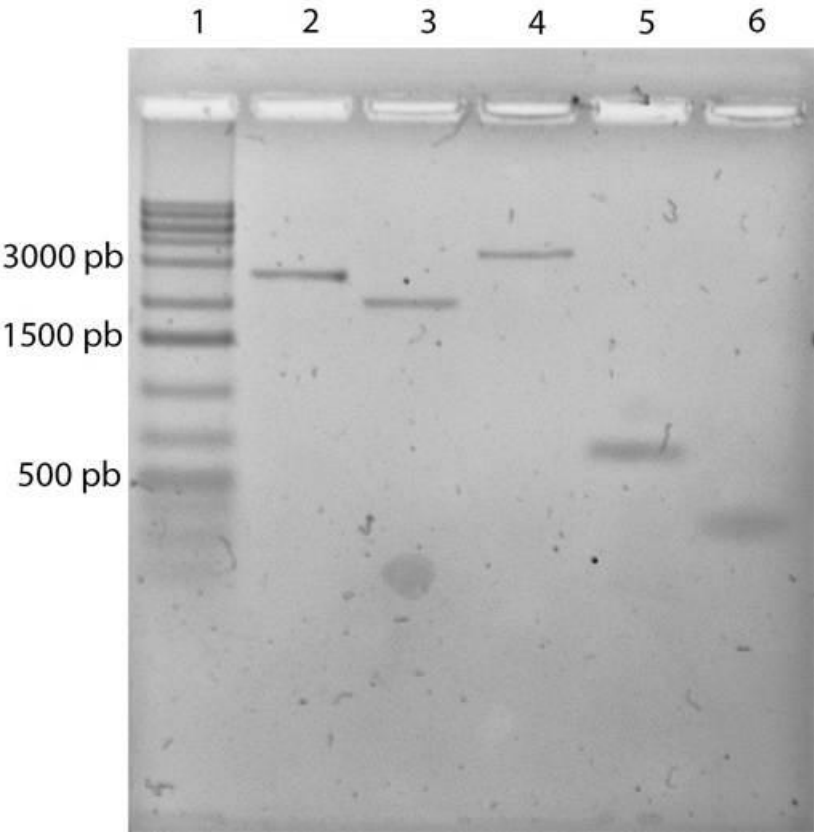
Figura 10 – Visualização por eletroforese em gel de agarose (0,7%) do produto de PCRs obtidos com Taq DNA Polimerase. Nos poços de 2 a 16 correspondem às amplificações bem-sucedidas dos genes e domínios selecionados com os primers desenhados especificamente para cada alvo. Na canaleta 1 encontra-se o marcador de peso molecular 1kb ladder (GoldBio). Na canaleta 2, branco da reação do gene KP5; Canaleta 3, amplificação do gene KP5 Gene inteiro (2.556 pb); Canaleta 4, amplificação do gene KP5 domínio (642 pb); Canaleta 5, branco da reação do gene KP10; Canaleta 6, amplificação do gene KP10 gene inteiro; Canaleta 7, amplificação

do gene KP10 domínio; Canaleta 8, branco da reação do gene KP21; Canaleta 9, amplificação do gene KP21 gene inteiro (1.992 pb); Canaleta 10, amplificação do gene KP21 domínio (1.521 pb); Canaleta 11, branco da reação do gene KP29; Canaleta 12, amplificação do gene KP29 gene inteiro; Canaleta 13, branco da reação do gene KP62; Canaleta 14, amplificação do gene KP62 gene inteiro; Canaleta 15, amplificação do gene KP62 domínio; Canaleta 16, nenhuma amostra foi pipetada.



Fonte: imagem obtida com o transiluminador *Azure Biosystems C600*.

Figura 11 - Análise por eletroforese em gel de agarose (0,7%) dos produtos de PCR obtidos com a DNA polimerase Phusion Pfu. Na Canaleta 1 encontra-se o marcador de peso molecular 1 kb ladder (Cellco). Na Canaleta 2, amplificação do gene KP5 gene inteiro (2.556 pb); Canaleta 3, amplificação do gene KP21 gene inteiro (1.992 pb); Canaleta 4, amplificação do gene KP29 gene inteiro (2.652 pb); Canaleta 5, amplificação do gene KP5 domínio (642 pb); Canaleta 6, amplificação do gene KP10 domínio (351 pb).



