

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

Avaliação da atividade de lisozima e despolimerases fágicas expressas heterologicamente no controle de patógenos bacterianos associados à mastite bovina

Carlos Henrique Martins da Silva
Magister Scientiae

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2026**

CARLOS HENRIQUE MARTINS DA SILVA

Avaliação da atividade de lisozima e despolimerases fágicas expressas heterologicamente no controle de patógenos bacterianos associados à mastite bovina

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Sergio Oliveira de Paula

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

S586a
2026
Silva, Carlos Henrique Martins da, 1997-
Avaliação da atividade de lisozima e despolimerases fágicas
expressas heterologicamente no controle de patógenos bacterianos
associados à mastite bovina / Carlos Henrique Martins da Silva.
– Viçosa, MG, 2026.

1 dissertação eletrônica (73 f.): il. (algumas color.).

Inclui apêndices.

Orientador: Sérgio Oliveira de Paula.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Microbiologia, 2026.

Referências bibliográficas: f. 50-65.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2026.475>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Bacteriófagos. 2. Enzimas induzidas por vírus. 3. Mastite
bovina - Controle. 4. Bovinos de leite - Doenças - Controle. 5.
Streptococcus. 6. Biofilmes. I. Paula, Sérgio Oliveira de, 1976-.
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Microbiologia. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola. III. Título.

CDD 22. ed. 579.26

CARLOS HENRIQUE MARTINS DA SILVA

Avaliação da atividade de lisozima e despolimerases fágicas expressas heterologicamente no controle de patógenos bacterianos associados à mastite bovina

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 31 de julho de 2026.

Assentimento:

Carlos Henrique Martins da Silva
Autor

Sergio Oliveira de Paula
Orientador

Essa dissertação foi assinada digitalmente pelo autor em 13/08/2026 às 22:02:20 e pelo orientador em 14/08/2026 às 06:13:31. As assinaturas têm validade legal, conforme o disposto na Medida Provisória 2.200-2/2001 e na Resolução nº 37/2012 do CONARQ. Para conferir a autenticidade, acesse <https://siadoc.ufv.br/validar-documento>. No campo 'Código de registro', informe o código **LTRD.XW38.UFEG** e clique no botão 'Validar documento'.

Sinceros agradecimentos à minha esposa por todo o apoio concedido durante os momentos de alegria, dificuldades e tristezas, e por todas as palavras que me ajudaram a não desistir no decorrer da minha caminhada acadêmica, acreditando em mim em todas as etapas. Meus pais também foram figuras cruciais nessa trajetória, oferecendo apoio e liberdade em minhas escolhas desde o início da graduação até a pós-graduação. Essas pessoas foram fundamentais para que eu chegasse até onde estou.

Sou muito grato aos integrantes do LIVM por todo o auxílio disponibilizado nesses anos em que estive no laboratório. Sempre que necessitei de suporte, houve alguém disposto a me estender a mão. Destaco um agradecimento especial à Dr.^a Adrielle Jéssica do Carmo Santos, por ter me aceitado como estagiário no início da minha jornada e por ter me ensinado grande parte do que sei hoje como pesquisador. Ao Prof. Sérgio Oliveira de Paula, pela oportunidade como estagiário no laboratório que coordena, por ter me aceitado na iniciação científica e, posteriormente, como seu orientado nesta etapa da pós-graduação, além de todas as outras oportunidades e da confiança depositada em mim.

Aos integrantes da banca examinadora, Prof.^a Cynthia, Prof. Leandro, Prof. Felipe e Dr.^a Luciana, o meu muito obrigado por terem aceitado este convite.

Por fim, agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola pela oportunidade de fazer parte de seu quadro de discentes; à Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, por toda a estrutura disponibilizada; e à FAPEMIG, pela concessão da minha bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro prestado.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado com o apoio das seguintes agências de pesquisa brasileiras: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

RESUMO

SILVA, Carlos Henrique Martins da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2026. **Avaliação da atividade de lisozima e despolimerases fágicas expressas heterologamente no controle de patógenos bacterianos associados à mastite bovina.** Orientador: Sergio Oliveira de Paula.

A mastite bovina permanece entre as principais enfermidades que afetam a bovinocultura leiteira, ocasionando prejuízos econômicos significativos e favorecendo o uso intensivo de antimicrobianos, o que contribui para a disseminação da resistência bacteriana. Nesse contexto, proteínas derivadas de bacteriófagos surgem como alternativas promissoras para o controle de patógenos associados à doença. O presente estudo teve como objetivo de realizar a expressão heteróloga e avaliar as atividades antibacteriana e antibiofilme de uma lisozima e duas despolimerases derivadas de bacteriófagos frente a isolados bacterianos associados à mastite bovina. As proteínas foram produzidas em *Escherichia coli* BL21(DE3), purificadas por cromatografia de afinidade e caracterizadas por análises in silico, SDS-PAGE e *Western blot*. A atividade biológica foi avaliada por ensaios de crescimento bacteriano, formação de biofilme e teste de gotejamento. As análises estruturais identificaram um domínio conservado de lisozima do tipo T4 na proteína do bacteriófago BigMira, enquanto a endossialidase ShigP1 apresentou um domínio de chaperona autocatalítica e a despolimerase BigMira não apresentou domínios conservados identificáveis. Entre as proteínas avaliadas, apenas a lisozima do bacteriófago BigMira teve sua expressão recombinante confirmada. Essa enzima promoveu redução significativa do crescimento de sete isolados de *Streptococcus uberis*, com reduções entre 13% a 31%. Em *Streptococcus agalactiae* inibiu significativamente a formação de biofilme em oito isolados, apresentando reduções entre 54% a 79% na concentração de 10 µg/mL, porém não houve redução significativa no crescimento em nenhum dos isolados testados. Já em *Staphylococcus aureus* não foi possível distinguir os efeitos da lisozima recombinante em relação ao tampão sobre a redução de crescimento dos isolados, enquanto que sobre o biofilme quatro isolados demonstraram redução significativa variando entre 20 % a 50 % de redução. Não foi observada atividade nos ensaios de gotejamento em nenhuma das espécies testadas. Os resultados demonstram que a lisozima recombinante derivada do bacteriófago BigMira apresenta potencial como agente antibacteriano e antibiofilme contra importantes patógenos da mastite bovina, constituindo uma estratégia promissora para o desenvolvimento de alternativas aos antimicrobianos convencionais.

Palavras-chave: *S. aureus*; *S. uberis*; *S. agalactiae*; PROTEÍNAS
RECOMBINANTES; ANTIBIOFILME; BACTERIÓFAGOS

ABSTRACT

SILVA, Carlos Henrique Martins da, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2026. **Evaluation of heterologously expressed lysozyme and phage depolymerases in the control of bacterial pathogens associated with bovine mastitis.** Adviser: Sergio Oliveira de Paula.

Bovine mastitis remains among the main diseases affecting dairy cattle production, causing significant economic losses and encouraging the intensive use of antimicrobials, which contributes to the dissemination of bacterial resistance. In this context, bacteriophage-derived proteins emerge as promising alternatives for controlling pathogens associated with the disease. This study aimed to heterologously express and evaluate the antibacterial and antibiofilm activity of a lysozyme and two depolymerases derived from bacteriophages against bacterial isolates associated with bovine mastitis. The proteins were produced in *Escherichia coli* BL21(DE3), purified by affinity chromatography, and characterized by in silico analyses, SDS-PAGE, and Western blot. Biological activity was evaluated by bacterial growth assays, biofilm formation, and spot tests. Structural analyses identified a T4-like lysozyme conserved domain in the BigMira bacteriophage protein, whereas the ShigP1 endosialidase presented an autocatalytic chaperone domain, and the BigMira depolymerase showed no identifiable conserved domains. Among the evaluated proteins, only the recombinant lysozyme from bacteriophage BigMira had its expression confirmed. This enzyme significantly reduced the growth of seven *Streptococcus uberis* isolates, with reductions ranging from 13% to 31%. In *Streptococcus agalactiae*, it significantly inhibited biofilm formation in eight isolates, reducing biofilm biomass by 54% to 79% at a concentration of 10 µg/mL, however, no significant reduction in bacterial growth was observed in any of the isolates tested. In *Staphylococcus aureus*, it was not possible to distinguish the effects of the recombinant lysozyme from those of the buffer on bacterial growth reduction. However, in biofilm assays, four isolates showed significant reductions ranging from 20% to 50%. No activity was observed in the spot tests for any of the tested species. These results demonstrate that the recombinant lysozyme derived from bacteriophage BigMira has potential as an antibacterial and antibiofilm agent against important bovine mastitis pathogens, constituting a promising strategy for developing alternatives to conventional antimicrobials.

Keywords: *S. aureus*; *S. uberis*; *S. agalactiae*; RECOMBINANT PROTEIN; BIOFILM PREVENT; BACTERIOPHAGE

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Esquema dos vetores	25
Figura 2	Análises <i>in silico</i> da endosialidase ShigP1	34
Figura 3	Caracterização estrutural da lisozima do fago BigMira.	35
Figura 4	Análise da expressão e purificação das proteínas recombinantes por SDS-PAGE e <i>Western blot</i>	36
Figura 5	Ensaio de gotejamento da lisozima do bacteriófago BigMira sobre isolados representativos.....	37
Figura 6	Curvas de crescimento de isolados de <i>S. aureus</i> tratados com lisozima de BigMira	38
Figura 7	Efeito da lisozima BigMira nos 7 isolados de <i>S. uberis</i> responsivos à enzima recombinante	39
Figura 8	Efeito da lisozima de BigMira (10 µg/mL) sobre a formação de biofilme dos isolados de <i>S. aureus</i> que apresentaram redução significativa em relação ao controle.....	41
Figura 9	Representação gráfica dos 8 isolados de <i>S. agalactiae</i> que apresentaram redução significativa na formação de biofilme após tratamento com a lisozima do BigMira (10 µg/mL)	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Despolimerases e lisozima com seus respectivos plasmídeos que foram utilizados nos experimentos.....	24
Tabela 2	Isolados bacterianos utilizados nos testes com a enzima.....	30
Tabela 3	Classificação do perfil de produção de biofilme dos isolados de <i>S. aureus</i>	42
Tabela 4	Classificação da capacidade de formação de biofilme dos isolados de <i>S. agalactiae</i> testados.	44

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1. Impactos da mastite bovina no Brasil.....	13
2.2. Principais patógenos relacionados à mastite bovina	13
2.3. Impactos da formação de biofilme no controle da mastite bovina.....	19
2.4. Proteínas fágicas aplicadas a patógenos da mastite bovina.....	20
3. OBJETIVOS	23
3.1. Objetivo geral.....	23
3.2. Objetivos específicos.....	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1. Construções dos vetores de expressão.....	24
4.2. Análise dos domínios conservados e predição estrutural das proteínas	25
4.3. Transformação em células <i>E. coli</i> TOP10.....	26
4.3.1. Processo de extração dos plasmídeos	26
4.4. Transformação da <i>E. coli</i> BL21(DE3) por eletroporação	27
4.5. Expressão das proteínas recombinantes	28
4.6. Purificação e análise das proteínas recombinantes	29
4.7. Ensaios de atividade antibacteriana e antibiofilme	30
5. RESULTADOS	33
5.1. Predição estrutural e dos resíduos catalíticos das proteínas recombinantes	33
5.2. Expressão e análise das proteínas recombinantes	35
5.3. Impacto da lisozima do BigMira na dinâmica de crescimento bacteriano	36
5.4. Influência da lisozima do BigMira na formação de biofilme	40
6. DISCUSSÃO	45
7. CONCLUSÃO.....	49
REFERÊNCIAS	50
APÊNDICES	66

1. INTRODUÇÃO

O setor leiteiro enfrenta diversos desafios nas suas atividades rotineiras, podendo a mastite bovina ser citada como um dos principais desafios sanitários. A doença consiste em um processo inflamatório nas glândulas mamárias ocasionado por danos físicos, químicos ou infecção (Ashraf; Imran, 2020). O processo inflamatório pode ser classificado considerando suas manifestações clínicas que são elas a mastite clínica, subclínica e crônica (Cheng; Han; 2020).

A mastite clínica pode se apresentar com início súbito e curso clínico agudo de sinais inflamatórios locais e sistêmicos (febre, edema, perda de mobilidade, rubor e dor a palpação), além disso, é possível observar flocos ou coágulos no leite e uma letargia maior no animal. Contudo, os mesmos sinais e sintomas não são evidentes na mastite subclínica, sendo reconhecidos apenas com contagem de células somática no leite ou redução na produção de leite dos animais afetados (Cobirka; Tancin; Slama, 2020). Já a mastite crônica caracteriza-se por um processo inflamatório persistente, onde em intervalos irregulares ocorrem remissões e manifestações clínicas da doença (Cheng; Han; 2020).

Utilizar as manifestações clínicas como parâmetro é apenas uma das maneiras de classificação da enfermidade. A mastite contagiosa e ambiental são duas formas de agrupamento do processo inflamatório baseados em sua origem, visto que na contagiosa a contaminação ocorre através do contato dos animais saudáveis com úberes infectados previamente e a ambiental refere-se a invasão de microrganismos que se originaram do ambiente. Dentre os exemplos de microrganismos causadores da mastite contagiosa encontram-se *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus uberis*, por sua vez *Escherichia coli* e *Streptococcus agalactiae* são frequentemente associadas a mastite ambiental (Cobirka; Tancin; Slama, 2020).

Atualmente, os antimicrobianos constituem o tratamento padrão-ouro no controle da mastite bovina bacteriana, sendo amplamente utilizados, especialmente durante o período entre lactações, como medida profilática (Sharun et al., 2021). Entretanto, o uso desses medicamentos pode resultar na presença de resíduos no leite produzido pelos ruminantes e contribuir para a disseminação de genes de resistência aos antimicrobianos entre os patógenos associados à doença (Gomes; Henriques, 2015).

Outro importante fator que contribui para a resistência antimicrobiana das bactérias associadas ao processo inflamatório é a sua capacidade de formação de biofilme (Gomes; Saavedra; Henriques, 2016). Essas estruturas são formadas quando células planctônicas se aderem a uma superfície e iniciam a biossíntese de Substâncias Poliméricas Extracelulares (EPS). Nesse contexto, as comunidades microbianas permanecem protegidas da ação desses compostos devido à presença de uma barreira física constituída por lipídeos, carboidratos e

proteínas, além de enzimas, a qual dificulta o contato dessas moléculas com seus alvos celulares, tornando a infecção mais difícil de tratar e frequentemente crônica (Melchior; Vaarkamp; Gremmels, 2006).

Nesse contexto, o processo infeccioso não se limita apenas a uma preocupação sanitária para a indústria leiteira, mas também representa um importante problema econômico, refletido nos gastos com o tratamento dos animais, no descarte de leite e na redução da produção leiteira (Gonçalves et al., 2018). No cenário brasileiro, os custos com assistência veterinária, o sacrifício de animais cronicamente infectados e a diminuição da produção de leite estão entre as principais perdas financeiras ocasionadas pela mastite (Corrêa et al., 2024).

Diante disso, estratégias inovadoras estão sendo desenvolvidas para resolver os problemas decorrentes do avançar da resistência aos antimicrobianos. Nas últimas décadas, houve uma retomada no isolamento de novos bacteriófagos com potencial para controlar os casos de mastite bacteriana (Li; Zhang, 2014). Entretanto, sua aplicação em casos de mastite bovina encontra limitações como interação com proteínas do leite, mecanismos de defesa dos patógenos contra os vírus e resposta imune do animal à presença dos fagos (Nale; McEwan, 2023).

Diferentemente dos bacteriófagos, as proteínas fágicas possuem excelente potencial terapêutico nos casos de inflamação das glândulas mamárias bovinas, uma vez que, até o momento, não há relatos de desenvolvimento de resistência e possuem bom espectro de ação *in vitro* e em modelos *in vivo* (Gutiérrez et al., 2020).

O cenário preocupante associado ao surgimento de linhagens bacterianas resistentes aos medicamentos atualmente utilizados no tratamento, aliado aos impactos econômicos para os produtores e às preocupações sanitárias, evidencia a necessidade de investigar novas alternativas para o controle da mastite bovina. Assim, os resultados descritos na literatura sobre o uso de proteínas fágicas fundamentam a proposta desta dissertação, que aborda a expressão heteróloga de lisozimas e despolimerases de fagos, visando sua aplicação no controle da formação de biofilmes e do crescimento dos principais patógenos causadores de mastite bovina.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Impactos da mastite bovina no Brasil

No ano de 2024, o Brasil produziu pouco mais de 35 bilhões de litros de leite, desse total o estado de Minas Gerais contribuiu com uma produção de quase 10 bilhões de litros produzidos, se consolidando como o maior produtor estadual e representando 27 % da produção total brasileira (CILEite, 2024).

No entanto, animais com mastite bovina possuem um impacto econômico sobre essa produção leiteira que pode alcançar mais de 90 mil dólares anualmente (Guimarães et al., 2017). Esses prejuízos sobre a indústria leiteira podem ser classificados como perdas diretas, tais como gastos veterinários, descarte de leite e do animal, e indiretas, relacionadas principalmente à redução na produção. Estima-se que as perdas diretas equivalem a 37 % dos custos totais com os animais infectados, enquanto as perdas indiretas podem ultrapassar os 60 % (Corrêa et al., 2024).

De igual modo, o uso de antimicrobianos para tratar os casos infecciosos deixam resíduos no leite, causando preocupações relacionados à saúde pública (Gomes; Henriques, 2015). Adicionalmente, o leite produzido pelas glândulas mamárias acometidas com mastite pode se apresentar com baixa qualidade, em decorrência da presença de níveis elevados de enzimas proteolíticas, sobretudo plasminas, responsáveis pela degradação da caseína, além de altos níveis de sódio e cloro (resultando na formação de cloreto de sódio), redução dos níveis de lactose e maiores concentrações de ácidos graxos livres, causando acidificação do leite (Gonçalves et al., 2018).

Nesse contexto, destaca-se que diferentes patógenos podem causar impactos e preocupações distintas em relação a doença. Essas diferenças incluem desde a capacidade para a formação de biofilme até o potencial na disseminação de genes de resistência e níveis de virulência.

2.2. Principais patógenos relacionados à mastite bovina

Uma das principais causas da resposta inflamatória da glândula mamária pode estar associada a invasão de microrganismos bacterianos nesses sítios, que podem ser classificados como sendo de origem ambiental ou provenientes de outro animal previamente infectado (Thompson-Crispi et al., 2014).

