

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

LUCAS ASSONI

**AVALIAÇÃO DE SUBUNIDADES DE FÍMBRIAS TIPO 1 E TIPO
3 COMO CANDIDATOS VACINAIS CONTRA *Klebsiella
pneumoniae***

Bragança Paulista
2024

LUCAS ASSONI – R.A.: 001202015119

**AVALIAÇÃO DE SUBUNIDADES DE FÍMBRIAS TIPO 1 E TIPO
3 COMO CANDIDATOS VACINAIS CONTRA *Klebsiella
pneumoniae***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Ciências da Saúde

Orientador: Prof.^a Dr.^a Michelle Darrieux

Bragança Paulista
2024

QW 138.5.K5
A869a

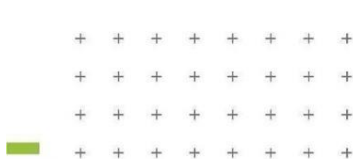
Assoni, Lucas

Avaliação de subunidades de fimbrias tipo 1 e tipo 3
como candidatos vacinais contra *Klebsiella pneumoniae* /
Lucas Assoni. -- Bragança Paulista, 2024.
98 p.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação
Stricto Sensu em Ciências da Saúde da Universidade São
Francisco.

Orientação de: Michelle Darrieux.

1. *Klebsiella pneumoniae*. 2. Vacinas. 3. Fimbrias
bacterianas. 4. Anticorpos. 5. Biofilmes. I. Darrieux,
Michelle. II. Título.



Educando
para a paz

ASSONI, Lucas. “Avaliação de subunidades de fímbrias tipo 1 e tipo 3 como candidatos vacinais contra *Klebsiella pneumoniae*”. Tese defendida e aprovada no programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em 29 de julho de 2024 pela Banca examinadora constituída pelos membros:

Prof(a). Dr(a). Michelle Darrieux Sampaio Bertoncini - Orientador(a) e Presidente
Universidade São Francisco

Prof(a). Dr(a). Aline Sampaio Cremonesi
Universidade São Francisco

Prof(a). Dr(a). Carina Carvalho dos Santos
(por videoconferência)
Universidade Federal da Bahia

Prof(a). Dr(a). Giovana Cappio Barazzone
(por videoconferência)
Instituto Butantan

Prof(a). Dr(a). Juliana Mozer Sciani
Universidade São Francisco

Prof(a). Dr(a). Lucas Miguel de Carvalho
Universidade São Francisco

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento: 88887.601281/2021-00 e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) - projeto 2023/10579-8.

RESUMO

Klebsiella pneumoniae é uma bactéria capaz de colonizar mucosas e causar graves infecções, entretanto, até o momento, não existem vacinas disponíveis contra infecções por *K. pneumoniae*. Vacinas recombinantes baseadas em antígenos bacterianos são uma opção promissora a ser investigada, devido a sua conservação em diferentes sorotipos e acessibilidade ao sistema imune destes antígenos. Fímbrias desempenham papel essencial durante a infecção no hospedeiro, estando relacionadas a adesão, tanto em superfícies bióticas ou abióticas, mas também na formação de biofilme e comunidades intracelulares bacterianas. Neste trabalho, subunidades fimbriais de tipo 1 e tipo 3 foram avaliadas como potenciais candidatos vacinais contra pneumonia e sepse por *K. pneumoniae*. Análises de bioinformática foram utilizadas para o mapeamento de epítomos e predição de imunogenicidade das subunidades fimbriais. Epítomos para linfócitos B e T CD4+ foram mapeados, sendo que estes últimos foram utilizados em predições e modelagens de interação com MHC-II, onde a ligação na fenda de apresentação e apresentação dos peptídeos foi predita. Análises de conservação dentro de proteomas de *K. pneumoniae* também foram realizadas e mostraram a prevalência das subunidades dentro dos proteomas de *K. pneumoniae*. As proteínas FimA e MrkA foram produzidas em *E. coli* e utilizadas na imunização de camundongos por via subcutânea, sendo capazes de induzir a produção de IgG específico no soro, principalmente de subclasse IgG1, os quais foram capazes de reconhecer e se ligar a superfície de um isolado clínico utilizado nos modelos de infecção (BM567). Além de reconhecer a bactéria, estes anticorpos também demonstraram reagir de forma cruzada com a subunidade correspondente do outro tipo fimbrial. Os anticorpos também foram capazes de inibir a formação de biofilmes em superfície abiótica, sendo que o efeito foi mais acentuado na presença de soro dos animais que receberam as duas proteínas. No modelo de colonização pulmonar, a coadministração de rFimA e rMrkA diminuiu significativamente a contagem bacteriana do macerado pulmonar. Logo que cepas hipervirulentas possuem papel de destaque nas infecções na comunidade por *K. pneumoniae*, foi avaliado o potencial protetor de rMrkA contra o desafio intranasal com o isolado K1, porém não houve proteção. Em conjunto, os resultados deste estudo contribuem para o desenvolvimento de estratégias profiláticas contra *K. pneumoniae*, além de elucidar a contribuição das fímbrias para a virulência da bactéria.

Descritores: *Klebsiella pneumoniae*. Vacinas. Fímbrias Bacterianas. Anticorpos. Biofilmes.

ABSTRACT

Klebsiella pneumoniae is a bacterium capable of colonizing mucous membranes and cause serious infections. However, to date, there are no vaccines available against *K. pneumoniae* infections. Recombinant vaccines based on bacterial antigens are a promising option to be investigated, due to their conservation in different serotypes and accessibility to the immune system of these antigens. Fimbriae play an essential role during infection in the host, being related to adhesion, both on biotic and abiotic surfaces, but also in the formation of biofilm and intracellular bacterial communities. In this work, type 1 and type 3 fimbrial subunits were evaluated as potential vaccine candidates against *K. pneumoniae* pneumonia and sepsis. Bioinformatics analyzes were used to map epitopes and predict the immunogenicity of the fimbrial subunits. Epitopes for B and CD4+ T lymphocytes were mapped, and the latter were used in predictions and modeling of interactions with MHC-II, where binding in the presentation cleft and presentation of the peptides were predicted. Conservation analyses within *K. pneumoniae* proteomes were also performed and showed the prevalence of the subunits among the *K. pneumoniae* proteomes. The FimA and MrkA proteins were produced in *E. coli* and used to immunize mice subcutaneously, being capable of inducing the production of specific IgG in the serum, mainly of the IgG1 subclass, which were able to recognize and bind to the surface of a clinical isolate used in infection models (BM567). In addition to recognizing the bacteria, these antibodies have also been shown to cross-react with the corresponding subunit of the other fimbrial type. The antibodies were also capable of inhibiting the formation of biofilms on abiotic surfaces, with the effect being more pronounced in the presence of serum from animals that received the two proteins. In the lung colonization model, coadministration of rFimA and rMrkA significantly reduced the bacterial count of lung macerate. Since hypervirulent strains play a prominent role in *K. pneumoniae* infections in the community, the protective potential of rMrkA against intranasal challenge with a K1 isolate was evaluated, however, there was no protection. Taken together, the results of this study contribute to the development of prophylactic strategies against *K. pneumoniae*, in addition to elucidating the contribution of fimbriae to the virulence of the bacteria.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*. Vaccines. Fimbriae. Antibodies. Biofilms.