Fonte: imagem obtida com o transiluminador *Azure Biosystems C600*.

4 CONCLUSÃO

Este trabalho reforça o potencial das despolimerases virais como ferramentas inovadoras no combate a *Klebsiella pneumoniae*, um patógeno multirresistente de grande relevância clínica. A prospecção *in silico* identificou diferentes genes candidatos, cuja modelagem estrutural revelou a presença de domínios β -hélice e regiões putativas de ligação a açúcares, típicas de despolimerases já caracterizadas, sugerindo forte potencial enzimático contra polissacarídeos capsulares. Apesar de divergências entre as ferramentas utilizadas (DePP, PhageDPO e DepoScope), foi possível observar padrões estruturais recorrentes em despolimerases de fagos descritas na literatura, fortalecendo a escolha das sequências analisadas como candidatas promissoras.

No âmbito experimental, a amplificação dos genes mostrou-se desafiadora, refletindo limitações também relatadas em estudos prévios de expressão heteróloga de proteínas fágicas. Ainda assim, foram obtidos avanços concretos com a amplificação bem-sucedida de alguns genes e domínios, consolidando as primeiras etapas rumo à produção recombinante e futura avaliação funcional. Observou-se que a adição de betaína associada à Pfu DNA polimerase foi determinante para superar dificuldades de amplificação em sequências ricas em GC ou com estruturas secundárias estáveis, ressaltando a importância de ajustes finos nas condições de PCR.

Do ponto de vista terapêutico, os resultados obtidos sustentam a relevância das despolimerases como estratégias antivirulência, capazes de fragilizar a cápsula bacteriana, dispersar biofilmes e potencializar a ação de antibióticos. Estudos prévios já demonstraram eficácia dessas enzimas em modelos animais, reduzindo a virulência de *K. pneumoniae* e aumentando a suscetibilidade antimicrobiana, além de indicarem efeito sinérgico quando combinadas a fagos.

Apesar dos avanços, o trabalho apresenta limitações importantes. As análises *in silico*, embora robustas, não substituem a validação experimental, e a especificidade capsular das despolimerases pode restringir seu uso clínico. Além disso, a escassez de dados sobre fagos de hospedeiros Gram-negativos em bancos de treinamento pode explicar discrepâncias preditivas, reforçando a necessidade de ampliar essas bases para maior acurácia.

A principal contribuição deste estudo foi o estabelecimento de um pipeline integrado, combinando prospecção bioinformática e validação experimental inicial, capaz de priorizar genes promissores para etapas subsequentes. Em síntese, foram identificadas e caracterizadas candidatas estruturais compatíveis com despolimerases funcionais, reforçando sua viabilidade como agentes antivirulência. Para o futuro, será essencial avançar em etapas de expressão heteróloga, purificação e ensaios funcionais, incluindo testes de sinergia com antibióticos. Tais esforços serão determinantes para consolidar as despolimerases como alternativas terapêuticas promissoras no enfrentamento de infecções hospitalares causadas por *K. pneumoniae*.