Nesse sentido, a contagem de células somáticas no leite (CCS) destaca-se como o principal método indireto para a detecção de processos inflamatórios nesse tecido. Em fêmeas bovinas saudáveis, os valores de CCS geralmente não ultrapassam 200.000 células/mL, enquanto contagens superiores a esse limite indicam a ocorrência de inflamação, e valores acima de 400.000 células/mL são frequentemente associados à infecção intramamária (Cobirka; Tancin;

Slama, 2020). A elevação da CCS está relacionada ao reconhecimento de estruturas dos agentes etiológicos bacterianos pelas células do sistema imune inato, que migram para a glândula mamária na tentativa de conter a colonização microbiana (Thompson-Crispi et al., 2014).

O comprometimento do tecido mamário, decorrente da ação de microrganismos no local, está relacionado à capacidade de produção de fatores de virulência, dentre os quais destacam-se a liberação de exotoxinas, a produção de enzimas extracelulares envolvidas na degradação tecidual, a capacidade de evasão da resposta imune e a formação de biofilme (Pérez et al., 2020a, 2020b).

A mastite bovina pode ser causada por uma ampla variedade de microrganismos, porém neste trabalho serão abordadas apenas algumas espécies bacterianas de maior relevância.

Escherichia coli: bactéria Gram-negativa frequentemente associada a casos de infecção intramamária em rebanhos leiteiros (Cheng; Han, 2020). A espécie está relacionada a quadros de mastite clínica, que podem variar de sinais moderados a fatais, dependendo das características da linhagem infecciosa, além de ser classificada como um patógeno oportunista de origem ambiental (Zadoks et al., 2011).

Nesse contexto, observa-se que a maioria dos isolados obtidos de animais afetados pertence a grupos filogenéticos comensais, o que reforça a hipótese de que esses casos estejam associados à higienização inadequada do ambiente ou a falhas nos procedimentos de assepsia durante a ordenha (Fernandes et al., 2011).

Linhagens de *E. coli* patogênica extraintestinal (ExPEC), incluindo aquelas associadas à mastite, frequentemente referidas como *E. coli* patogênica mamária (MPEC), estão associadas a alterações na CCS e à redução da produção de leite, as quais podem persistir por meses após o desaparecimento dos sinais clínicos. Esses efeitos são atribuídos à intensa infiltração de células do sistema imune inato no tecido mamário, o que compromete, a longo prazo, o valor agregado do leite produzido. Além disso, a composição do leite também é afetada, com alterações nas concentrações de gordura, lactose e proteínas. Sob a perspectiva da produção de derivados lácteos, infecções causadas por *E. coli* impactam negativamente a produção de queijos, uma vez que promovem aumento no tempo de coagulação, bem como alterações na estrutura da coalhada (Blum; Heller; Leitner, 2014).

Dentre os fatores de virulência relacionados ao curso da infecção, destacam-se aqueles envolvidos na sobrevivência do patógeno, como a produção de sideróforos, responsáveis pela captação de íons de ferro, e a capacidade de migração do leite para o epitélio mamário, com adesão às células epiteliais mediada por fimbrias. Em contrapartida, a lise celular e a consequente liberação de lipopolissacarídeos (LPS) estão associadas ao desenvolvimento de

choque séptico, em decorrência da intensa resposta imune do hospedeiro (Goulart; Mellata, 2022). Somado a isso, sua capacidade de invadir e se manter em células epiteliais mamárias contribuem para a persistência dos casos (Dogan et al., 2006).

Por sua vez, a resistência aos antimicrobianos contribuem significativamente para as frequentes falhas no sucesso dos tratamentos realizados. No Brasil, têm sido descritos perfis de resistências aos principais antimicrobianos utilizados contra Gram-negativas, incluindo beta-lactâmicos, aminoglicosídeos, tetraciclinas e macrolídeos (Alves et al., 2023).

Outro fator importante associado aos casos crônicos é a capacidade de formação de biofilme por essa espécie bacteriana. Entretanto, apesar dessa associação, ainda é possível encontrar isolados que são fracos produtores ou não produtores, levantando a hipótese de que a cronicidade possa estar relacionada à presença do microrganismo em biofilmes multiespécies (Orsi et al., 2023).

Staphylococcus aureus: bactéria Gram-positiva e um patógeno comumente associado a casos clínicos e subclínicos de mastite bovina. Destaca-se ainda sua capacidade de estabelecer infecções crônicas (Cheng; Han, 2020). A manifestação clínica da doença (leve, moderada ou grave) varia conforme o estado imunológico do hospedeiro e a virulência do patógeno (Rainard et al., 2017).

As linhagens de *S. aureus* são classificadas como de origem infecciosa, uma vez que a transmissão ocorre principalmente durante a lactação, com reservatórios presentes no próprio rebanho, favorecendo a disseminação da infecção e o aumento da incidência de casos (Côté-Grave; Malouin, 2019).

O patógeno acessa o tecido mamário por meio do canal do teto, especialmente em regiões que sofreram danos mecânicos ou pela ação de enzimas capazes de degradar a queratina que recobre essa estrutura. Após o acesso, a adesão às células epiteliais mamárias é mediada por adesinas de superfície que reconhecem componentes da matriz extracelular. Para evadir a resposta imune do hospedeiro, o microrganismo pode invadir células epiteliais ou sobreviver no interior de células fagocíticas, além de modular a disponibilidade de receptores envolvidos na sinalização inflamatória (Touaitia et al., 2025).

A virulência de *S. aureus* está associada à expressão de diferentes genes relacionados a fatores de virulência, incluindo aqueles que codificam hemolisinas, serino-proteases e proteínas envolvidas na adesão. Ressalta-se ainda a produção de enterotoxinas, as quais representam riscos à saúde humana por estarem associadas a casos de intoxicação alimentar (Li et al., 2017).

Somado a esses fatores, a espécie apresenta capacidade de se organizar em biofilmes, o que contribui para a persistência das infecções, devido à evasão do sistema imune do hospedeiro e

à maior resistência aos antimicrobianos (Barkema; Schukken; Zadoks, 2006; Cucarella et al., 2004). Adicionalmente, algumas linhagens bacterianas estão relacionadas com uma baixa CCS, por vezes inferiores a 200.000 células/mL, o que dificulta a detecção dos casos e o tratamento, resultando em perdas produtivas prolongadas sem diagnóstico claro (Taponen; Pyörälä, 2009).

Diante disso, à expressão de fatores de virulência, a presença de genes relacionados à resistência aos antimicrobianos do tipo beta-lactâmicos foi observada em mais de 70% dos isolados na região Nordeste do Brasil, valor superior ao descrito em estudos anteriores, indicando um aumento na disseminação desses genes, possivelmente associado à pressão seletiva exercida pelo uso de antimicrobianos (Silva et al., 2020).

Outro determinante relevante é a ocorrência de linhagens resistentes a múltiplos antimicrobianos, cuja frequência, em alguns casos, se aproxima de 70% dos isolados. Dentre os fatores que contribuem para esse cenário, destacam-se a presença de genes que codificam beta-lactamases, a atividade de bombas de efluxo e, principalmente, a formação de biofilme, observada em mais de 90% dos isolados (Krewer et al., 2014).

A relevância desse patógeno extrapola a mastite bovina, visto que há potencial de transmissão zoonótica. Adicionalmente, a capacidade de transferência horizontal de genes, aliada à presença de múltiplos fatores de virulência e determinantes de resistência, configura um cenário preocupante para a disseminação desses elementos em patógenos humanos (Rodrigues et al., 2022).

Nesse sentido, a ocorrência de fenótipos de resistência mais complexos torna-se particularmente preocupante. Cepas de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), caracterizadas principalmente pela presença do gene *mecA*, têm sido identificadas em diversos alimentos de origem animal, especialmente leite e seus derivados no Brasil, o que levanta preocupações quanto ao uso indiscriminado de antimicrobianos na medicina veterinária e seus impactos na saúde pública (Da Silva; Rodrigues; Silva, 2020).

Assim, a combinação de fatores de virulência, aliada à diversidade de genes de resistência, intensifica a preocupação com esse agente etiológico na disseminação de doenças associadas aos alimentos. Contudo, outras duas espécies bacterianas também se destacam como importantes causadoras da mastite bovina.

Streptococcus agalactiae: bactéria Gram-positiva, de morfologia cocoide, frequentemente isolada em casos de mastite subclínica contagiosa. O microrganismo é classificado como beta-hemolítico quando cultivado em ágar-sangue. Ademais, a espécie possui a capacidade de colonizar o trato gastrointestinal de bovinos, sendo esse sítio considerado um importante reservatório em determinados casos (Kabelitz et al., 2021).

Diferentemente de outras espécies, *S. agalactiae* apresenta crescimento predominantemente restrito ao úbere, embora possa sobreviver por curtos períodos em mãos, equipamentos de ordenha e na pele, o que favorece sua transmissão e está associado a falhas nas práticas assépticas durante o manejo e a manipulação dos animais (Lakew; Fayera; Ali, 2019).

A patogênese da mastite associada *S. agalactiae* envolve processos de adesão, colonização e multiplicação no tecido mamário, mediados por alguns fatores de virulência. O primeiro deles, são proteínas de adesão que favorecem a fixação ao epitélio mamário, impedindo remoção das células patogênicas pelo fluxo de leite. Adicionalmente, a produção do fator CAMP promove a formação de poros na membrana celular, favorecendo danos às células do hospedeiro. Mesmo causando principalmente mastite subclínica, a CCS alta no leite permanece como sendo o principal indicativo do processo inflamatório (Wataradee et al., 2024).

No âmbito dos fatores de virulência encontrados em linhagens no Brasil podem ser citados a presença de pilus, produção de enzimas extracelulares que degradam componentes da matriz extracelular, capacidade de formação de biofilme, produção do fator CAMP, presença de cápsulas bacterianas e adesinas (Carvalho-Castro et al., 2017). De forma complementar, muitos isolados produzem estreptolisina, um mecanismo de virulência que permite a entrada do patógeno em células endoteliais e epiteliais e está associado ao padrão beta-hemolítico, caracterizado pela hemólise completa em ágar-sangue (Zastempowska et al., 2022).

Para além dos fatores de virulência encontrados, a resistência aos antimicrobianos apresenta um desafio adicional no controle das infecções causadas pela bactéria. Em algumas regiões do Brasil, o fenótipo de resistência à tetraciclina ultrapassa 70% dos isolados, seguido por ampicilina e penicilina (Oliveira et al., 2022). Contudo, observa-se heterogeneidade no padrão de resistência a esses fármacos, uma vez que, em outras regiões, os isolados permanecem sensíveis à ampicilina e à penicilina (Tomazi et al., 2018). Esses dados sugerem que a variabilidade observada pode estar relacionada, entre outros fatores, à frequência de uso de antimicrobianos em diferentes regiões.

Tais fenótipos estão associados a uma variedade de mecanismos, incluindo bombas de efluxo, metilação ribossomal e presença de beta-lactamases (Hernandez et al., 2021).

Além disso, a capacidade de formação de biofilme contribui significativamente para a persistência da infecção. Essa estrutura atua como uma barreira protetora, dificultando a ação de antimicrobianos, a resposta imune do hospedeiro e a remoção mecânica pelo fluxo de leite, favorecendo a ocorrência de casos subclínicos e crônicos (Pang et al., 2017).

Em conjunto, esses fatores evidenciam a relevância de *S. agalactiae* na epidemiologia da mastite bovina, particularmente em infecções subclínicas e persistentes.

Streptococcus uberis: Bactéria Gram-positiva que pode atuar como comensal ou patógeno, a depender do sítio de colonização. É frequentemente encontrada na pele, tonsilas e trato genital de bovinos assintomáticos. Destaca-se ainda a produção de uberolisina, uma bacteriocina capaz de induzir a lise de outras bactérias sensíveis (Ward et al., 2009).

S. uberis é um patógeno ambiental e oportunista associado, muitas das vezes, em casos de mastite subclínica e clínica, podendo evoluir para casos crônicos. Contudo, a patogênese da doença associada a essa espécie é pouco compreendida (Fessia; Odierno, 2021).

Assim como ocorre em casos da doença causados por outros agentes patogênicos, a CCS nesses casos também continua acima de 200.000 célula/mL, sendo esse parâmetro um dos principais indicadores para a detecção da doença (Almeida et al., 2015).

Embora os mecanismos patogênicos não estejam totalmente elucidados, um estudo realizado na Austrália demonstrou que todos os isolados provenientes de bovinos acometidos por mastite apresentavam fatores de virulência relacionados à invasão tecidual, sobrevivência no hospedeiro, evasão da resposta imune e internalização em células do tecido mamário. Entretanto, as observações também indicaram que o risco e o desenvolvimento da doença dependem de fatores associados às linhagens circulantes no ambiente (Vezina et al., 2021).

Em um estudo realizado no estado de São Paulo, foi observada alta incidência de resistência aos antimicrobianos eritromicina (80%), tetraciclina (59%) e penicilina G (57%) em isolado de *S. uberis*. Esses resultados podem estar relacionados à elevada frequência de uso dessas classes no tratamento. Além disso, mais de 90% dos isolados apresentaram resistência a mais de três antimicrobianos distintos (Martins et al., 2021).

Outro estudo com o mesmo microrganismo infeccioso demonstrou a presença de genes de resistência à tobramicina, um antimicrobiano com características farmacocinéticas semelhantes às da gentamicina, o que aumenta a preocupação com a disseminação desses determinantes de resistência e suas possíveis implicações para a saúde humana. Cabe destacar que, o uso de antimicrobianos na produção animal pode resultar na presença de resíduos em produtos destinados ao consumo (Silva et al., 2021).

Por último, a capacidade de formação de biofilme por *S. uberis* está associada a diferenças entre linhagens e à disponibilidade de nutrientes em ensaios *in vitro*, contudo não está claro se essas condições refletem o comportamento desse microrganismo no ambiente do hospedeiro (Tassi et al., 2015).

Diante desse cenário, a capacidade de formação de biofilme pelos agentes etiológicos da mastite bovina destaca-se como um fator potencialmente relevante para a persistência da infecção e resistência a tratamentos. Assim, compreender os mecanismos envolvidos na formação de biofilme torna-se fundamental, sendo esse aspecto abordado de forma mais detalhada no tópico a seguir.

2.3. Impactos da formação de biofilme no controle da mastite bovina

Biofilmes são comunidades microbianas, mono ou multiespécie, nas quais células bacterianas aderem a superfícies e produzem uma matriz polimérica extracelular (EPS), composta por exopolissacarídeos, lipídeos, DNA, água e enzimas extracelulares (Zao; Sun; Liu, 2023).

A formação de biofilmes é um processo complexo e altamente regulado, que se inicia com a adesão bacteriana a uma superfície. Após essa etapa, as células microbianas liberam moléculas sinalizadoras que promovem o recrutamento de outras células e a comunicação intercelular. A partir disso, inicia-se a biossíntese do EPS e o estabelecimento de interações celulares, culminando na formação de um biofilme maduro. Todavia, essa comunidade microbiana é dinâmica, podendo ocorrer transferência horizontal de genes e dispersão celular, processo que favorece a colonização de novos sítios e, em alguns casos, a produção de toxinas (Gomes; Saavedra; Henriques, 2016).

No contexto da mastite, por consequência da presença da matriz e de seus componentes, os casos ocasionados por bactérias formadoras de biofilme podem se tornar crônicos e de difícil tratamento (Melchior; Vaarkamp; Fink-Gremmels, 2005).

A presença de alguns genes relacionados à capacidade de formação de biofilme pode servir de rastreio para a busca de espécies com essa capacidade. Contudo, a presença de um gene isolado não garante que essas células formem biofilme, além disso, as condições dos ensaios *in vitro* também podem impactar nessa capacidade (Pedersen et al., 2021)

Alguns estudos no Brasil demonstraram que isolados clínicos de *S. aureus* são portadores de genes relacionados à formação de biofilme e à resistência a alguns antimicrobianos, especialmente os amplamente utilizados beta lactâmicos (Aslantaş; Demir, 2016). Ainda assim, outros estudos encontraram linhagens resistentes às tetraciclinas e aos beta-lactâmicos, porém apesar de serem formadoras de biofilmes, não foi possível associar esse fenótipo com a resistência aos antimicrobianos (Fidelis et al., 2024).

Contudo, a ausência de associação direta entre capacidade de formação de biofilme e resistência a antimicrobianos não ameniza a relevância desse fenótipo na prática, considerando que o ambiente dentro do biofilme é altamente propício à transferência horizontal de genes,

tornando a disseminação de determinantes de resistência a antimicrobianos e de outros fatores de virulência uma preocupação (Pérez et al., 2020).

Não obstante aos mecanismos de resistência relacionados a genes de resistência, a própria matriz da estrutura confere proteção aos antimicrobianos ao interagir com essas moléculas e impedir o contato com as células, além do mais, a presença de enzimas nessa matriz pode inativar esses fármacos. Outro mecanismo importante dessa estrutura é a densidade celular dos biofilmes, que interfere na concentração necessária para que compostos antimicrobianos tenham efeito. Por fim, algumas células presentes no biofilme possuem um metabolismo mais lento, como resultado, tornam-se mais tolerantes ao estresse causado pelos antimicrobianos (Liu; Prentice; Webber, 2024).

Tendo isso em vista, torna-se necessário o desenvolvimento de abordagens voltadas à redução ou prevenção dessas comunidades microbianas, uma vez que tais estruturas estão associadas a quadros mais persistentes da doença e à diminuição da eficácia de alguns antimicrobianos. Sob essa perspectiva, enzimas fágicas vêm sendo investigadas, isoladamente ou em associação, como estratégia para o controle da mastite bovina causada por patógenos bacterianos formadores ou não de biofilme, tema que será abordado na próxima seção.

2.4. Proteínas fágicas aplicadas a patógenos da mastite bovina

Com o aumento da ocorrência de bactérias multirresistentes aos antimicrobianos, observa-se uma retomada do interesse no uso de bacteriófagos como alternativa para o controle desses patógenos. No entanto, a aplicação de fagos apresenta limitações, especialmente no contexto da mastite bovina, incluindo a interação com componentes do leite, o espectro restrito de hospedeiros, o que demanda o isolamento de diferentes fagos para a formulação de coquetéis, o desenvolvimento de resistência bacteriana à infecção e, em alguns casos, o aumento da contagem de células somáticas em comparação a grupos não tratados (Laponte et al., 2021).

Nesse cenário, o uso de proteínas fágicas surge como uma estratégia promissora para contornar parte dessas limitações, sobretudo por apresentarem menor interferência de componentes do leite em sua atividade (Angelopoulou et al., 2019).