REFERÊNCIAS

- AMAKO, K.; MENO, Y.; TAKADE, A. **Fine structures of the capsules of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* K1.** Journal of bacteriology, 170, n. 10, p. 4960-4962, 1988.
- ARAKAWA, Y.; WACHAROTAYANKUN, R.; NAGATSUKA, T.; ITO, H. et al. **Genomic organization of the *Klebsiella pneumoniae* cps region responsible for serotype K2 capsular polysaccharide synthesis in the virulent strain Chedid.** Journal of Bacteriology, 177, n. 7, p. 1788-1796, 1995.
- BALOGH, B.; DICKSTEIN, E. R.; JONES, J. B.; CANTEROS, B. I. **Narrow host range phages associated with citrus canker lesions in Florida and Argentina.** European Journal of Plant Pathology, 135, n. 2, p. 253-264, 2013/02/01 2013.
- BANKEVICH A; NURK S; ANTIPOV D; GUREVICH AA; DVORKIN M; KULIKOV AS; LESIN VM; NIKOLENKO SI; PHAM S; PRJIBELSKI AD; PYSHKIN AV; SIROTKIN AV; VYAHHI N; TESLER G; ALEKSEYEV MA; PEVZNER PA. (2012). **SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing.** Journal of Computational Biology. 19 (5): 455–477. doi:10.1089/cmb.2012.0021. PMC 3342519. PMID 22506599.
- BOURAS, G., NEPAL, R., HOUTAK, G., PSALTIS, A. J., WORMALD, P.-J., & VREUGDE, S. (2022). **Pharokka: a fast scalable bacteriophage annotation tool.** Bioinformatics, 39(1). <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btac776>.
- BOURAS, GEORGIOS. **Phold.** 2024. Disponível em: <https://github.com/gbouras13/phold>. Acesso em: 14 maio 2025.
- CANDELA T, FOUET A (2006). **Poly-gamma-glutamate in bacteria.** Mol Microbiol 60:1091–1098. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05179.x.
- CHAN, B.K.; ABEDON, S.T. **Bacteriophages and Their Enzymes in Biofilm Control.** Curr. Pharm. Des. 2015, 21, 85–99.
- CHANISHVILI, N.; CHANISHVILI, T.; TEDIASHVILI, M.; BARROW, P. A. **Phages and their application against drug-resistant bacteria.** Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 76, n. 7, p. 689-699, Jul 2001.
- CHEN, L.; MATHEMA, B.; CHAVDA, K. D.; DELEO, F. R. et al. **Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: molecular and genetic decoding.** Trends Microbiol, 22, n. 12, p. 686-696, Dec 2014.
- CHUNG, P. Y. **The emerging problems of *Klebsiella pneumoniae* infections: carbapenem resistance and biofilm formation.** FEMS microbiology letters, 363, n. 20, p. fnw219, 2016.
- CONCHA-ELOKO, ROBBY et al. **DepoScope: accurate phage depolymerase annotation and domain delineation using large language models.** bioRxiv, p. 2024.01. 15.575807, 2024.

DENNESEN, P. J.; BONTEN, M. J.; WEINSTEIN, R. A. **Multiresistant bacteria as a hospital epidemic problem**. *Annals of medicine*, 30, n. 2, p. 176-185, 1998.

DABROWSKA K, ABEDON ST. **Pharmacologically Aware Phage Therapy: Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Obstacles to Phage Antibacterial Action in Animal and Human Bodies**. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2019 Oct 30;83(4):e00012-19. doi: 10.1128/MMBR.00012-19. PMID: 31666296; PMCID: PMC6822990.

DAVID B. OLAWADE, OLUWASEUN FAPOHUNDA, EGHOSASERE EGBON, OLADIPO A. EBIESUWA, SUNDAY OLUWADAMILOLA USMAN, ALABA O. FARONBI, SANDRA CHINAZA FIDELIS, **Phage therapy: A targeted approach to overcoming antibiotic resistance**, *Microbial Pathogenesis*, Volume 197, 2024, 107088, ISSN 0882-4010, <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2024.107088>.

DE LA FUENTE-NÚÑEZ, C.; MANSOUR, S.C.; WANG, Z.; JIANG, L.; BREIDENSTEIN, E.B.M.; ELLIOTT, M.; REFFUVEILLE, F.; SPEERT, D.P.; RECKSEIDLER-ZENTENO, S.L.; SHEN, Y.; et al. **Anti-Biofilm and Immunomodulatory Activities of Peptides that Inhibit Biofilms Formed by Pathogens Isolated from Cystic Fibrosis Patients**. *Antibiotics* 2014, 3, 509–526.

DEVEAU, H.; VAN CALSTEREN, M.-R.; MOINEAU, S. **Effect of Exopolysaccharides on Phage-Host Interactions in *Lactococcus Lactis***. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002, 68, 4364–4369.

DI MARTINO, P.; BERTIN, Y.; GIRARDEAU, J.-P.; LIVRELLI, V. et al. **Molecular characterization and adhesive properties of CF29K, an adhesin of *Klebsiella pneumoniae* strains involved in nosocomial infections**. *Infection and immunity*, 63, n. 11, p. 4336-4344, 1995.

DOMINGUES, R.; BARBOSA, A.; SANTOS, S. B.; PIRES, D. P. et al. **Unpuzzling Friunavirus-Host Interactions One Piece at a Time: Phage Recognizes *Acinetobacter pittii* via a New K38 Capsule Depolymerase**. *Antibiotics (Basel)*, 10, n. 11, Oct 26 2021.

DRULIS-KAWA, Z.; MAJKOWASKA-SKROBEK, G.; MACIEKEWSKA, B. **Bacteriophages and Phage-Derived Proteins—Application Approaches**. *Curr. Med. Chem.* 2015, 22, 1757–1773.

EFIMOV, A.D.; GOLOMIDOVA, A.K.; KULIKOV, E.E.; BELALOV, I.S.; IVANOV, P.A.; LETAROV, A.V. **RB49-like Bacteriophages Recognize O Antigens as One of the Alternative Primary Receptors**. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 11329. <https://doi.org/10.3390/ijms231911329>.

FERNANDES, S.; SÃO-JOSÉ, C. **Enzymes and Mechanisms Employed by Tailed Bacteriophages to Breach the Bacterial Cell Barriers**. *Viruses* 2018, 10, 396.

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

FRIRDICH E, WHITFIELD C (2005). **Characterization of Gla(KP), a UDP-galacturonic acid C4-epimerase from *Klebsiella pneumoniae* with extended substrate specificity.** *J Bacteriol.* 187:4104–4115. doi:10. 1128/JB.187.12.4104-4115.2005.

GAJDÁCS, M.; ALBERICIO, F. **Antibiotic Resistance: From the Bench to Patients.** *Antibiotics*, 8, n. 3, p. 129, 2019.

GARRON M-L, CYGLER M (2010). **Structural and mechanistic classification of uronic acid-containing polysaccharide lyases.** *Glycobiology* 20:1547–1573. doi:10.1093/glycob/cwq122.

GEIDUSCHEK EP, HERSKOVITS TT. **Nonaqueous solutions of DNA. Reversible and irreversible denaturation in methanol.** *Arch Biochem Biophys.* 1961 Oct;95:114-29. doi: 10.1016/0003-9861(61)90116-3. PMID: 13897513.

GERLACH, G.-F.; CLEGG, S.; ALLEN, B. L. **Identification and characterization of the genes encoding the type 3 and type 1 fimbrial adhesins of *Klebsiella pneumoniae*.** *Journal of bacteriology*, 171, n. 3, p. 1262-1270, 1989.

GORRIE, C. L.; MIRCETA, M.; WICK, R. R.; JUDD, L. M. et al. **Antimicrobial-resistant *Klebsiella pneumoniae* carriage and infection in specialized geriatric care wards linked to acquisition in the referring hospital.** *Clinical infectious diseases*, 67, n. 2, p. 161-170, 2018.

HENKE W, HERDEL K, JUNG K, SCHNORR D, LOENING SA. **Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences.** *Nucleic Acids Res.* 1997 Oct 1;25(19):3957-8. doi: 10.1093/nar/25.19.3957. PMID: 9380524; PMCID: PMC146979.

HUANG, T. et al. **Structural and functional basis of bacteriophage K64-ORF41 depolymerase.** *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 231, p. 130917, 2024.

HUGOUVIEUX-COTTE-PATTAT N, CONDEMIN G, SHEVCHIK VE (2014). **Bacterial pectate lyases, structural and functional diversity.** *Environ Microbiol Rep* 6:427–440. doi:10.1111/1758-2229.12166.

JARVIS, W. R.; MUNN, V. P.; HIGHSMITH, A. K.; CULVER, D. H. et al. **The epidemiology of nosocomial infections caused by *Klebsiella pneumoniae*.** *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 6, n. 2, p. 68-74, 1985.

JONES, G. W.; ISAACSON, R. E. **Proteinaceous bacterial adhesins and their receptors.** *CRC Critical reviews in microbiology*, 10, n. 3, p. 229-260, 1982.

JONES, R. N. **Microbial etiologies of hospital-acquired bacterial pneumonia and ventilator-associated bacterial pneumonia.** *Clinical infectious diseases*, 51, n. Supplement_1, p. S81-S87, 2010.

KLINE, K. A.; DODSON, K. W.; CAPARON, M. G.; HULTGREN, S. J. **A tale of two pili: assembly and function of pili in bacteria.** Trends in microbiology, 18, n. 5, p. 224-232, 2010.

KIMURA K, ITOH Y (2003). **Characterization of poly-gamma-glutamate hydrolase encoded by a bacteriophage genome: possible role in phage infection of *Bacillus subtilis* encapsulated with poly-gamma-gluta-mate.** Appl Environ Microbiol 69:2491–2497. doi:10.1128/AEM.69.5.2491-2497.2003.