Dentre as enzimas com potencial biotecnológico estão as despolimerases. Essas enzimas foram identificadas em bacteriófagos de duas formas, como componentes estruturais desses vírus (proteínas das fibras da cauda, placa basal ou pescoço) ou proteínas solúveis sintetizadas e liberadas no meio. Igualmente, esses peptídeos podem ser classificados de acordo com a especificidade do substrato, entre elas destacam-se as sialidases, que clivam ligações do tipo alfa de resíduos de ácido siálico (Pires et al., 2016).

Proteínas fágicas, incluindo despolimerases, podem ser expressas de forma heteróloga em *Escherichia coli* BL21(DE3), mantendo sua atividade biológica. Além disso, sua ação antibiofilme pode ser observada contra diferentes espécies bacterianas, além de seus hospedeiros originais, em ensaios *in vitro* (Gutiérrez et al., 2015).

Similarmente, uma despolimerase foi expressa com sucesso e demonstrou eficácia na redução de biofilmes formados por patógenos da mastite bovina resistentes a antimicrobianos, com resultados positivos tanto em modelos *in vitro* quanto *in vivo* (Li et al., 2022). Ainda, estudos utilizando peptídeos recombinantes têm apresentado resultados promissores, indicando vantagens em relação aos fagos completos, uma vez que não foi observada indução de resistência bacteriana em modelos animais desafiados com *Klebsiella pneumoniae* isolada de mastite (Li et al., 2024).

Nesse contexto, as despolimerases não devem ser consideradas apenas como alternativas aos antimicrobianos tradicionais, mas também como agentes complementares, capazes de atuar de forma sinérgica e restaurar a eficácia de antimicrobianos frente a bactérias resistentes (Topka-Bielecka et al., 2021). Além disso, é possível observar um efeito sinérgico no uso combinado de bacteriófagos e enzimas com ação de despolimerases frente à linhagens de *S. aureus* formadoras de biofilme (Duarte et al., 2024).

Diferentemente das despolimerases fágicas, as lisozimas de origem fágica atuam diretamente sobre a parede celular bacteriana. Seu mecanismo de ação baseia-se na clivagem das ligações β -1,4 glicosídicas entre os resíduos de ácido N-acetilmurâmico (NAM) e N-acetilglicosamina (NAG). Essas enzimas apresentam maior eficácia contra bactérias Gram-positivas, enquanto sua atividade é reduzida em Gram-negativas devido à presença de lipopolissacarídeos (LPS) na membrana externa. No entanto, esse efeito pode ser potencializado por meio da utilização de agentes quelantes, como o EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) (Ferraboschi; Ciceri; Grisenti, 2021).

Essas enzimas podem ser expressas com sucesso em hospedeiros bacterianos, e as proteínas recombinantes obtidas apresentam atividade antimicrobiana. Em bactérias Gram-negativas, sua eficácia é significativamente aumentada quando utilizadas em combinação com EDTA, em concentrações de até 2 mM. Em contrapartida, quando empregadas isoladamente, apresentam efeito limitado nesse grupo, não sendo observada redução do crescimento em *Pseudomonas aeruginosa* (Yin et al., 2022).

Além das lisozimas anteriormente descritas, outras proteínas líticas recombinantes têm sido utilizadas com sucesso no controle da mastite bovina. Essas proteínas, além de não apresentarem indícios de indução de resistência bacteriana, demonstram eficácia na inibição da

formação de biofilme em isolados multirresistentes de *S. aureus* associados à mastite bovina (Gutiérrez et al., 2020). Adicionalmente, outras proteínas líticas foram expressas com sucesso e apresentaram atividade tanto contra a formação de biofilme quanto sobre o crescimento de patógenos bacterianos resistentes a antimicrobianos relacionados à mastite bovina (Fan et al., 2016; Zhou et al., 2017).

De forma análoga às despolimerases, proteínas líticas podem ser utilizadas em estratégias combinatórias com antimicrobianos, bacteriófagos ou outros agentes antibiofilme e antibacterianos, visando aumentar a eficácia no controle de patógenos (Lu et al., 2023)

Os estudos na literatura demonstram o impacto dos patógenos bacterianos associados à mastite bovina na produção leiteira, bem como os riscos à saúde pública decorrentes da transferência de fatores de virulência e resistência a antimicrobianos. Nesse contexto, estratégias alternativas ao uso de antimicrobianos vêm sendo amplamente investigadas, com destaque para proteínas derivadas de bacteriófagos, como despolimerases e proteínas líticas. Entretanto, observa-se que a maioria dos estudos envolvendo proteínas líticas no controle de bactérias causadoras da mastite bovina concentra-se em endolisinas com diferentes atividades catalíticas, como amidases e endopeptidases, não necessariamente associadas à atividade lisozímica. Dessa forma, ainda são limitadas as investigações que exploram especificamente o potencial de lisozimas, especialmente em abordagens integradas com outras enzimas fágicas e frente a diferentes linhagens e espécies bacterianas.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Expressar e avaliar a atividade antibacteriana e antibiofilme de uma lisozima e despolimerases derivadas de bacteriófagos da viroteca do Laboratório de Imunovirologia Molecular (LIVM), produzidas em *E. coli* BL21(DE3), frente a isolados bacterianos associados à mastite bovina.

3.2. Objetivos específicos

- Obter os plasmídeos contendo os genes codificadores de despolimerases e lisozima;
- Clonar os genes de interesse em *E. coli* TOP10, confirmar as construções recombinantes e transformar *E. coli* BL21(DE3);
- Avaliar a expressão heteróloga e purificação das proteínas recombinantes;
- Otimizar as condições de indução, incluindo concentração do indutor e tempo de expressão;
- Avaliar a atividade antibacteriana e antibiofilme das proteínas expressas frente a patógenos associados à mastite bovina da bacterioteca do LIVM.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Construções dos vetores de expressão

Foram realizadas buscas no banco de dados GenBank para identificação de sequências codificadoras de despolimerases e lisozimas provenientes de bacteriófagos pertencentes à fagoteca do LIVM. As sequências foram selecionadas com base em suas anotações funcionais e apenas três foram encontradas nos genomas dos fagos isolados pelo LIVM.

No genoma do bacteriófago Shigella phage ShigP1 (acesso PQ818763), foi identificada uma despolimerase com atividade endosialidase, responsável pela clivagem de resíduos internos de ácido siálico. Uma segunda despolimerase foi identificada no bacteriófago BigMira-UFV01, pertencente a espécie *Acadecivirus bigMiraUFV01* (acesso OQ729741). Neste mesmo genoma, também foi identificada uma enzima com atividade de lisozima que foi selecionada.

Os genes selecionados, bem como seus respectivos vetores de clonagem, estão apresentados (Tabela 1).

Tabela 1 – Despolimerases e lisozima com seus respectivos plasmídeos que foram utilizados nos experimentos.

Código de sequência no GenBank	Categorização funcional	Plasmídeo clonado
ShigP1_00054	Endosialidase	pET26b(+)
BigMira_51	Despolimerase	pET26b(+)
BigMira_39	Lisozima	pET28a(+)

Fonte: Autoria própria.

Os vetores de expressão utilizados nos experimentos foram sintetizados pela empresa FASTBIO LTDA. (Ribeirão Preto, SP, Brasil), contendo o gene de resistência à canamicina e as sequências gênicas clonadas entre os sítios de restrição NdeI e NotI.

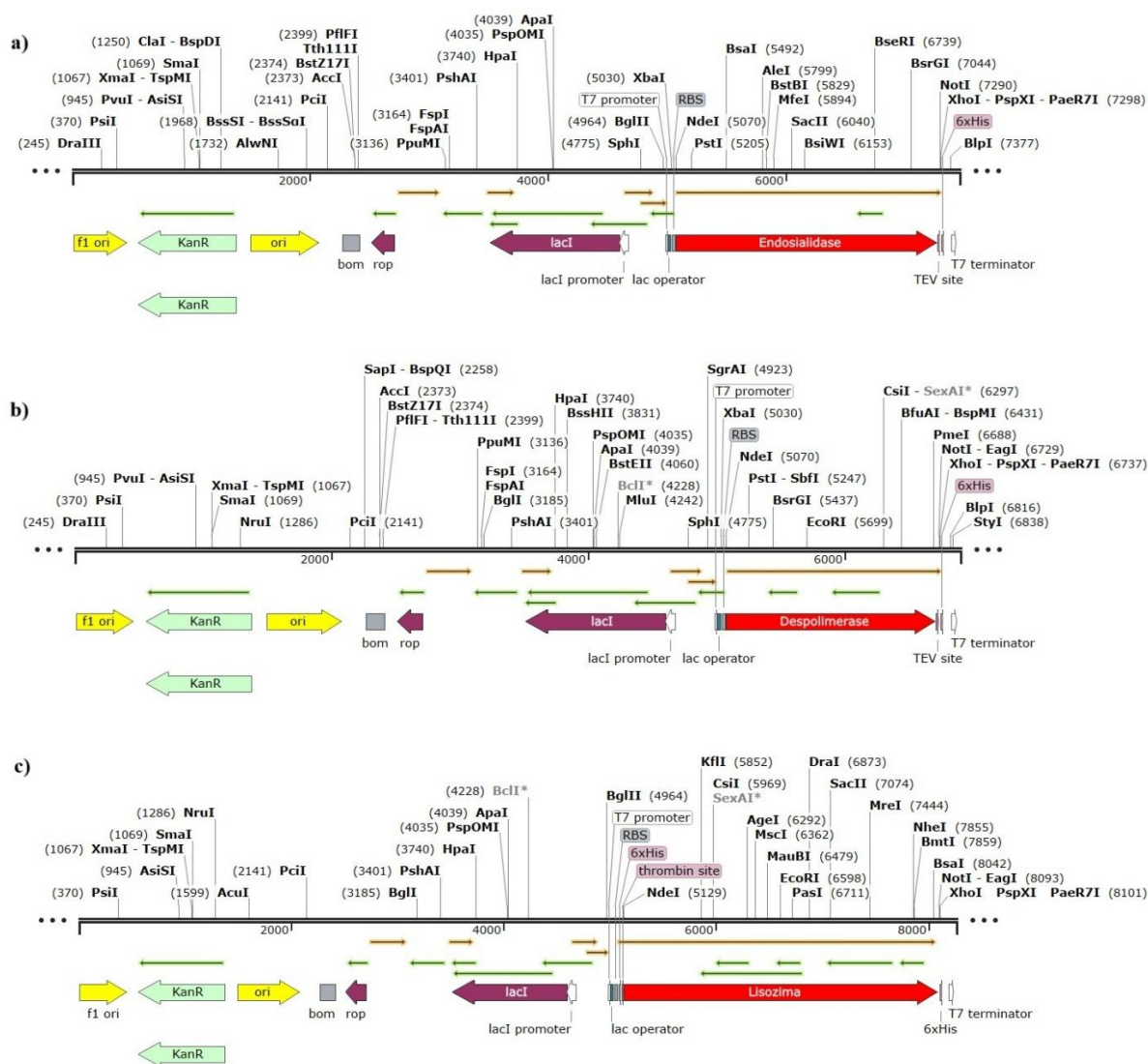
A lisozima foi projetada com uma cauda 6xHis na extremidade N-terminal, seguida de um sítio de clivagem para trombina, permitindo a sua remoção após a purificação.

Por sua vez, as despolimerases foram sintetizadas com um sítio de reconhecimento para a protease TEV (Tobacco Etch Virus), seguido de uma 6xHis na extremidade C-terminal, possibilitando a remoção quando necessário.

A inserção dos sítios de clivagem foi realizada devido à ausência de informações precisas sobre os resíduos essenciais à atividade enzimática, visando minimizar possíveis interferências

dos resíduos de aminoácidos nas extremidades das proteínas. O desenho dos vetores está apresentado (Figura 1).

Figura 1 – Esquema dos vetores: (a) vetor pET26b(+) contendo o gene da endosialidase do *Shigella* phage ShigP1; (b) vetor pET26b(+) contendo o gene da despolimerase do *Acadevirus bigMiraUFV01*; (c) vetor pET28a(+) contendo o gene da lisozima do *Acadevirus bigMiraUFV01*.



Fonte: Autoria própria utilizando o software SnapGene v8.2.2 (Dotmatics).

4.2. Análise dos domínios conservados e predição estrutural das proteínas

As características estruturais das proteínas selecionadas foram avaliadas por meio de ferramentas de bioinformática. O número de aminoácidos e a massa molecular teórica foram estimados utilizando a plataforma *ExPASy ProtParam* (Gasteiger et al., 2005). A presença de domínios conservados e de resíduos potencialmente envolvidos na atividade catalítica foi investigada por meio do *Conserved Domain Database* (CDD) e do *Motif Search*. A modelagem

estrutural tridimensional foi realizada utilizando o servidor *Phyre2* (Bocanova et al., 2022), e os modelos obtidos foram visualizados e analisados no *software* UCSF ChimeraX versão 1.12rc202605280043.

4.3. Transformação em células *E. coli* TOP10

Inicialmente, os plasmídeos recombinantes foram utilizados para transformar células *E. coli* TOP10 para a clonagem do constructo. A transformação foi realizada por meio de um protocolo adaptado de choque térmico, no qual as células bacterianas adquiriram competência ao longo do processo (Sambrook; Russel, 2001).

As células TOP10 foram lavadas com 1 mL de CaCl₂ 0,1 M e centrifugadas a 8000 rpm por 10 minutos. O precipitado foi ressuspensionado em 150 µL de CaCl₂ 0,1 M, sendo posteriormente adicionado o plasmídeo recombinante na concentração entre 100 e 150 ng/µL. A mistura foi mantida em gelo por 30 minutos e submetida ao choque térmico a 42 °C por 45 segundos, retornando em seguida ao gelo por 5 minutos.

Posteriormente, adicionou-se 1 mL de meio LB (Luria-Bertani) suplementado com glicose ou meio SOC (*Super Optimal Broth with Catabolite Repression*), seguido de incubação a 37 °C sob agitação de 180 rpm por duas horas. Em seguida, as amostras foram centrifugadas e 100 µL do material foram plaqueados em placas de Petri contendo meio LB sólido suplementado com canamicina (100 µg/mL).

As placas foram incubadas em estufa BOD a 37 °C durante a noite. Após o crescimento bacteriano, algumas colônias foram selecionadas e inoculadas em meio LB líquido suplementado com canamicina (100 µg/mL), sendo incubadas a 37 °C por 18 horas sob agitação de 180 rpm. Posteriormente, parte da cultura foi utilizada para preparação de estoque em glicerol 20%, enquanto o restante foi destinado à extração plasmidial.

4.3.1. Processo de extração dos plasmídeos

Para a obtenção do DNA plasmidial, foi utilizado um protocolo adaptado de miniprep por lise alcalina (Sambrook; Russel, 2001). Um volume de 10 mL da cultura bacteriana foi centrifugado a 8000 rpm por 10 minutos, sendo o sobrenadante descartado e o pellet ressuspensionado em 300 µL da solução I, pH 8,0 (Tris-HCl 25 mM, EDTA 10 mM e glicose ou sacarose 50 mM). Em seguida, adicionou-se 1 µL de RNase (10 mg/mL), mantendo-se a amostra em temperatura ambiente por 5 minutos.

Posteriormente, foram adicionados 300 µL da solução II (36 µL de NaOH 2 M, 36 µL de SDS 10% e 288 µL de água Milli-Q autoclavada), sendo o conteúdo homogeneizado suavemente por inversão. Imediatamente, adicionaram-se 200 µL da solução III (120 µL de

acetato de potássio 5 M, 23 μ L de ácido acético e 57 μ L de água Milli-Q autoclavada). Os tubos foram invertidos diversas vezes e centrifugados a 13000 rpm por 15 minutos.

O sobrenadante foi cuidadosamente transferido para novos tubos de 1,5 mL, aos quais foram adicionados 500 μ L de isopropanol. Após homogeneização suave, as amostras foram mantidas a -20°C durante a noite para precipitação do DNA plasmidial. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 13000 rpm por 15 minutos, o sobrenadante descartado e o pellet submetido a duas lavagens consecutivas, inicialmente com etanol 70% e posteriormente com etanol 100%, ambas seguidas de centrifugação a 13000 rpm por 15 minutos. Após secagem, o pellet foi ressuspensionado em 30 μ L de água Milli-Q autoclavada.

Após a extração, realizou-se eletroforese em gel de agarose a 1% para confirmação da presença do DNA plasmidial. Além disso, uma alíquota das amostras foi utilizada para PCR visando confirmar a presença dos insertos. Para isso, foram utilizados *primers* complementares às regiões promotora e terminadora T7, permitindo a obtenção de *amplicons* com tamanho aproximado ao de cada gene de interesse. Os *primers* foram desenhados e sintetizados pela Invitrogen (EUA).

4.4. Transformação da *E. coli* BL21(DE3) por eletroporação

Para a obtenção de células *E. coli* BL21(DE3) eletrocompetentes, um volume de 100 μ L do estoque bacteriano foi inoculado em meio LB líquido e incubado a 37°C sob agitação de 180 rpm por 16 horas. Após esse período, o pré-inóculo foi diluído na proporção de 1:100 em 300 mL de meio LB líquido. A cultura foi mantida sob agitação de 200 rpm a 37°C até atingir densidade óptica em 600 nm ($\text{OD}_{600\text{nm}}$) entre 0,2 e 0,3.

Posteriormente, a cultura foi resfriada em gelo e distribuída em seis tubos cônicos de 50 mL contendo 40 mL cada, sendo então centrifugada a 4000 rpm por 20 minutos a 4°C . Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e os pellets ressuspensionados em 40 mL de glicerol 20% gelado, seguido de nova centrifugação sob as mesmas condições. As células foram submetidas a sucessivas lavagens com glicerol 20% gelado, reduzindo-se gradativamente o volume final a cada etapa de centrifugação.

Na última etapa, o pellet bacteriano foi ressuspensionado em 1 mL de glicerol 10%, sendo preparadas alíquotas de 100 μ L em microtubos, posteriormente armazenados em ultrafreezer a -80°C .

Para a transformação por eletroporação, 100 μ L de células eletrocompetentes descongeladas foram misturados ao plasmídeo recombinante na concentração entre 10 a 100 ng/ μ L, mantendo-se a mistura em gelo por 10 minutos. Em seguida, o material foi transferido para uma cubeta de

eletroporação de 2 mm previamente resfriada, sendo submetido a um pulso elétrico de 2500 V utilizando um Eppendorf Eporator® (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemanha).

Imediatamente após a eletroporação, adicionou-se 1 mL de meio SOC, seguido de homogeneização e incubação a 37 °C sob agitação de 180 rpm por 2 horas. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas e 100 µL plaqueados em placas contendo meio LB sólido suplementado com canamicina (100 µg/mL).

As placas foram incubadas em estufa BOD a 37 °C durante a noite. Após o crescimento bacteriano, algumas colônias foram selecionadas e inoculadas em meio LB líquido suplementado com canamicina (100 µg/mL), sendo incubadas a 37 °C por 18 horas sob agitação de 180 rpm. Posteriormente, realizou-se PCR de colônia para confirmação da presença dos insertos, ressuspensando as colônias em 10 µL de água Mili-Q autoclavada e aquecendo por 10 minutos à 95 °C. A amplificação por PCR foi realizada utilizando os primers universais do promotor T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGG-3') e do terminador T7 (5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3'), obtidos da Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EUA), conforme protocolo adaptado (Mendoza-Rojas et al., 2021). As reações foram conduzidas nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos; 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 1 minuto, anelamento a 52 °C por 1 minuto e extensão a 68 °C por 1 minuto/kb, seguidos por uma extensão final a 68 °C por 4 minutos. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose para confirmação do sucesso da clonagem.

4.5. Expressão das proteínas recombinantes

Inicialmente, foi realizado um teste para determinar a expressão do gene de interesse utilizando IPTG (isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo), um análogo da alolactose capaz de se ligar às proteínas repressoras do operon lac, promovendo a liberação do repressor e permitindo a transcrição da região contendo a ORF de interesse.

Para isso, células de *E. coli* BL21(DE3) transformadas foram inoculadas do estoque em 7 mL de meio LB suplementado com canamicina (100 µg/mL). O pré-inóculo foi incubado a 37 °C sob agitação de 180 rpm por 16 horas. Posteriormente, a cultura foi diluída na proporção de 1:50 em 200 mL de meio LB contendo canamicina na mesma concentração, sendo incubada a 37 °C sob agitação de 200 rpm até atingir OD_{600nm} entre 0,4 e 0,6.

Em seguida, o IPTG foi adicionado à concentração final de 0,4 mM, mantendo-se a cultura sob incubação a 18 °C e agitação de 100 rpm por aproximadamente 20 horas.

Após a confirmação da expressão dos genes de interesse, os parâmetros de indução foram otimizados utilizando diferentes concentrações de IPTG (0,05 mM; 0,1 mM; 0,4 mM e 1 mM), mantendo-se as culturas a 18 °C sob agitação de 100 rpm. Após diferentes períodos de indução

(0, 1, 2, 3, 4, 5 e 24 horas), alíquotas de 10 mL foram coletadas e centrifugadas a 8000 rpm por 10 minutos a 4 °C.

O *pellet* bacteriano foi ressuspenso em 10 mL de tampão Tris-NaCl pH 8,0 (50 mM Tris-HCl e 150 mM NaCl), sendo posteriormente submetido à sonicação (amplitude de 30%, pulso de 1 segundo, pausa de 4 segundos e tempo total de 8 minutos). Após centrifugação, a fração solúvel foi recuperada. Para obtenção da fração insolúvel, o precipitado foi ressuspenso em 2 mL do mesmo tampão acrescido de uréia 8 M, seguido de centrifugação e recuperação das proteínas presentes em corpos de inclusão.

4.6. Purificação e análise das proteínas recombinantes

As proteínas obtidas na etapa anterior foram purificadas por cromatografia de afinidade ao níquel utilizando a resina *cOmplete His-Tag Purification Resin* (Roche), seguindo as recomendações do fabricante.

Posteriormente, a detecção das proteínas expressas foi realizada por SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) em gel de poliacrilamida a 10% ou 12%. As amostras foram preparadas em tampão desnaturante 1X (50 mM Tris-HCl, 100 mM DTT, 2% SDS, 0,1% azul de bromofenol, 10% glicerol, pH 6,8) e submetidas à desnaturação a 95 °C por 10 minutos (Sambrook; Russel, 2001). Ao final da corrida eletroforética, os géis foram revelados utilizando *Coomassie® Brilliant Blue G-250* (Sigma-Aldrich). Uma proteína com cauda de poli-histidina (His-tag) conhecida foi utilizada como controle positivo do ensaio.

A técnica de *Western blot* foi utilizada para confirmar a expressão das proteínas contendo cauda His-tag. As frações solúvel e insolúvel obtidas na etapa anterior foram transferidas para membranas de nitrocelulose de 0,45 µm utilizando o sistema *Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell* (Bio-Rad). Posteriormente, as membranas foram bloqueadas por 1 hora com solução PBS-T 1X contendo 0,5% de BSA (*bovine serum albumin*), seguido de três lavagens com PBS-T 1X.

Após o bloqueio, as membranas foram incubadas durante a noite sob agitação com anticorpo primário anti-histidina na diluição de 1:5000 em PBS-T 1X. Em seguida, foram realizadas três lavagens com PBS-T 1X para remoção dos anticorpos não ligados. Posteriormente, as membranas foram incubadas por 2 horas com anticorpo secundário IgG conjugado à peroxidase, na diluição de 1:5000 em PBS-T 1X. Após nova etapa de lavagem com PBS-T 1X, a revelação foi realizada no escuro utilizando solução reveladora contendo 15 mL de PBS-T 1X, 15 mg de DAB e 12 µL de água oxigenada.

Após a confirmação da expressão das proteínas de interesse com base no peso molecular esperado, as amostras foram concentradas utilizando dispositivos *Amicon Ultra-15* de 30 kDa

(Sigma-Aldrich) e quantificadas por meio do *Pierce™ BCA Protein Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), seguindo as instruções do fabricante.

A condição que apresentou maior rendimento proteico, considerando a concentração de IPTG e o tempo de indução, foi utilizada para expressão em maior escala, visando à realização dos ensaios *in vitro* subsequentes.

4.7. Ensaios de atividade antibacteriana e antibiofilme

A atividade antibacteriana das proteínas recombinantes foi avaliada utilizando isolados pertencentes à bacterioteca do LIVM, incluindo *S. aureus*, *S. agalactiae* e *S. uberis* previamente isolados de vacas acometidas por mastite bovina (Tabela 2).

Tabela 2 – Isolados bacterianos utilizados nos testes com a enzima.

Isolados de <i>S. aureus</i> ¹	Isolados de <i>S. agalactiae</i> ¹	Isolados de <i>S. uberis</i> ¹
SA 4188	SAg 6730	SU 2745
SA 4197	SAg 8136	SU 10065
SA 4231	SAg 8416	SU 10071
SA 4437	SAg 10039	SU 10081
SA 5684	SAg 10046	SU 10085
SA 5685	SAg 10052	SU 10108
SA 5702	SAg 10055	SU 10109
SA 5736	SAg 10058	SU 10110
SA 7430	SAg 10063	SU 10132
SA 7433	SAg 10066	SU 10135
SA 7434	SAg 10069	SU 10136
SA 8528	SAg 10070	SU 10146
SA 8529	SAg 10078	SU 10148
SA 8531	SAg 10089	SU 10149
	SAg 10094	SU 10153
	SAg 10116	SU 10154
	SAg 10120	SU 10155
	SAg 10121	
	SAg 10125	
	SAg 10156	

SAg 10158

SAg 10160

SAg 10163

¹Obtidos da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, Brasil.

Fonte: Autoria própria.

Para os ensaios de curva de crescimento, as culturas bacterianas foram cultivadas em 10 mL de meio LB líquido durante a noite sob agitação de 180 rpm a 37 °C para *S. aureus*. Para *S. agalactiae* e *S. uberis*, foi utilizado meio de cultivo BHI (*Brain Heart Infusion*), com incubação por 24 horas e 48 horas, respectivamente. Posteriormente, as culturas foram ajustadas para OD_{600nm} de 0,1

Em microplacas de 96 poços, foram adicionados 180 µL de meio de cultivo LB e 20 µL das culturas bacterianas para o controle positivo, enquanto os poços de tratamento receberam 160 µL de meio LB, 20 µL das proteínas e 20 µL das culturas bacterianas. Como controles negativos, utilizaram-se poços contendo apenas meio de cultura e meio suplementado com as proteínas recombinantes.

As placas foram incubadas em leitor de microplacas por 24 horas, ou 48 horas para *S. uberis*, com leituras automáticas realizadas a cada 15 minutos em comprimento de onda de 600 nm. Diferentes concentrações das proteínas (30, 50 e 100 µg/mL) foram avaliadas visando determinar o efeito inibitório sobre o crescimento bacteriano.

Além disso, ensaios de biofilme foram realizados utilizando microplacas de 96 poços. As proteínas purificadas foram adicionadas no início do experimento, antes da formação do biofilme. Os controles consistiram em poços contendo apenas meio de cultura e poços contendo meio de cultura suplementado com as proteínas recombinantes obtidas neste estudo. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas.

A quantificação do biofilme foi realizada pelo método do cristal violeta adaptado (Lajhar et al. 2018). Após o período de incubação, os poços foram lavados com tampão fosfato-salino (NaCl 0,13 M; KCl 2 mM; Na₂HPO₄ 9 mM; KH₂PO₄ 1 mM) para remoção das células não aderidas. As células aderidas foram fixadas com metanol 99% por 15 minutos. Após remoção do metanol e secagem, as amostras foram coradas com cristal violeta 0,1% por 20 minutos em temperatura ambiente, seguido de lavagem com tampão fosfato-salino para remoção do excesso de corante.

Por fim, após secagem dos poços, o biofilme corado foi ressuspenso em 200 µL de solução etanol-acetona 8:2 (v/v), sendo posteriormente realizada a leitura da absorbância em 590 nm.

A avaliação do potencial lítico da enzima foi realizada por meio de ensaios de gotejamento (*spot assay*), aplicando-se alíquotas de 10 µL da solução enzimática sobre tapetes bacterianos. Foram testadas as concentrações de 100, 300 e 500 µg/mL da proteína. Previamente à confecção das placas, a densidade óptica em 600 nm das suspensões bacterianas foi padronizada em 0,1. O procedimento metodológico seguiu as diretrizes preconizadas por Bocanova et al. (2022). Como controle negativo, utilizou-se o próprio tampão de armazenamento da enzima (Tris-NaCl acrescido de imidazol 0,05 M). Por fim, as placas foram mantidas em incubadora biológica a 37 °C por um período de 22 horas antes da avaliação da atividade de lise.

Todos os ensaios foram conduzidos em triplicata biológica. As curvas de crescimento em microplaca e os ensaios de biofilme contaram com quatro e oito réplicas técnicas, respectivamente, enquanto o ensaio de gotejamento foi realizado sem réplicas técnicas adicionais. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *GraphPad Prism* (versão 8.0.2; GraphPad Software, EUA), e as diferenças entre os grupos foram analisadas utilizando o teste *t* de *Student*. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

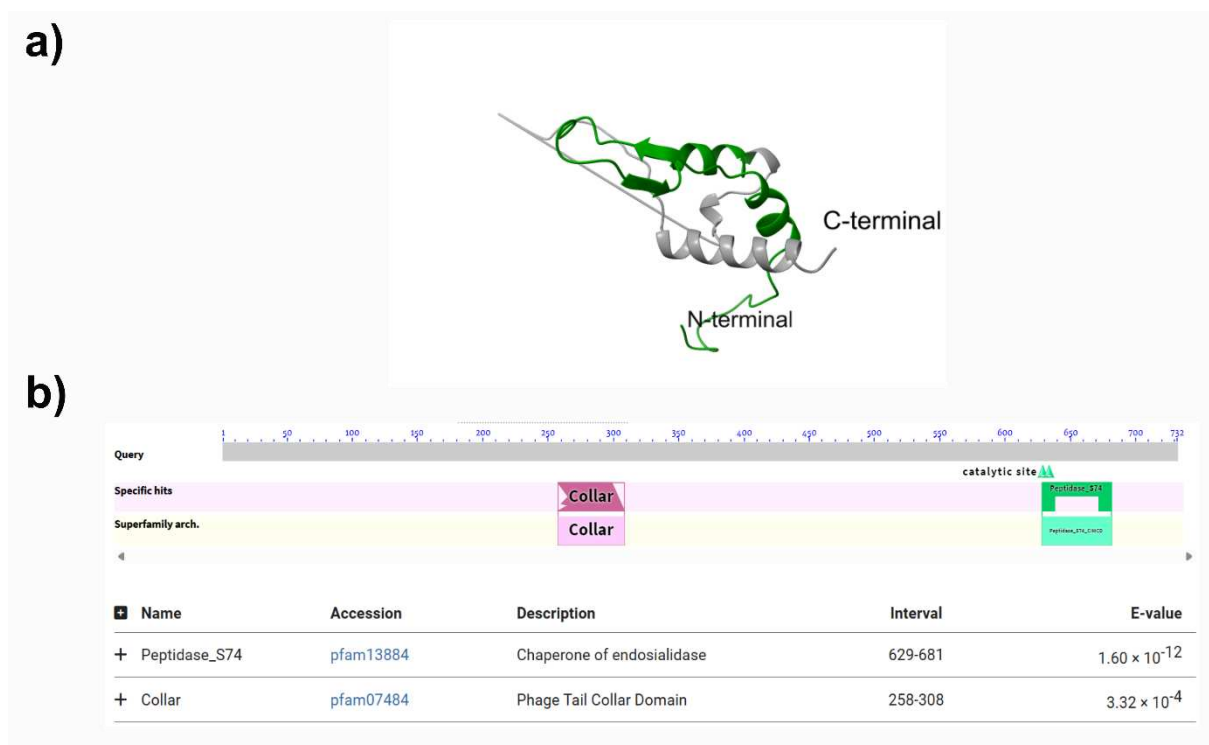
5. RESULTADOS

5.1. Predição estrutural e dos resíduos catalíticos das proteínas recombinantes

Após a realização das buscas em bancos de dados, não foi possível identificar proteínas com similaridade significativa à despolimerase do bacteriófago BigMira-UFV01. Dessa forma, não foi possível inferir com precisão os possíveis resíduos do sítio catalítico nem a estrutura tridimensional dessa proteína. A sequência proteica possui 545 aminoácidos, com massa molecular estimada de 61,4 kDa.

A endosialidase do fago ShigP1 apresenta 732 aminoácidos e massa molecular estimada de 79,3 kDa. As análises realizadas no CDD identificaram a presença de um domínio de chaperona de endosialidase entre os resíduos 629 e 681 ($E\text{-value} = 1,64 \times 10^{-12}$), localizado na região C-terminal, além de um domínio estrutural do tipo “colar” entre os resíduos 258 e 308 ($E\text{-value} = 3,57 \times 10^{-4}$) (Figura 2a). A busca por motivos conservados também revelou a presença de um domínio de peptidase pertencente à família Pfam PF13884, coincidindo com os intervalos identificados pelo CDD. O modelo estrutural predito pela plataforma Phyre2 apresentou cobertura de 92 resíduos, com nível de confiança de 99,2% (Figura 2b). Apesar da baixa cobertura em relação ao comprimento total da proteína, essa região corresponde aos resíduos associados ao sítio ativo da chaperona de endosialidase.

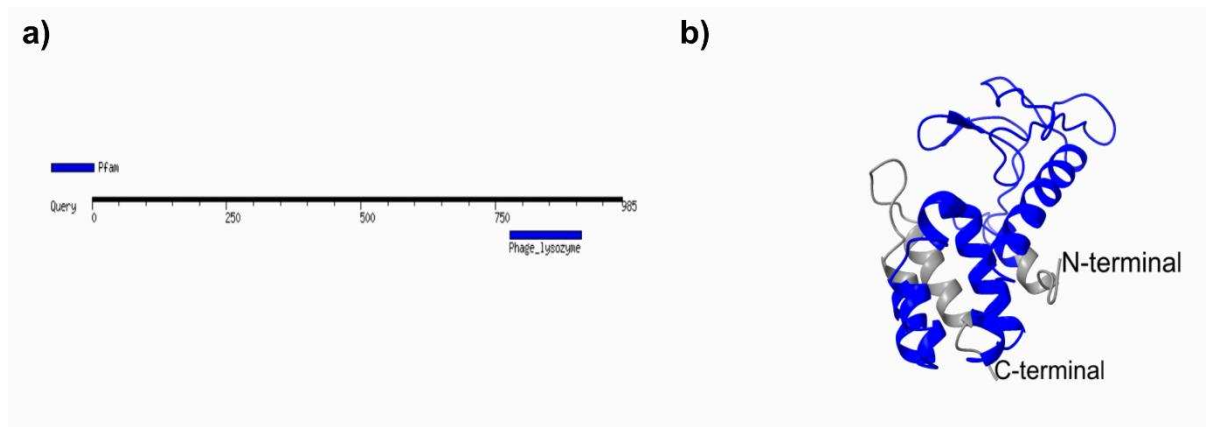
Figura 2 – Análises *in silico* da endosialidase ShigP1. (a) Identificação de domínios conservados na sequência proteica por meio de busca em bancos de dados de domínios, evidenciando o domínio estrutural *Collar* (rosa) e o domínio Peptidase_S74, correspondente à chaperona de endosialidase (verde). (b) Modelo tridimensional parcial predito pelo servidor Phyre2 para uma região de 92 aminoácidos da proteína, abrangendo o domínio de chaperona de endosialidase, destacado em verde



Fonte: Elaborado pelo autor utilizando Phyre2, CDD e UCSF ChimeraX (2026).

A predição da lisozima do bacteriófago BigMira-UFV01 estima que ela é composta por 985 aminoácidos e apresenta massa molecular de aproximadamente 109 kDa. A análise de domínios conservados realizada por meio do CDD revelou a presença de um domínio catalítico do tipo lisozima T4 na região C-terminal, entre os resíduos 796 e 935 ($E\text{-value} = 6,95 \times 10^{-7}$), sugerindo possível atividade de hidrólise do peptidoglicano bacteriano. Adicionalmente, a busca por motivos conservados identificou um domínio de lisozima de fago pertencente à família Pfam PF00959, abrangendo os resíduos 776 a 909 ($E\text{-value} = 3,4 \times 10^{-7}$) (Figura 3a). A estrutura tridimensional foi predita utilizando a plataforma Phyre2 (Figura 3b). O modelo apresentou nível de confiança de 98,0% com base no melhor molde estrutural identificado, cobrindo 148 resíduos, o que corresponde a aproximadamente 15% da sequência completa. Essa região coincide com o domínio catalítico previamente identificado, permitindo a análise estrutural de resíduos potencialmente envolvidos na atividade enzimática.