KIM Y, LEE S-M, NONG LK, KIM J, KIM SB and KIM D (2023). **Characterization of *Klebsiella pneumoniae* bacteriophages, KP1 and KP12, with deep learning-based structure prediction.** Front. Microbiol. 13:990910. doi: 10.3389/fmicb.2022.990910.

KORBIE, D., MATTICK, J. **Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification.** *Nat Protoc* 3, 1452–1456 (2008). <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.133>

LANGMEAD B., SALZBERG S. **Fast gapped-read alignment with Bowtie 2.** Nature Methods. 2012, 9:357-359.

LAM, M.; WYRES, K.; DUCHENE, S.; WICK, R. et al. **Population genomics of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* clonal-group 23 reveals early emergence and rapid global dissemination.** Nat Commun 9: 2703. 2018.

LAM, M. M.; WICK, R. R.; WYRES, K. L.; GORRIE, C. L. et al. **Genetic diversity, mobilisation and spread of the yersiniabactin-encoding mobile element ICEKp in *Klebsiella pneumoniae* populations.** Microbial genomics, 4, n. 9, 2018.

LATHAM, KATE. **Gram-Positive vs. Gram-Negative.** Biology Dictionary, 19 jan. 2021. Disponível em: <https://biologydictionary.net/gram-positive-vs-gram-negative/>. Acesso em: 15 jul. 2024.

LATKA A, MACIEJEWSKA B, MAJKOWSKA-SROBEK G, BRIERS Y, DRULIS-KAWA Z. (2017). **Bacteriophage-encoded virion-associated enzymes to overcome the carbohydrate barriers during the infection process.** Appl Microbiol Biotechnol, 101(8): 3103–3119.

LAXMINARAYAN, R.; DUSE, A.; WATTAL, C.; ZAIDI, A. K. et al. **Antibiotic resistance—the need for global solutions.** The Lancet infectious diseases, 13, n. 12, p. 1057-1098, 2013.

LEFKOWITZ EJ, DEMPSEY DM, HENDRICKSON RC, ORTON RJ, SIDDELL SG, SMITH DB. **Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV).** Nucleic acids research 2018; 46:D708–17.

LEVERENTZ, B.; CONWAY, W. S.; CAMP, M. J.; JANISIEWICZ, W. J. et al. **Biocontrol of on fresh-cut produce by treatment with lytic bacteriophages and a bacteriocin.** Applied and Environmental Microbiology, 69, n. 8, p. 4519-4526, Aug 2003.

LI, M.; LI, P.; CHEN, L.; GUO, G. et al. **Identification of a phage-derived depolymerase specific for KL64 capsule of *Klebsiella pneumoniae* and its anti-biofilm effect.** *Virus Genes*, p. 1-9, 2021.

LIVRELLI, V.; DE CHAMPS, C.; DI MARTINO, P.; DARFEUILLE-MICHAUD, A. et al. **Adhesive properties and antibiotic resistance of *Klebsiella*, *Enterobacter*, and *Serratia* clinical isolates involved in nosocomial infections.** *Journal of Clinical Microbiology*, 34, n. 8, p. 1963-1969, 1996.

LORENZ TC. **Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies.** *Journal of Visualized Experiments : Jove*. 2012 May(63):e3998. DOI: 10.3791/3998. PMID: 22664923; PMCID: PMC4846334.

MAGILL, DAMIAN J.; SKVORTSOV, TIMOFEY A. **DePolymerase Predictor (DePP): a machine learning tool for the targeted identification of phage depolymerases.** *BMC bioinformatics*, v. 24, n. 1, p. 208, 2023.

MAJKOWSKA-SKROBEK, G.; LATKA, A.; BERISIO, R.; SQUEGLIA, F.; MACIEJEWSKA, B.; BRIERS, Y.; DRULIS-KAWA, Z. **Phage-Borne Depolymerases Decrease *Klebsiella Pneumoniae* Resistance to Innate Defense Mechanisms.** *Front. Microbiol.* 2018, 9, 2517.

MARÇAL, J. C. DE O., SOUZA, J. C. B. DE O., & CÂNDIDO, W. P. (2023). **Fagoterapia como alternativa no combate às infecções bacterianas multirresistentes: uma revisão integrativa.** *CONTRIBUCIONES A LAS CIENCIAS SOCIALES*, 16(11), 26181–26193. <https://doi.org/10.55905/revconv.16n.11-084>.

MENG, ELAINE C. et al. **UCSF ChimeraX: Tools for structure building and analysis.** *Protein Science*, v. 32, n. 11, p. e4792, 2023.