Figura 3 – Caracterização estrutural da lisozima do fago BigMira. (a) Identificação dos domínios conservados da proteína por meio de análise no banco de dados Pfam, evidenciando a presença do domínio de lisozima. (b) Modelo tridimensional parcial predito pelo servidor Phyre2, abrangendo 148 resíduos da proteína, com destaque em azul para a região correspondente ao domínio de lisozima que contém o sítio ativo.



Fonte: Elaborado pelo autor utilizando Phyre2, CDD e UCSF ChimeraX (2026).

5.2. Expressão e análise das proteínas recombinantes

Após a purificação da fração solúvel da endosialidase ShigP1 em resina de níquel, foram obtidos 384 µg de proteína eluída a partir de 300 mL de cultura induzida por 22 h com 0,1 mM de IPTG, conforme quantificação pelo método BCA. Entretanto, as análises por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 10%, corado com *Coomassie Brilliant Blue*, não revelaram bandas compatíveis com o peso molecular esperado para a proteína, tanto na fração solúvel quanto na insolúvel. De forma semelhante, o *Western blot* não evidenciou sinal específico correspondente à endosialidase ShigP1. Em conjunto, esses resultados não permitiram confirmar a expressão da proteína nas condições avaliadas (Figura 4a-b).

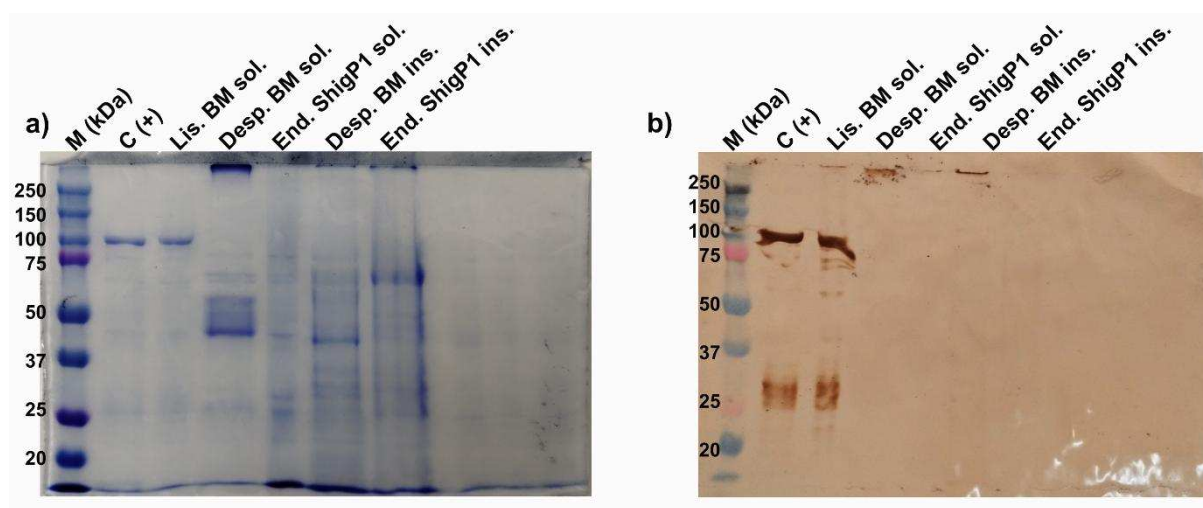
Após 22 h de indução com 0,1 mM de IPTG, a purificação da despolimerase do fago BigMira resultou na obtenção de 4,6 mg de proteína a partir de 300 mL de cultura. Contudo, as análises por SDS-PAGE e *Western blot* não evidenciaram bandas compatíveis com o peso molecular esperado para a proteína recombinante. Apesar disso, foi observada uma marcação retida próxima ao poço de aplicação das amostras, tanto na fração solúvel quanto na insolúvel (Figura 4a-b).

Após 22 h de indução, a lisozima do fago BigMira foi expressa e purificada a partir de 600 mL de cultura. Após a etapa de concentração da amostra purificada, foram recuperados aproximadamente 6,7 mg de proteína, conforme quantificação pelo método BCA, correspondendo a um rendimento de 11,1 mg/L. As análises por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 10% e por *Western blot* utilizando anticorpo anti-His confirmaram a expressão

da enzima, evidenciada pela presença de uma banda com massa molecular compatível com a proteína recombinante (Figura 4a-b).

Considerando a ausência de confirmação da expressão das despolimerases recombinantes, não foi possível incluí-las nos ensaios funcionais. Dessa forma, os testes contra os isolados de mastite bovina foram conduzidos exclusivamente com a lisozima BigMira, conforme apresentado nos resultados a seguir.

Figura 4 – Análise da expressão e purificação das proteínas recombinantes por SDS-PAGE e *Western blot*. (a) Gel de poliacrilamida a 10% corado com *Coomassie Brilliant Blue* contendo as frações analisadas durante a expressão e purificação das proteínas recombinantes. (b) *Western blot* obtido das proteínas e detecção com anticorpo anti-His. M: marcador de massa molecular; C (+): controle positivo Lis. BigMira; Lis. BM sol.: fração solúvel da lisozima BigMira; Desp. BM sol.: fração solúvel da despolimerase BigMira; End. ShigP1 sol.: fração solúvel da endosialidase ShigP1; Desp. BM ins.: fração insolúvel da despolimerase BigMira; End. ShigP1 ins.: fração insolúvel da endosialidase ShigP1.

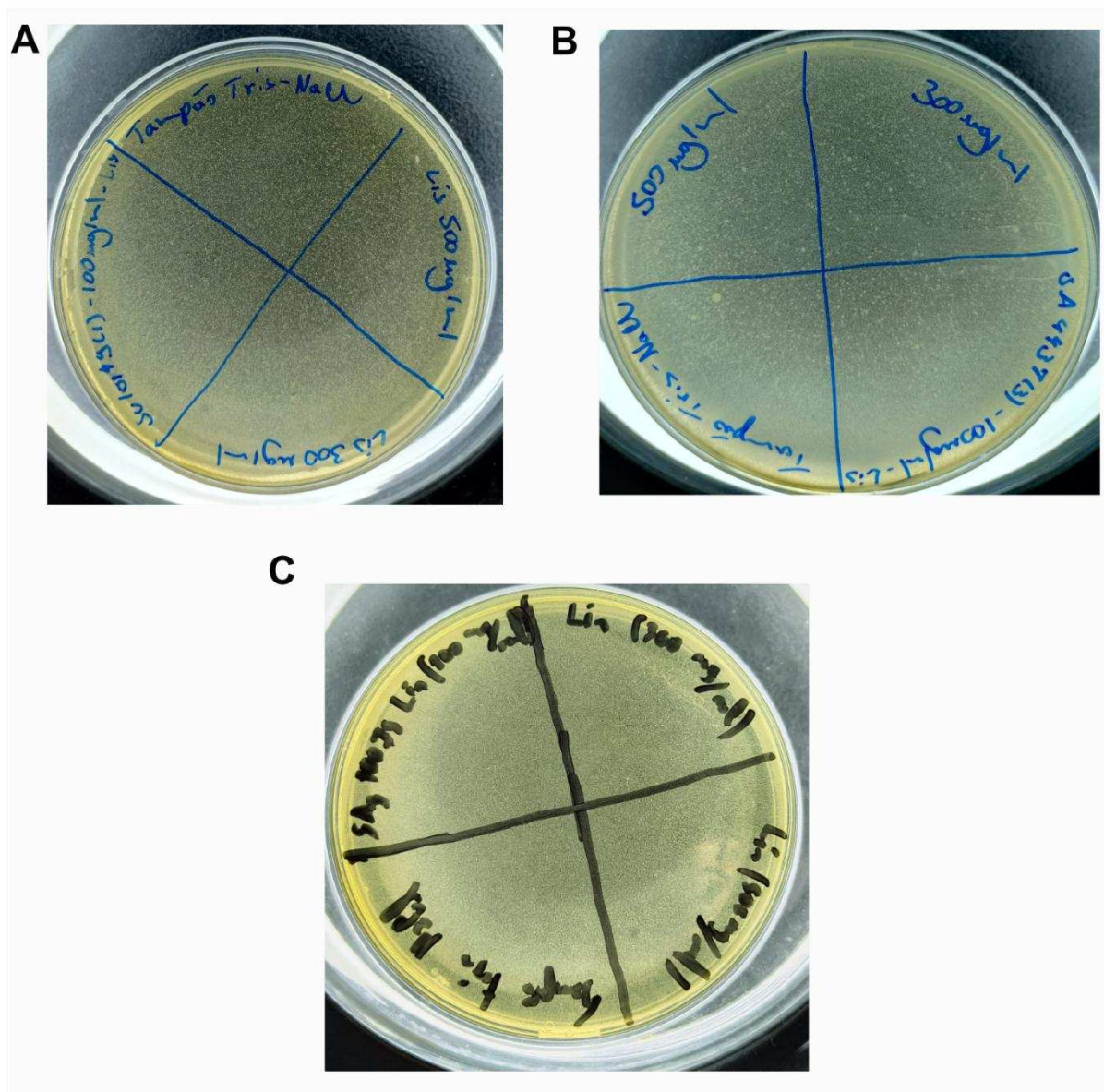


Fonte: Autoria própria.

5.3. Impacto da lisozima do BigMira na dinâmica de crescimento bacteriano

A atividade lítica da lisozima do BigMira foi avaliada via teste de gotejamento contra os isolados bacterianos *S. agalactiae* e *S. uberis*, além de um dos isolados de *S. aureus* (Tabela 2). Contudo, não foi observada a formação de halos de inibição do crescimento em nenhum dos isolados de testados (Figura 5).

Figura 5 - Ensaio de gotejamento da lisoizima do bacteriófago BigMira sobre isolados representativos. (A) *S. uberis*, (B) *S. aureus* e (C) *S. agalactiae*. Não foram observados halos de lise em nenhum dos isolados avaliados. As imagens apresentadas são representativas dos resultados obtidos para todos os isolados testados

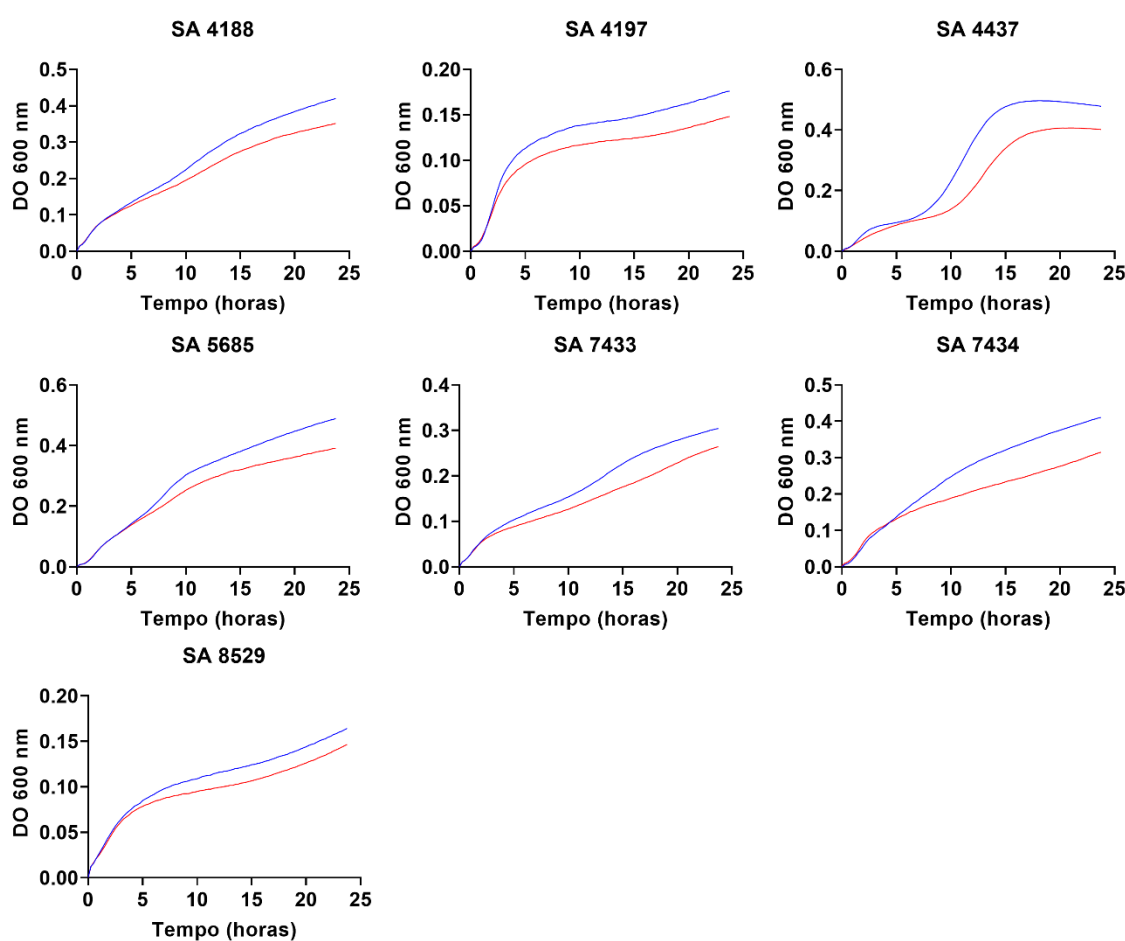


Fonte: Autoria própria.

O tratamento dos isolados de *S. aureus* com a lisoizima de BigMira (10 µg/mL) resultou em redução significativa do crescimento de 7 isolados após 24 h, em comparação ao grupo controle (não tratado). A redução observada variou entre 10% a 23% (Figura 6). No entanto, quando esses mesmos isolados foram tratados apenas com o tampão Tris-NaCl contendo 0,05 M de imidazol, foi observada redução significativa do crescimento em 6 desses isolados, com magnitude semelhante àquela verificada no tratamento com a enzima. Dessa forma, não foi possível atribuir o efeito observado exclusivamente à ação da lisoizima, uma vez que o tampão

apresentou efeito semelhante (Apêndice A). Além disso, um dos isolados apresentou aumento significativo do crescimento quando tratado com 10 µg/mL de lisozima. Entretanto, quando exposto a concentrações mais elevadas (30 e 50 µg/mL), observou-se redução do crescimento, embora essa redução não tenha sido estatisticamente significativa (Apêndice B).

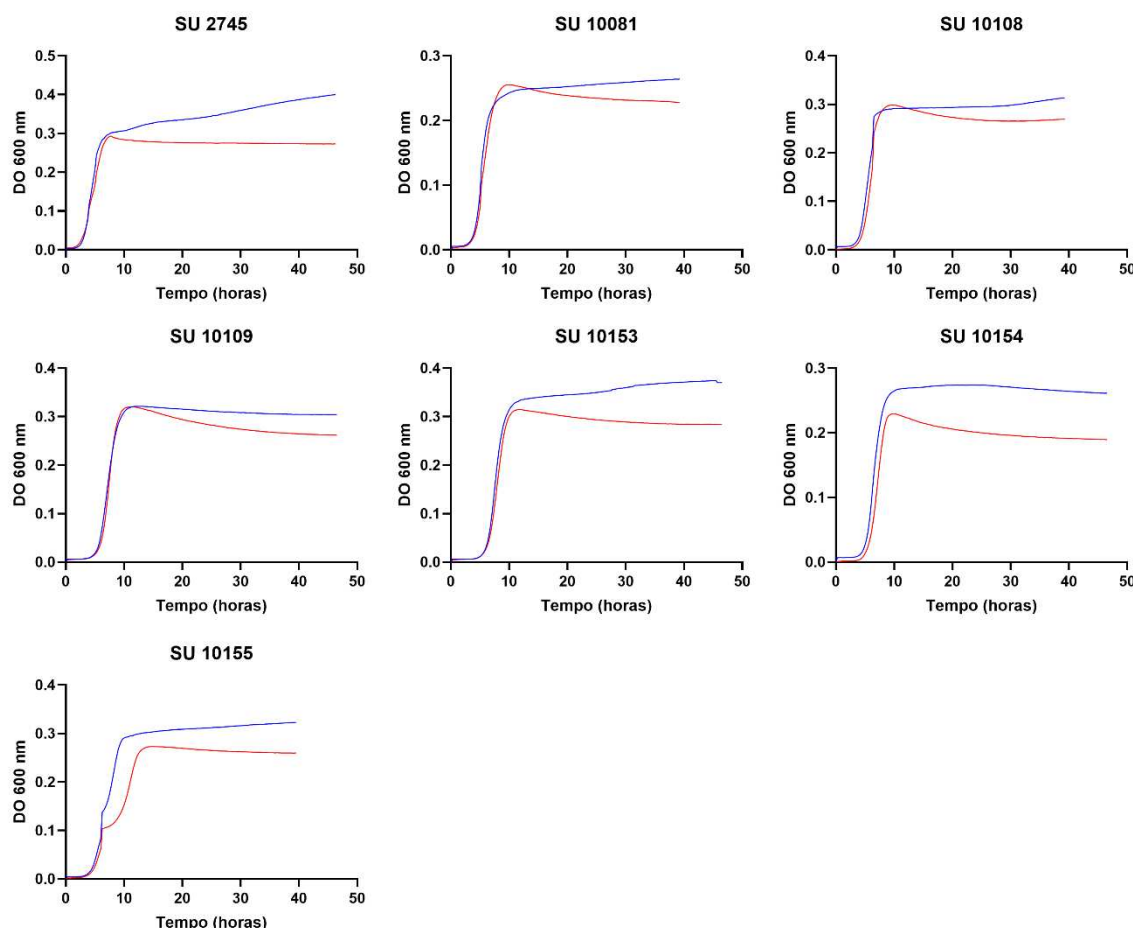
Figura 6 - Curvas de crescimento de isolados de *S. aureus* tratados com lisozima de BigMira. Os 7 isolados apresentaram redução significativa no crescimento bacteriano (DO_{600nm}) após 24 h de tratamento com a lisozima na concentração de 10 µg/mL (linhas vermelhas) em comparação ao grupo controle não tratado (linhas azuis). Dados apresentados com as médias das triplicatas biológicas. A identificação de cada isolado está indicada acima do respectivo painel. Significância estatística definida como $P < 0.05$.



Fonte: Autoria própria.

Após o fim dos testes nos 17 isolados de *S. uberis*, o tratamento com a lisozima BigMira na concentração de 10 µg/mL reduziu significativamente o crescimento de 7 isolados após 48 h. Essa redução, em comparação ao controle não tratado, variou entre 13% e 31% (Figura 7).

Figura 7 – Efeito da lisozima BigMira nos 7 isolados de *S. uberis* responsivos à enzima recombinante. Curvas de crescimento com a médias das triplicatas biológicas das culturas bacterianas na ausência (azul) e presença (vermelho) de 10 µg/mL da proteína. Significância estatística foi definida como $P < 0.05$.



Fonte: Autoria própria.

A fim de avaliar o efeito do tampão utilizado na estocagem da enzima recombinante, 6 isolados foram tratados com tampão Tris-NaCl contendo 0,05 M de imidazol. Um dos isolados responsivos não pôde ser incluído nesse ensaio. Após 48 h, 3 isolados apresentaram redução significativa no crescimento em relação ao controle não exposto ao tampão. Entretanto, o efeito de redução observado no tratamento com a lisozima BigMira foi aproximadamente duas vezes maior em comparação ao tampão isoladamente (Apêndice C).

Ao contrário do observado nos testes com *S. uberis*, nenhum dos 23 isolados de *S. agalactiae* apresentou redução de crescimento quando tratados com 10 µg/mL da lisozima BigMira (Apêndice D). Considerando esses resultados, diferentes concentrações da enzima (30, 50 e 100 µg/mL) foram testadas em 4 isolados que apresentaram tendência de redução ou de crescimento nos ensaios anteriores, com o objetivo de avaliar um possível efeito dose-

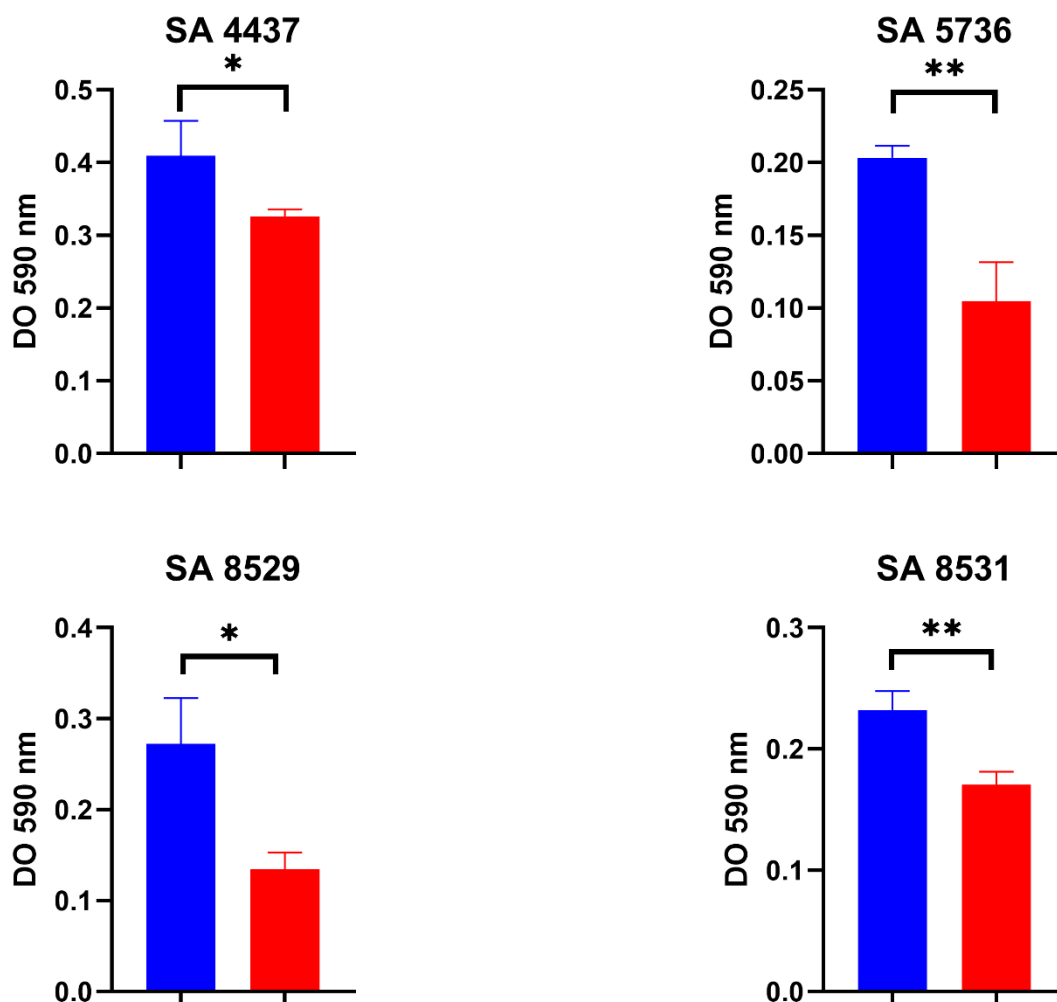
dependente. Após exposição por 48 h a essas diferentes concentrações, nenhum dos isolados apresentou redução significativa no crescimento em comparação ao controle não tratado (Apêndice E).

5.4. Influência da lisozima do BigMira na formação de biofilme

Com a ausência de formação de biofilme pelos isolados de *S. uberis*, os testes da influência na formação de biofilme foram realizados utilizando apenas os isolados de *S. aureus* e *S. agalactiae*.

Os 14 isolados de *S. aureus* submetidos ao ensaio tiveram seu perfil de formação de biofilme categorizado (Tabela 3). Desses, 3 (21,4%) foram classificados como não produtores, 5 (35,7%) como fracos formadores e 6 (42,9%) como moderados formadores. Entre os isolados produtores de biofilme, 4 (36,4% do total de formadores) apresentaram redução estatisticamente significativa na formação de biofilme após o tratamento com a lisozima, em comparação ao controle, com percentuais de inibição variando de 20% a 50% (Figura 8). Quando esses mesmos isolados foram tratados apenas com o tampão de estoque da proteína, nenhum apresentou redução significativa na formação de biofilme (Apêndice F).

Figura 8 - Efeito da lisozima de BigMira (10 $\mu\text{g/mL}$) sobre a formação de biofilme dos isolados de *S. aureus* que apresentaram redução significativa em relação ao controle. Barras azuis: controle não tratado; barras vermelhas: tratamento com lisozima. Os dados são apresentados como média das triplicatas biológicas $\pm$ desvio padrão. As diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste *t* de Student. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.



Fonte: Autoria própria.

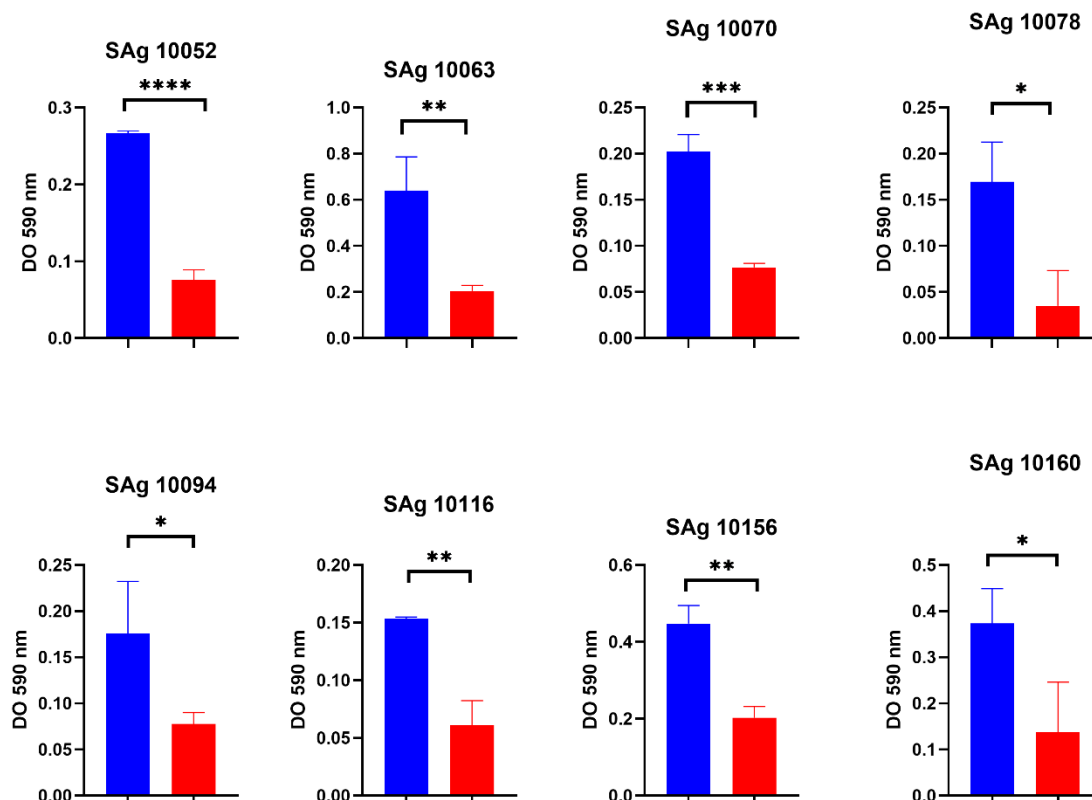
Tabela 3 – Classificação do perfil de produção de biofilme dos isolados de *S. aureus*.

Isolado	Classificação da formação de biofilme
SA 4188	Fraco formador de biofilme
SA 4197	Fraco formador de biofilme
SA 4231	Moderado formador de biofilme
SA 4437	Moderado formador de biofilme
SA 5684	Não formador de biofilme
SA 5685	Não formador de biofilme
SA 5702	Fraco formador de biofilme
SA 5736	Moderado formador de biofilme
SA 7430	Não formador de biofilme
SA 7433	Fraco formador de biofilme
SA 7434	Fraco formador de biofilme
SA 8528	Moderado formador de biofilme
SA 8529	Moderado formador de biofilme
SA 8531	Moderado formador de biofilme

Fonte: Autoria própria.

A capacidade de formação de biofilme dos 23 isolados de *S. agalactiae* foi classificada (Tabela 4). Desses, 6 (26,1 %) foram classificados como não formadores de biofilme, 12 (52,2 %) como fracos formadores e 5 (21,7 %) como moderados formadores de biofilme. Um dos isolados apresentou elevada variabilidade na quantificação do biofilme após coloração com cristal violeta, mesmo após repetidas análises (Apêndice G). Dessa forma, esse isolado foi excluído dos ensaios de tratamento. Dos 17 isolados formadores de biofilme, a proteína recombinante reduziu significativamente a formação de biofilme em 8 (47,1 %), com reduções variando de 54 % a 79 % em relação ao controle não tratado (Figura 9). Esses mesmos isolados responsivos foram avaliados quanto à influência do tampão utilizado no armazenamento da proteína. Foi observada redução significativa na formação de biofilme em três isolados tratados apenas com o tampão. Entretanto, a proteína recombinante promoveu uma redução aproximadamente duas vezes maior que a observada com o tampão isoladamente (Apêndice H).

Figura 9 – Representação gráfica dos 8 isolados de *S. agalactiae* que apresentaram redução significativa na formação de biofilme após tratamento com a lisozima do BigMira (10 µg/mL). As barras azuis representam o controle não tratado e as vermelhas o tratamento com a enzima. Os dados são apresentados como média das triplicatas biológicas ± desvio padrão (DP). A significância estatística foi determinada pelo teste *t* de Student ($p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).



Fonte: Autoria própria.

Tabela 4 – Classificação da capacidade de formação de biofilme dos isolados de *S. agalactiae* testados.

Isolado	Classificação da formação de biofilme
SAg 6730	Fraco formador de biofilme
SAg 8136	Não formador de biofilme
SAg 8416	Não formador de biofilme
SAg 10039	Não formador de biofilme
SAg 10046	Moderado formador de biofilme
SAg 10052	Fraco formador de biofilme
SAg 10055	Não formador de biofilme
SAg 10058	Não formador de biofilme
SAg 10063	Moderado formador de biofilme
SAg 10066	Fraco formador de biofilme
SAg 10069	Fraco formador de biofilme
SAg 10070	Moderado formador de biofilme
SAg 10078	Fraco formador de biofilme
SAg 10089	Fraco formador de biofilme
SAg 10094	Fraco formador de biofilme
SAg 10116	Fraco formador de biofilme
SAg 10120	Fraco formador de biofilme
SAg 10121	Fraco formador de biofilme
SAg 10125	Fraco formador de biofilme
SAg 10156	Moderado formador de biofilme
SAg 10158	Não formador de biofilme
SAg 10160	Moderado formador de biofilme
SAg 10163	Fraco formador de biofilme

Fonte: Autoria própria.

6. DISCUSSÃO

O domínio de protease identificado como PF13884 na endossialidase do bacteriófago ShigP1 está associado a um processo de autoclivagem necessário para a correta trimerização da proteína (Peters et al., 2024). Esse processamento promove a remoção da região C-terminal, resultando na perda dos resíduos finais da proteína e, consequentemente, da His-tag inserida nessa extremidade (Leggate et al., 2002). Dessa forma, é plausível que a ausência da etiqueta de afinidade tenha comprometido tanto a purificação por cromatografia de afinidade em níquel quanto a detecção da proteína por *Western blot* utilizando anticorpo anti-His. Assim, em estudos futuros, a cromatografia de exclusão por tamanho ou cromatografia de troca iônica poderão ser empregadas como estratégias alternativas para a purificação da proteína recombinante, uma vez que essa técnica promove a separação das proteínas com base em seu volume hidrodinâmico, independentemente da presença de etiquetas de afinidade (Oliveira; Domingues, 2018).

As análises da sequência polipeptídica da despolimerase do BigMira não identificaram domínios conservados no banco de dados CDD, dificultando inferências sobre sua classificação e organização estrutural. Entretanto, a quantificação da fração eluída pelo método de BCA, em conjunto com a detecção da proteína por *Western blot* utilizando anticorpo anti-His, é consistente com a expressão da proteína recombinante. Apesar disso, a proteína permaneceu retida na canaleta durante as análises por SDS-PAGE e *Western blot*, mesmo após sucessivos tratamentos desnaturantes, incluindo altas concentrações de SDS, agentes redutores (DTT e β -mercaptoetanol) e agentes caotrópicos (ureia e guanidina-HCl). Esse comportamento pode estar relacionado à formação de oligômeros altamente estáveis, tais como trímeros, ou de agregados resistentes à dissociação, uma vez que diversas despolimerases de bacteriófagos apresentam organização trimérica e elevada estabilidade estrutural, podendo manter sua conformação mesmo sob condições desnaturantes, incluindo o SDS (Knecht et al., 2020; Wang et al., 2023). No entanto, experimentos adicionais são necessários para confirmar o estado oligomérico da proteína e elucidar o mecanismo responsável por esse comportamento. Além disso, a confirmação definitiva da identidade da proteína recombinante poderá ser obtida em estudos futuros por meio do sequenciamento de peptídeos por espectrometria de massas, permitindo verificar se a proteína purificada corresponde, de fato, à despolimerase predita.

O bacteriófago T4 possui em sua proteína gp5 um domínio com ação de lisozima, sendo considerada uma das enzimas mais bem caracterizadas na literatura, servindo de modelo para estudos utilizando essa classe de proteína (Baase et al., 2010). A lisozima desse fago possui os resíduos Glu184, Asp193 e Thr199 envolvidos no funcionamento do sítio ativo (Kanamaru et al., 2002). Quando alinhada a essa proteína, a lisozima do BigMira possui seu Asp800 na mesma

posição do Asp193 da gp5, porém Thr199 é substituída por Ser805, com uma substituição que conserva as propriedades físico-químicas na região. Por outro lado, não foi possível estabelecer uma correspondência para a região que contém o resíduo Glu184 com base no alinhamento de sequência. Assim, a identificação de um possível resíduo equivalente dependeria de análises estruturais tridimensionais mais detalhadas. Esses achados sugerem que a arquitetura catalítica da lisozima do BigMira é conservada em comparação a lisozima do fago T4. Entretanto, são necessários estudos mais aprofundados para confirmar esses indícios.

Para avaliar a atividade lítica de proteínas, diferentes metodologias experimentais podem ser empregadas, cada uma com limitações e sensibilidades específicas (Nelson et al., 2012). Dessa forma, a ausência de lise nos ensaios utilizando sobrecamada de ágar semissólido (0,6% de ágar) não contradiz os resultados obtidos nas curvas de crescimento monitoradas por OD_{600nm}, uma vez que resultados distintos entre diferentes abordagens experimentais são frequentemente relatados na literatura (Nakonieczna et al., 2024; Schmelcher et al., 2012). Uma possível explicação para a ausência de halo de lise é o elevado peso molecular da lisozima recombinante (111,4 kDa), que pode limitar sua difusão pela matriz de ágar. De fato, a capacidade de difusão de proteínas nesse meio tende a ser inversamente proporcional ao seu peso molecular (Vander Elst, 2024).

A lisozima do BigMira foi identificada a partir de um bacteriófago cujo hospedeiro é a bactéria *P. mirabilis*, um patógeno Gram-negativo (Silva et al., 2023). Entretanto, a proteína recombinante derivada desse fago apresentou atividade lítica contra isolados de *S. uberis*, um microrganismo Gram-positivo. Esse comportamento pode ser parcialmente explicado pela ausência de uma membrana externa nesses organismos, o que facilita o acesso da enzima ao peptidoglicano da parede celular. Além disso, a atividade observada pode estar associada ao reconhecimento de estruturas conservadas no peptidoglicano, o que poderia permitir ação em espécies filogeneticamente distantes (Broendum et al., 2018). Por outro lado, a ausência de atividade em *S. agalactiae* pode estar relacionada a características estruturais específicas, como variações na composição da parede celular, presença de ácidos teicoicos e produção de cápsula extracelular, que podem atuar como barreiras adicionais à ação enzimática (Schmelcher et al., 2012).

Adicionalmente, estudos prévios têm demonstrado efeitos sinérgicos entre enzimas fágicas e antimicrobianos, bem como entre diferentes enzimas, resultando em aumento da atividade antimicrobiana e redução da emergência de resistência (Vander Elst, 2026). Nesse contexto, a combinação da lisozima do BigMira com outros agentes antimicrobianos representa uma

estratégia promissora a ser explorada no controle de patógenos associados à mastite bovina, como *S. aureus*, *S. agalactiae* e *S. uberis*.