MIRDITA, MILOT et al. **ColabFold: making protein folding accessible to all.** *Nature methods*, v. 19, n. 6, p. 679-682, 2022.

MICHAUD P, Da Costa A, Courtois B, Courtois J (2003). **Polysaccharide lyases: recent developments as biotechnological tools.** *Crit Ver Biotechnol* 23:233–266. doi:10.1080/07388550390447043.

NAKAMURA-SILVA, R.; CERDEIRA, L.; OLIVEIRA-SILVA, M.; DA COSTA, K. R. C. et al. **Multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*: a retrospective study in Manaus, Brazil.** *Arch Microbiol*, 204, n. 4, p. 202, Mar 4 2022.

OCHOŃSKA, D.; ŚCIBIK, Ł.; BRZYCHCZY-WŁOCH, M. **Biofilm Formation of Clinical *Klebsiella pneumoniae* Strains Isolated from Tracheostomy Tubes and Their Association with Antimicrobial Resistance, Virulence and Genetic Diversity.** *Pathogens*, 10, n. 10, p. 1345, 2021.

OLIVEIRA, H.; COSTA, A. R.; FERREIRA, A.; KONSTANTINIDES, N. et al. **Functional Analysis and Antivirulence Properties of a New Depolymerase from a Myovirus That Infects Capsule K45.** *Journal of Virology*, 93, n. 4, Feb 2019.

ØRSKOV, I.; ØRSKOV, F. **4 serotyping of *Klebsiella***. Methods in microbiology, 14, p. 143-164, 1984.

PALMEIRO, J. K.; DE SOUZA, R. F.; SCHORNER, M. A.; PASSARELLI-ARAUJO, H. et al. **Molecular Epidemiology of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolates in a Brazilian Tertiary Hospital**. Front Microbiol, 10, p. 1669, 2019.

PAN, Y.-J.; LIN, T.-L.; CHEN, Y.-Y.; LAI, P.-H.; TSAI, Y.-T.; HSU, C.-R.; HSIEH, P.-F.; LIN, Y.-T.; WANG, J.-T. **Identification of Three Podoviruses Infecting *Klebsiella* Encoding Capsule Depolymerases That Digest Specific Capsular Types**. Microb. Biotechnol. 2019, 12, 472–486.

PAS, C.; FIESELER, L.; POTHIER, J. F.; BRIERS, Y. **Isolation, characterization, and receptor-binding protein specificity of phages PAS7, PAS59 and PAS61 infecting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O103 and O146**. Scientific Reports, 2024. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-77463-x>.

PEIRANO, G.; SEKI, L. M.; VAL PASSOS, V. L.; PINTO, M. C. F. et al. **Carbapenem-hydrolysing β -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil**. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 63, n. 2, p. 265-268, 2009.

PIPERAKI, E.-T.; SYROGIANNOPOULOS, G. A.; TZOUVELEKIS, L. S.; DAIKOS, G. L. ***Klebsiella pneumoniae*: virulence, biofilm and antimicrobial resistance**. The Pediatric infectious disease journal, 36, n. 10, p. 1002-1005, 2017.

PIRES, D. P.; OLIVEIRA, H.; MELO, L. D.; SILLANKORVA, S. et al. **Bacteriophage-encoded depolymerases: their diversity and biotechnological applications**. Applied microbiology and biotechnology, 100, n. 5, p. 2141-2151, 2016.

PODSCHUN, R.; ULLMANN, U. ***Klebsiella* capsular type K7 in relation to toxicity, susceptibility to phagocytosis and resistance to serum**. Journal of medical microbiology, 36, n. 4, p. 250-254, 1992.

REES, WA et al . (1993). **A betaina can eliminate the dependence of DNA melting on base-pair composition**. Biochemistry 32 , 137–44.

REUTER, M.; KRUGER, D.H. **Approaches to Optimize Therapeutic Bacteriophage and Bacteriophage-Derived Products to Combat Bacterial Infections**. Virus Genes 2020, 56, 136–149.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold spring harbor laboratory press, 1989. v. Ed. 2). 0879693096.

SHADKAM, S.; GOLI, H. R.; MIRZAEI, B.; GHOLAMI, M. et al. **Correlation between antimicrobial resistance and biofilm formation capability among *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from hospitalized patients in Iran**. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, 20, n. 1, p. 1-7, 2021.