O biofilme bacteriano constitui um importante fator de virulência na mastite bovina, contribuindo para resistência a antimicrobianos, persistência da infecção e indução de respostas inflamatórias no hospedeiro (Costerton et al., 1999). Estudos sugerem associação entre a formação de biofilme e casos recorrentes ou crônicos de mastite bovina, embora evidências *in vivo* ainda sejam necessárias para confirmação dessa relação (Pedersen et al., 2021). Nesse sentido, a redução da formação de biofilme observada nos ensaios com a lisozima do BigMira indica seu potencial de interferência nessas estruturas produzidas pelos patógenos avaliados.

A atividade antibiofilme de enzimas líticas fágicas já foi descrita na literatura (Łusiak-Szelachowska et al., 2020; Taati Moghadam et al., 2025). No presente estudo, a lisozima derivada do fago de *P. mirabilis* foi capaz de inibir a formação de biofilme em *S. agalactiae*, indicando potencial de biocontrole *in vitro*. Entretanto, esse efeito não foi acompanhado por redução significativa do crescimento bacteriano, sugerindo que a ação antibiofilme pode estar relacionada à interferência em etapas iniciais de adesão e maturação do biofilme, e não necessariamente à atividade bactericida direta.

Quando os isolados de *S. aureus* foram tratados com a mesma concentração enzimática utilizada nos testes com as demais espécies, o efeito na prevenção da formação do biofilme foi inferior ao observado para *S. agalactiae*. Sugere-se que essa menor eficácia esteja relacionada às distinções nos mecanismos iniciais de adesão e formação de biofilme entre as duas espécies, enquanto *S. aureus* utiliza predominantemente polissacarídeos de adesão celular (PIA/PNAG), *S. agalactiae* depende majoritariamente de *pili* e proteínas de superfície (Bonsaglia et al., 2023; Peng et al., 2022). Dessa forma, alterações precoces na parede celular de *S. agalactiae* podem comprometer de forma mais acentuada a ancoragem desses fatores proteicos de adesão, impactando a estruturação inicial do biofilme de maneira mais severa do que o observado em *S. aureus*. Entretanto, estudos mais aprofundados são necessários para estabelecer conclusões definitivas sobre esses efeitos.

Destaca-se que os efeitos observados foram obtidos na concentração de 10 µg/mL (aproximadamente 0,09 µM, considerando massa molecular de 111,4 kDa), indicando atividade em baixas concentrações de enzima. Estudos anteriores utilizaram concentrações superiores de proteínas recombinantes para obtenção de efeitos comparáveis (Guo et al., 2017; Vázquez et al., 2017). Esse resultado reforça o potencial biotecnológico da proteína como agente antibiofilme. A variação observada entre isolados sugere ainda que diferenças na composição

da matriz extracelular, na estrutura celular e na organização do biofilme podem influenciar a susceptibilidade à enzima.

Embora resíduos de imidazol provenientes da etapa de eluição possam interferir em processos de crescimento e formação de biofilme, apenas uma fração dos isolados apresentou efeito significativo quando exposta ao tampão de estocagem contendo 0,05 M de imidazol (Tolomeu; Fraga, 2023). Mesmo nesses casos, alguns isolados demonstraram efeito superior ao do tampão isoladamente, indicando que a atividade observada não pode ser atribuída exclusivamente ao imidazol. Ainda assim, experimentos futuros utilizando a proteína em tampões livres desse reagente seriam importantes para excluir completamente efeitos residuais.

De modo geral, os resultados deste estudo indicam que a proteína recombinante constitui uma enzima lítica derivada de bacteriófago com potencial promissor de atividade antibacteriana e antibiofilme contra patógenos associados à mastite bovina. A atividade observada em baixas concentrações, associada ao efeito sobre bactérias filogeneticamente distintas, reforça seu potencial para aplicações futuras como estratégia antimicrobiana alternativa ou complementar às abordagens convencionais.

7. CONCLUSÃO

As análises estruturais identificaram um domínio conservado de lisozima do tipo T4 na proteína do bacteriófago BigMira, além de resíduos potencialmente envolvidos na atividade catalítica, sugerindo conservação funcional em relação à gp5 do bacteriófago T4. Em contrapartida, a ausência de domínios conservados na despolimerase do BigMira e a presença de um domínio de chaperona autocatalítica na endossialidase ShigP1 contribuíram para explicar as dificuldades encontradas na caracterização experimental dessas proteínas.

Entre as três proteínas avaliadas, apenas a lisozima do BigMira teve sua expressão recombinante confirmada e pôde ser submetida aos ensaios funcionais. A enzima apresentou atividade antibacteriana contra 6 dos 54 isolados testados e reduziu significativamente a formação de biofilme em 12 dos 28 isolados com capacidade de produção de biofilme, mesmo na concentração de 10 µg/mL (aproximadamente 0,09 µM). Esses resultados demonstram que a lisozima do BigMira pode apresentar atividade contra bactérias filogeneticamente distintas de seu hospedeiro original, ampliando as perspectivas de utilização dessa enzima como ferramenta antimicrobiana.

Entretanto, não foi possível distinguir os efeitos da lisozima e do tampão de armazenamento nos ensaios de curva de crescimento com os isolados de *S. aureus*, sendo necessária a dessalinização da proteína para remoção dos resíduos de imidazol e a repetição desses experimentos para confirmar sua atividade antibacteriana. Da mesma forma, a expressão funcional da endossialidase ShigP1 e da despolimerase do BigMira não pôde ser confirmada, impossibilitando a avaliação de suas atividades biológicas. Apesar disso, os resultados obtidos forneceram evidências de uma possível autoclivagem mediada por um domínio de chaperona na endossialidase e de elevada estabilidade da despolimerase frente a diferentes condições de desnaturação, fornecendo informações relevantes para orientar estudos futuros.

Em conjunto, os resultados obtidos identificam a lisozima do bacteriófago BigMira como uma candidata promissora para aplicações no controle da mastite bovina, em função de sua atividade antibacteriana e da capacidade de reduzir a formação de biofilme. Além disso, este trabalho estabeleceu informações estruturais e experimentais relevantes para a continuidade da caracterização da endossialidase ShigP1 e da despolimerase do BigMira, contribuindo para o avanço do conhecimento sobre enzimas derivadas de bacteriófagos e seu potencial biotecnológico.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, Raúl A.; DEGO, Oudessa K.; HEADRICK, Susan I.; LEWIS, Mark J.; OLIVER, Stephen P. Role of *Streptococcus uberis* adhesion molecule in the pathogenesis of *Streptococcus uberis* mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 179, n. 3-4, p. 332-335, set. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.07.005>. Acesso em: 19 abr. 2025.
- ALVES, Taila S.; ROSA, Vinícius S.; LEITE, Domingos S.; GUERRA, Simony T.; JOAQUIM, Sâmea F.; GUIMARÃES, Felipe F.; PANTOJA, José C. F.; LUCHEIS, Simoni B.; RALL, Vera L. M.; HERNANDES, Rodrigo T.; LANGONI, Helio; RIBEIRO, Márcio G. Genome-Based Characterization of Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Isolated from Clinical Bovine Mastitis. **Current Microbiology**, v. 80, n. 89, fev. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00284-023-03191-6>. Acesso em: 04 abr. 2026.
- ANGELOPOULOU, Angeliki; WARDA, Alicja K. HILL, Colin; ROSS, Paul. Non-antibiotic microbial solutions for bovine mastitis – live biotherapeutics, bacteriophage, and phage lysins. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 45, n. 5-6, p. 564-580, ago. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/1040841X.2019.1648381>. Acesso em: 23 abr. 2026.
- ASHRAF, Aqeela; IMRAN, Muhammad. Causes, types, etiological agents, prevalence, diagnosis, treatment, prevention, effects on human health and future aspects of bovine mastitis. **Animal Health Research Reviews**, v. 21, n. 1, p. 36-49, jun. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S1466252319000094>. Acesso em: 14 mar. 2026.
- ASLANTAŞ, Özkan; DEMIR, Cemil. Investigation of the antibiotic resistance and biofilm-forming ability of *Staphylococcus aureus* from subclinical bovine mastitis cases. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 11, p. 8607-8613, nov. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11310>. Acesso em: 21 abr. 2026.
- BARHEMA, H. W.; SCHUKKEN, Y. H.; ZADOCKS, R. N. Invited Review: The Role of Cow, Pathogen, and Treatment Regimen in the Therapeutic Success of Bovine *Staphylococcus aureus* Mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 6, p. 1877-1895, jun. 2006. Disponível em: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72256-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72256-1). Acesso em: 07 abr. 2026.

BAASE, Walter A.; LIU, Lijun; TRONRUD, Dale E.; MATTHEWS, Brian W. Lessons from the lysozyme of phage T4. **Protein Science**, v. 19, n. 4, p. 631-641, mar. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/pro.344>. Acesso em: 28 jun. 2026.

BOCANOVA, Lucia; PSENKO, Michal; BARÁK, Imrich; HALGASOVA, Nora; DRAHOVSKA, Hana; BUKOVSKA, Gabriela. A novel phage-encoded endolysin EN534-C active against clinical strain *Streptococcus agalactiae* GBS. **Journal of Biotechnology**, v. 359, p. 48–58, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2022.09.016>. Acesso em: 20 jun. 2026.

BONSAGLIA, Erika C. R.; ROSSI, Rodolfo S.; LATOSINSKI, Giulia; ROSSI, Bruna F.; CAMPOS, Fernanda C.; JUNIOR, Ary F.; PANTOJA, José C. F.; RALL, Vera L. M. Relationship between Biofilm Production and High Somatic Cell Count in *Streptococcus agalactiae* Isolated from Milk of Cows with Subclinical Mastitis. **Pathogens**, v. 12, n. 2, fev. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pathogens12020311>. Acesso em: 17 jul. 2026.

BROENDUM, Sebastian S.; CUCKLE, Ashley M.; MCGOWAN. Catalytic diversity and cell wall binding repeats in the phage-encoded endolysins. **Molecular Microbiology**, v. 110, n. 6, p. 879-896, set. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/mmi.14134>. Acesso em: 28 jun. 2026.

BLUM, Shlomo B.; HELLER, Elimelech D.; LEITNER, Gabriel. Long term effects of *Escherichia coli* mastitis. **The Veterinary Journal**, v. 201, n. 1, p. 72-77, jul. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.04.008>. Acesso em: 03 abr. 2026.

CARVALHO-CASTRO, Gleí A.; SILVA, Juliana R.; PAIVA, Luciano V.; CUSTÓDIO, Dircéia A. C.; MOREIRA, Rafael O.; MIAN, Glaucia F.; PRADO, Ingrid A.; CHALFUN-JUNIOR, Antônio; COSTA, Geraldo M. Molecular epidemiology of *Streptococcus agalactiae* isolated from mastitis in Brazilian dairy herds. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 551-559, fev. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.02.004>. Acesso em: 11 abr. 2026.

CILeite - Embrapa; IBGE (Pesquisa Pecuária Municipal). **Leite em números: Produção de leite no Brasil**. Disponível em: <https://www.cileite.com.br/content/leite-numeros>. Acesso em: 29 mar. 2026.

CHENG, Wei N.; HAN, Sung G. Bovine mastitis: risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments — A review. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences (AJAS)**, v. 33, n. 11, p. 1699-1713, mai. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.5713/ajas.20.0156>. Acesso em: 14 mar. 2026.

COBIRKA, Maros; TANCIN, Vladimir; SLAMA, Petr. Epidemiology and Classification of Mastitis. **Animals**, v. 10, n. 12, nov. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ani10122212>. Acesso em: 14 mar. 2026.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318-1322, mai. 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318>. Acesso em: 28 jun. 2026.

CÔRREA, Diego C.; NUNES, Gabriela T.; BARCELOS, Roberto A. D.; SANTOS, Jamilly R.; VOGEL, Fernanda S. F.; CARGNELUTTI, Juliana F. Economic losses caused by mastitis and the influence of climate variation on the occurrence of the disease in a dairy cattle farm in southern Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 56, fev. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11250-024-03914-2>. Acesso em: 15 mar. 2026.

CÔTÉ-GRAVE, Julie; MALOUIN, François. Symposium review: Features of *Staphylococcus aureus* mastitis pathogenesis that guide vaccine development strategies. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 5, p. 4727-4740, mai. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15272>. Acesso em: 04 abr. 2026.

CUCARELLA, Carme; TORMO, M. A.; ÚBEDA, Carles; TROTONDA, M. P.; MONZÓN, Marta; PERIS, Critòfol; AMORENA, Beatriz; LASA, Íñigo; PENADÉS, José R. Role of Biofilm-Associated Protein Bap in the Pathogenesis of Bovine *Staphylococcus aureus*. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 4, p. 2177-2185, abr. 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/iai.72.4.2177-2185.2004>. Acesso em: 07 abr. 2026.

DA SILVA, Anderson C.; RODRIGUES, Marjory X.; SILVA, Nathália C. C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in food and the prevalence in Brazil: a review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 51, p. 347-356, out. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00168-1>. Acesso em: 10 abr. 2026.

DOGAN, Belgin; KLAESSIG, S.; RISHNIW, M.; ALMEIDA, R. M.; OLIVER, S. P.; SIMPSON, K.; SCHUKKEN, Y. H. Adherent and invasive *Escherichia coli* are associated with persistent bovine mastitis. **Veterinary Microbiology**, v. 116, n. 4, p. 270-280, set. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.04.023>. Acesso em: 03 abr. 2026.

DUARTE, Ana C.; FERNÁNDEZ, Lucía; JURADO, Andrea; CAMPELO, Ana B.; SHEN, Yang; RODRÍGUEZ, Ana; GARCÍA, Pilar. Synergistic removal of *Staphylococcus aureus* biofilms by using a combination of phage *Kayvirus rodi* with the exopolysaccharide depolymerase Dpo7. **Frontiers in Microbiology**, v. 15, ago., 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1438022>. Acesso em: 26 abr. 2026.

FAN, Jindai; ZENG, Zhiliang; MAI, Kaijie; YANG, Yu; FENG, Jiaqi; BAI, Yang; SUN, Baoli; XIE, Qingmei; TONG, Yigang; MA, Jingyun. Preliminary treatment of bovine mastitis caused by *Staphylococcus aureus*, with trx-SA1, recombinant endolysin of *S. aureus* bacteriophage IME-SA1. **Veterinary Microbiology**, v. 191, p. 65-71, ago. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.06.001>. Acesso em: 02 mai. 2026.

FERNANDES, José B. C.; ZANARDO, Larissa G.; GALVÃO, Newton N.; CARVALHO, Isabel A.; NERO, Luis A.; MOREIRA, Maria A. S. *Escherichia coli* from clinical mastitis: serotypes and virulence factors. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 23, n. 6, p. 1146-1152, nov. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/1040638711425581>. Acesso em: 03 abr. 2026.

FERRABOSCHI, Patrizia; CICERI, Samuele; GRISENTI, Paride. Applications of Lysozyme, an Innate Immune Defense Factor, as an Alternative Antibiotic. **Antibiotics**, v. 10, n. 12, dez. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antibiotics10121534>. Acesso em: 02 mai. 2026.

FESSIA, Aluminé S.; ODIERNO, Liliana M. Potential factors involved in the early pathogenesis of *Streptococcus uberis* mastitis: a review. **Folia Microbiologica**, v. 66, p. 509-523, jun. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12223-021-00879-9>. Acesso em: 18 abr. 2026.

FIDELIS, Carlos E.; ORSI, Alessandra M.; FREU, Gustavo; GONÇALVES, Juliano L.; DOS SANTOS, Marcos V. Biofilm Formation and Antimicrobial Resistance of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus uberis* Isolates from Bovine Mastitis. **Veterinary Sciences**, v. 11, n. 4, abr. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/vetsci11040170>. Acesso em: 21 abr. 2026.

GASTEIGER, E.; HOOGLAND, C.; GATTIKER, A.; DUVAUD, S.; WILKINS, M. R.; APPEL, R. D.; BAIROCH, A. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: WALKER, J. M. (ed.). The Proteomics Protocols Handbook. Totowa: Humana Press, 2005. p. 571–607. Disponível em: <https://doi.org/10.1385/1-59259-890-0:571>. Acesso em: 20 jun. 2026.

GOMES, Fernanda; HENRIQUES, Marina. Control of Bovine Mastitis: Old and Recent Therapeutic Approaches. **Current Microbiology**, v. 72, dez. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0958-8>. Acesso em: 15 mar. 2026.

GOMES, Fernanda; SAAVEDRA, Maria J.; HENRIQUES, Marina. Bovine mastitis disease/pathogenicity: evidence of the potential role of microbial biofilms. **Pathogens and Disease**, v. 74, n. 3, abr. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/femspd/ftw006>. Acesso em: 15 mar. 2026.

GONÇALVES, J. L.; KAMPHUIS, C.; MARTINS, C. M. M. R.; BARREIRO, J. R.; TOMAZI, T.; GAMEIRO, A. H.; HOGEVEEN, H.; DOS SANTOS, M. V. Bovine subclinical mastitis reduces milk yield and economic return. **Livestock Science**, v. 210, abr. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2018.01.016>. Acesso em: 15 mar. 2026.

GOULART, Débora B.; MELLATA, Melha. *Escherichia coli* Mastitis in Dairy Cattle: Etiology, Diagnosis, and Treatment Challenges. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, jul. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.928346>. Acesso em: 03 abr. 2026.

GUIMARÃES, Juliana L. B.; BRITO, Maria A. V. P.; LANGE, Carla C.; SILVA, Márcio R.; RIBEIRO, João B.; MENDONÇA, Leticia C.; MENDONÇA, Juliana F. M.; SOUZA, Guilherme N. Estimate of the economic impact of mastitis: A case study in a Holstein dairy herd under tropical conditions. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 142, p. 46-50, jul. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2017.04.011>. Acesso em: 29 mar. 2026.

GUO, Mingquan; FENG, Chunyan; REN, Jie; ZHUANG, Xuran; ZHANG, Yan; ZHU, Yongzhang; DONG, Ke; HE, Ping; GUO, Xiaokui; QIN, Jinhong. A novel antimicrobial endolysin, LysPA26, against *Pseudomonas aeruginosa*. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, fev. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00293>. Acesso em: 28 jun. 2026.

GUTIÉRREZ, Diana; BRIERS, Yves; RODRÍGUEZ-RUBIO, Lorena; MARTÍNEZ, Beatriz; RODRIGUEZ, Ana; LAVIGNE, Rob; GARCÍA, Pilar. Role of the Pre-neck Appendage Protein (Dpo7) from Phage vB_SepiS-phiIPLA7 as an Anti-biofilm Agent in Staphylococcal Species. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, nov. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01315>. Acesso em: 26 abr. 2026.