SINGH, A.; ARYA, S.K.; GLASS, N.; HANIFI-MOGHADDAM, P.; NAIDOO, R.; SZYMANSKI, C.M.; TANHA, J.; EVOY, S. **Bacteriophage Tailspike Proteins as Molecular Probes for Sensitive and Selective Bacterial Detection**. Biosens. Bioelectron. 2010, 26, 131–138.

SPINELLI, SILVIA et al. **Modular structure of the receptor binding proteins of Lactococcus lactis phages: the RBP structure of the temperate phage TP901-1**. Journal of Biological Chemistry, v. 281, n. 20, p. 14256-14262, 2006.

SQUEGLIA, F. et al. **Structural and functional studies of a Klebsiella phage tailspike protein revealing a parallel β -helix domain**. Structure, v. 28, n. 8, p. 1045-1054.e3, 2020.

SUTHERLAND IW (1995). **Polysaccharide lyases**. FEMS Microbiol Rev 16:323–347.

TOPKA-BIELECKA, G.; DYDECKA, A.; NECEL, A.; BLOCH, S.; NEJMAN-FALEŃCZYK, B.; WŁĘGRZYN, G.; WŁĘGRZYN, A. **Bacteriophage-Derived Depolymerases against Bacterial Biofilm**. Antibiotics 2021, 10, 175. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10020175>.

VAN RAAIJ, MARK J. et al. **Crystal structure of a heat and protease-stable part of the bacteriophage T4 short tail fibre**. Journal of molecular biology, v. 314, n. 5, p. 1137-1146, 2001.

VARADARAJ K, SKINNER DM. **Denaturants or cosolvents improve the specificity of PCR amplification of a G + C-rich DNA using genetically engineered DNA polymerases**. Gene. 1994 Mar 11;140(1):1-5. doi: 10.1016/0378-1119(94)90723-4. PMID: 8125324.

VIEIRA, MARIA et al. **PhageDPO: phage depolymerase finder**. Biorxiv, p. 2023.02.24.529883, 2023.

VUOTTO, C.; LONGO, F.; BALICE, M. P.; DONELLI, G. et al. **Antibiotic resistance related to biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae***. Pathogens, 3, n. 3, p. 743-758, 2014.

WALKER PJ, SIDDELL SG, LEFKOWITZ EJ, MUSHEGIAN AR, ADRIAENSSENS EM, ALFENAS-ZERBINI P, DEMPSEY DM, DUTILH BE, GARCÍA ML, CURTIS HENDRICKSON R, JUNGLEN S, KRUPOVIC M, KUHN JH, LAMBERT AJ, ŁOBOCKA M, OKSANEN HM, ORTON RJ, ROBERTSON DL, RUBINO L, SABANADZOVIC S, SIMMONDS P, SMITH DB, SUZUKI N, VAN DOORSLAER K, VANDAMME AM, VARSANI A, ZERBINI FM. **Recent changes to virus taxonomy ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2022)**. Arch Virol. 2022 Aug 23. doi: 10.1007/s00705-022-05516-5. Epub ahead of print. PMID: 35999326.

WHITTARD E, REDFERN J, XIA G, MILLARD A, RAGUPATHY R, MALIC S and ENRIGHT MC (2021). **Phenotypic and Genotypic Characterization of Novel Polyvalent Bacteriophages With Potent In Vitro Activity Against an**

International Collection of Genetically Diverse *Staphylococcus aureus*. Front. Cell. Infect. Microbiol. 11:698909. doi: 10.3389/fcimb.2021.698909.

WYRES, K. L.; HOLT, K. E. ***Klebsiella pneumoniae* Population Genomics and Antimicrobial-Resistant Clones.** Trends Microbiol, 24, n. 12, p. 944-956, Dec 2016.

YAN, J.; MAO, J.; XIE, J. **Bacteriophage polysaccharide depolymerases and biomedical applications.** BioDrugs, 28, n. 3, p. 265-274, Jun 2014.

ZHENG L, XU Y, LI Q, ZHU B. **Pectinolytic lyases: a comprehensive review of sources, category, property, structure, and catalytic mechanism of pectate lyases and pectin lyases.** Bioresour Bioprocess. 2021 Aug 23;8(1):79. doi: 10.1186/s40643-021-00432-z. PMID: 38650254; PMCID: PMC10992409.