GUTIÉRREZ, Diana; GARRIDO, Victoria; FERNÁNDEZ, Lucía; PORTILLA, Silvia; RODRÍGUEZ, Ana; GRILLÓ, María J.; GARCÍA, Pilar. Phage Lytic Protein LysRODI Prevents Staphylococcal Mastitis in Mice. **Front. Microbiol.**, v. 11, jan. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00007>. Acesso em: 28 mar. 2026.

HERNANDEZ, Luciana; BOTTINI, Enriqueta; CADONA, Jimena; CACCIATO, Claudio; MONTEAVARO, Cristina; BUSTAMANTE, Ana; SANSONO, Andrea M. Multidrug Resistance and Molecular Characterization of *Streptococcus agalactiae* Isolates From Dairy Cattle With Mastitis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, abr. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.647324>. Acesso em: 12 abr. 2026.

KABELITZ, Tina; AUBRY, Etienne; VORST, Kira V.; AMON, Thomas; FULDE, Marcus. The Role of *Streptococcus* spp. in Bovine Mastitis. **Microorganisms**, v. 9, n. 7, jul. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071497>. Acesso em: 11 abr. 2026.

KANAMARU, Shuji; LEIMAN, Petr G.; KOSTYUCHENKO, Victor A.; CHIPMAN, Paul R.; MESYANZHINOV, Vadim V.; ARISAKA, Fumio; ROSSMANN, Michael G. Structure of the cell-puncturing device of bacteriophage T4. **Nature**, v. 415, p. 553-557, jan. 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/415553a>. Acesso em: 28 jun. 2026.

KNECHT, Leandra E.; VELJKOVIC, Marjan; FIESELER, Lars. Diversity and Function of Phage Encoded Depolymerases. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, jan. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02949>. Acesso em: 28 jun. 2026.

KREWER, Carina C.; AMANSO, Evandro S.; GOUVEIA, Gisele V.; SOUZA, Renata L.; DA COSTA, Mateus M.; MOTA, Rinaldo A. Resistance to antimicrobials and biofilm formation in *Staphylococcus* spp. isolated from bovine mastitis in the Northeast of Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 47, dez. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11250-014-0752-9>. Acesso em: 10 abr. 2026.

LAJHAR, Salma A.; BROWNLIE, Jeremy; BARLOW, Robert. Characterization of biofilm-forming capacity and resistance to sanitizers of a range of *E. coli* O26 pathotypes from clinical cases and cattle in Australia. **BMC Microbiology**, v. 18, p. 41, mai. 2018. Acesso em: 6 ago. 2026. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1182-z>.

L AKEW, Biniam; FAYERA, Taresa; ALI, Yimer M. Risk factors for bovine mastitis with the isolation and identification of *Streptococcus agalactiae* from farms in and around Haramaya district, eastern Ethiopia. **Tropical Animal Health and Production**, v. 51, p. 1507-1513, fev. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11250-019-01838-w>. Acesso em: 11 abr. 2026.

LAPONTE, Rosa; PAGNINI, Ugo; IOVANE, Giuseppe; PISANELLI, Giuseppe. Phage Therapy in Veterinary Medicine. **Antibiotics**, v. 10, n. 4, abr. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antibiotics10040421>. Acesso em: 23 abr. 2026.

LEGGATE, Daniel R.; BRYANT, J. Mark; REDPATH, Maria B.; HEAD, Denise; TAYLOR, Peter W.; LUZIO, J. Paul. Expression, mutagenesis and kinetic analysis of recombinant K1E endosialidase to define the site of proteolytic processing and requirements for catalysis. **Molecular Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 749-760, mai. 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02908.x>. Acesso em: 27 jun. 2026.

LI, Longping; ZHANG, Zhiying. Isolation and characterization of a virulent bacteriophage SPW specific for *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis of lactating dairy cattle. **Molecular Biology Reports**, v. 41, p. 5829–5838, jul., 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11033-014-3457-2>. Acesso em: 28 mar. 2026.

LI, Min; WANG, Hui; CHEN, Long; GUO, Genglin; LI, Pei; MA, Jiale; CHEN, Rong; DU, Hong; LIU, Yuqing; ZHANG, Wei. Identification of a phage-derived depolymerase specific for KL47 capsule of *Klebsiella pneumoniae* and its therapeutic potential in mice. **Virologica Sinica**, v. 37, n. 4, p. 538-546, ago. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.virs.2022.04.005>. Acesso em: 26 abr. 2026.

LI, Pei; GUO, Genglin; ZHENG, Xiangkuan; XU, Sixiang; ZHOU, Yu; QIN, Xiayan; HU, Zimeng; YU, Yanfei; TAN, Zhongming; MA, Jiale; CHEN, Long; ZHANG, Whei. Therapeutic efficacy of a K5-specific phage and depolymerase against *Klebsiella pneumoniae* in a mouse model of infection. **Veterinary Research**, v. 55, n. 59, mai., 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13567-024-01311-z>. Acesso em: 26 abr. 2026.

LI, Tianming; LU, Huiying; WANG, Xing; GAO, Qianqian; DAI, Yingxin; SHANG, Jun; LI, Min. Molecular Characteristics of *Staphylococcus aureus* Causing Bovine Mastitis between 2014 and 2015. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, abr. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00127>. Acesso em: 07 abr. 2026.

LIU, Ho Y.; PRENTICE, Emma L.; WEBBER, Mark A. Mechanisms of antimicrobial resistance in biofilms. **npj Antimicrobials and Resistance**, v. 2, n. 27, out. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s44259-024-00046-3>. Acesso em: 21 abr. 2026.

LU, Han; LI, Zong; ELBAZ, Amro; NI, Shou-Qing. Synergistic action of phages and lytic proteins with antibiotics: a combination strategy to target bacteria and biofilms. **BMC Microbiology**, v. 23, n. 149, mai. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12866-023-02881-2>. Acesso em: 02 mai. 2026.

ŁUSIAK-SZELACHOWSKA, M.; WEBER-DĄBROWSKA, B.; GÓRSKI, A. Bacteriophages and lysins in biofilm control. **Virologica Sinica**, v. 35, n. 2, p. 125-133, abr. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12250-019-00192-3>. Acesso em: 28 jun. 2026

MARTINS, Larissa; GONÇALVES, Juliano L.; LEITE, Renata F.; TOMAZI, Tiago; RALL, Vera L. M.; SANTOS, Marcos V. Association between antimicrobial use and antimicrobial resistance of *Streptococcus uberis* causing clinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 11, p. 12030-12041, nov. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20177>. Acesso em: 19 abr. 2026.

MELCHIOR, M. B.; VAARKAMP H.; FINK-GREMMELS, J. Biofilms: A role in recurrent mastitis infections?. **The Veterinary Journal**, v. 171, n. 3, p. 398-407, mai. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2005.01.006>. Acesso em: 15 mar. 2026.

MENDOZA-ROJAS, Gabriel; SARABIA-VEGA, Vanessa; SANCHEZ-CASTRO, Ana; TELLO, Lesia; CABRERA-SOSA, Luis; NAKAMOTO, Jose A.; PEÑARANDA, Katherin; ADAUI, Vanessa; ALCÁNTARA, Roberto; MILÓN, Pohl. A low-cost and open-source protocol to produce key enzymes for molecular detection assays. **STAR Protocols**, v. 2, n. 4, p. 100899, dez. 2021. Acesso em: 06 ago. 2026. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2021.100899>.

NAKONIECZNA, Aleksandra; TOPOLSKA-WOŚ, Agnieszka; ŁOBOCKA, Małgorzata. New bacteriophage-derived lysins, LysJ and LysF, with the potential to control *Bacillus anthracis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 108, n. 76, jan. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12839-z>. Acesso em: 28 jun. 2026.

NALE, Janet Y; MCEWAN, Neil R. Bacteriophage Therapy to Control Bovine Mastitis: A Review. **Antibiotics**, v. 12, n. 8, p. 1307, ago. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antibiotics12081307>. Acesso em: 28 mar. 2026.

NELSON, Daniel C.; SCHMELCHER, Mathias; RODRIGUEZ-RUBIO, Lorena; KLUMPP, Jochen; PRITCHARD, David G.; DONG, Shengli; DONOVAN, David M. Endolysins as antimicrobials. In: ADAMS, H. T.; LAVIGNE, Rob (ed.). *Advances in Virus Research*. San Diego: Academic Press, v. 83, p. 299-365, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394438-2.00007-4>. Acesso em: 28 jun. 2026.

OLIVEIRA, Carla; DOMINGUES, Lucília. Guidelines to reach high-quality purified recombinant proteins. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, p. 81-92, nov. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8623-8>. Acesso em: 27 jun. 2026.

OLIVEIRA, Raylson P.; ARAGÃO, Breno B.; MELO, Renata P. B.; SILVA, Débora M. S.; CARVALHO, Rafaella G.; JULIANO, Maria A.; FARIA, Márcia P. O.; NIRA, Nair S. C.; MOTA, Rinaldo A. Bovine mastitis in northeastern Brazil: Occurrence of emergent bacteria and their phenotypic and genotypic profile of antimicrobial resistance. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 85, jun. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2022.101802>. Acesso em: 12 abr. 2026.

ORSI, Henrique; GUIMARÃES, Felipe F.; LEITE, Domingos S.; GUERRA, Simony T.; JOAQUIM, Sâmea F.; PANTOJA, José C. F.; HERNANDES, Rodrigo T.; LUCHEIS, Simone B.; RIBEIRO, Márcio G.; LANGONI, Helio; RALL, Vera L. M. Characterization of mammary pathogenic *Escherichia coli* reveals the diversity of *Escherichia coli* isolates associated with bovine clinical mastitis in Brazil. **Journal of Dairy Science**, v. 106, n. 2, p. 1403-1413, fev. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22126>. Acesso em: 04 abr. 2026.

PANG, Maoda; SUN, Lichang; HE, Tao; BAO, Hongdu; ZHANG, Lili; ZHOU, Yan; ZHANG, Hui; WEI, Ruicheng; LIU, Yongjie; WANG, Ran. Molecular and virulence characterization of highly prevalent *Streptococcus agalactiae* circulated in bovine dairy herds. **Veterinary Research**, v. 48, n. 65, out. 2017. Disponível: <https://doi.org/10.1186/s13567-017-0461-2>. Acesso em: 15 abr. 2026.

PEDERSEN, Regitze R.; KRÖMKER, Volker; BJARNSHOLT, Thomas; DAHL-PEDERSEN, Kirstin; BUHL, Rikke; JØRGENSEN, Elin. Biofilm Research in Bovine Mastitis. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, mai. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.656810>. Acesso em: 20 abr. 2026.

PENG, Qi; TANG, Xiaohua; DONG, Wanyang; SUN, Ning; YUAN, Wenchang. A Review of Biofilm Formation of *Staphylococcus aureus* and Its Regulation Mechanism. **Antibiotics**, v. 12, n. 1, dez. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antibiotics12010012>. Acesso em: 17 jul. 2026.

PÉREZ, Verónica K. C.; DA COSTA, Geraldo M.; GUIMARÃES, Alessandro S.; HEINEMANN, Marcos B.; LAGE, Andrey P.; DORNELES, Elaine M. S. Relationship between virulence factors and antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 22, p. 792-802, set. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.06.010>. Acesso em: 31 mar. 2026.

PÉREZ, Verónica K. C.; CUSTÓDIO, Dircéia A. C.; SILVA, Eduarda M. M.; OLIVEIRA, Julia; GUIMARÃES, Alessandro S.; BRITO, Maria A. V. P.; FILHO, Antônio F. S.; HEINEMANN, Marcos B.; LAGE, Andrey P.; DORNELES, Elaine M. S. Virulence factors and antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 51, ago. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00363-5>. Acesso em: 31 mar. 2026.

PETERS, Danielle L.; GAUDREAU, Francis; CHEN, Wangxue. Functional domains of *Acinetobacter* bacteriophage tail fibers. **Frontiers in Microbiology**, v. 15, abr. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1230997>. Acesso em: 27 jun. 2026.

PIRES, Diana P.; OLIVEIRA, Hugo; MELO, Luís D. R.; SILLANKORVA, Sanna; AZEREDO, Joana. Bacteriophage-encoded depolymerases: their diversity and biotechnological applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, p. 2141-2151, jan. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7247-0>. Acesso em: 26 abr. 2026.

RAINARD, P.; FOUCRAS, G.; FITZGERALD, J. R.; WATTS, J. L.; KOOP, G.; MIDDLETON, J. R. Knowledge gaps and research priorities in *Staphylococcus aureus* mastitis control. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 65, p. 149-165, out. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/tbed.12698>. Acesso em: 04 abr. 2026.

RODRIGUES, Romário A.; PIZAURO, Lucas J. L.; VARANI, Alessandro M.; ALMEIDA, Camila C.; SILVA, Saura R.; CARDOZO, Marita V.; MACLNNES, Janet I.; KROPINSKI, Andrew M.; MELO, Poliana C.; ÁVILA, Fernando A. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, nov. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1033675>. Acesso em: 10 abr. 2026.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3. ed. v. 1. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SCHMELCHER, Mathias; KOROBOVA, Olga; SCHISCHKOVA, Nina; KISELEVA, Natalia; KOPYLOV, Paul; PRYAMCHUK, Sergey; DONOVAN, David M.; ABAEV, Igor. *Staphylococcus haemolyticus* prophage Φ SH2 endolysin relies on cysteine, histidine-dependent amidohydrolases/peptidases activity for lysis ‘from without’. **Journal of Biotechnology**, v. 162, n. 2-3, p. 289-298, dez. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.09.010>. Acesso em: 28 jun. 2026.

SCHMELCHER, Mathias; POWELL, Anne M.; CAMP, Mary J.; POHL, Calvin S.; DONOVAN, David M. Synergistic streptococcal phage λ SA2 and B30 endolysins kill streptococci in cow milk and in a mouse model of mastitis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, p. 8475-8486, abr. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6579-0>. Acesso em: 28 jun. 2026.

SHARUN, Khan; DHAMA, Kuldeep; TIWARI, Ruchi; GUGJOO, Mudassir Bashir; YATOO, Mohd. Iqbal; PATEL, Shailesh Kumar; PATHAK, Mamta; KARTHIK, Kumaragurubaran; KHURANA, Sandip Kumar; SINGH, Rahul; PUVVALA, Bhavani; AMARPAL; SINGH, Rajendra; SINGH, Karam Pal; CHAICUMPA, Wanpen. Advances in therapeutic and management approaches of bovine mastitis: a comprehensive review. **Veterinary Quarterly**, v. 41, n. 1, p. 107-136, fev. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/01652176.2021.1882713>. Acesso em: 15 mar. 2026.

SILVA, Amanda T. F.; DA SILVA, José G.; ARAGÃO, Breno B.; PEIXOTO, Rodolfo M.; MOTA, Rinaldo A. Occurrence of β -lactam-resistant *Staphylococcus aureus* in milk from primiparous dairy cows in the northeastern region of Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 52, p. 2303-2307, mar. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11250-020-02259-w>. Acesso em: 10 abr. 2026.

SILVA, Jéssica Duarte; BENS, Lene; SANTOS, Adriele J. C.; LAVIGNE, Rob; SOARES, José; MELO, Luís D. R.; VALLINO, Marta; DIAS, Roberto S.; DRULIS-KAWA, Zuzanna; PAULA, Sérgio O.; WAGEMANS, Jeroen. Isolation and Characterization of the *Acadevirus* Members BigMira and MidiMira Infecting a Highly Pathogenic *Proteus mirabilis* Strain. *Microorganisms*, v. 11, n. 9, set. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11092141>. Acesso em: 28 jun. 2026.

SILVA, Nathália C.; YANG, Yongqiang; RODRIGUES, Marjory X.; TOMAZI, Tiago; BICALHO, Rodrigo C. Whole-genome sequencing reveals high genetic diversity of *Streptococcus uberis* isolated from cows with mastitis. **BMC Veterinary Research**, v. 17, n. 321, out. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12917-021-03031-4>. Acesso em: 19 abr. 2026.

TAATI MOGHADAM, M.; MOHEBI, S.; SHEIKHI, R.; HASANNEJAD-BIBALAN, M.; SHAHBAZI, S.; NEMATI, S. Phage and endolysin therapy against antibiotics resistant bacteria: from bench to bedside. **MedComm**, v. 6, n. 7, art. e70280, jul. 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mco2.70280>. Acesso em: 28 jun. 2026.

TAPONEN, Suvi; PYÖRÄLÄ, Satu. Coagulase-negative staphylococci as cause of bovine mastitis—Not so different from *Staphylococcus aureus*?. **Veterinary Microbiology**, v. 134, n. 1-2, p. 29-36, fev. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.011>. Acesso em: 07 abr. 2026.

TASSI, Riccardo; MCNEILLY, Tom N.; SIPKA, Anja; ZADOKS, Ruth N. Correlation of hypothetical virulence traits of two *Streptococcus uberis* strains with the clinical manifestation of bovine mastitis. **Veterinary Research**, v. 46, n. 146, out. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13567-015-0268-y>. Acesso em: 19 abr. 2026.

THOMPSON-CRISPI, Kathleen; ATALLA, Heba; MIGLIOR, Filippo; MALLARD, Bonnie A. Bovine Mastitis: Frontiers in Immunogenetics. **Front. Immunol.**, v. 5, out., 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00493>. Acesso em: 31 mar. 2026.

TOLOMEU, Heber V.; FRAGA, Carlos A. M. Imidazole: synthesis, functionalization and physicochemical properties of a privileged structure in medicinal chemistry. **Molecules**, v. 28, n. 2, jan. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules28020838>. Acesso em: 28 jun. 2026.

TOMAZI, Tiago; FILHO, Antonio F. S.; HEINEMANN, Marcos B.; SANTOS, Marcos V. Molecular characterization and antimicrobial susceptibility pattern of *Streptococcus agalactiae* isolated from clinical mastitis in dairy cattle. **PLoS ONE**, v. 13, jun. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199561>. Acesso em: 12 abr. 2026.

TOPKA-BIELECKA, Gracja; DYDECKA, Aleksandra; NECEL, Agnieszka; BLOCH, Sylwia; NEJMAN-FALEŃCZYK, Bożena; WĘGRZYN, Grzegorz; WĘGRZYN, Alicja. Bacteriophage-Derived Depolymerases against Bacterial Biofilm. **Antibiotics**, v. 10, n. 2, fev. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antibiotics10020175>. Acesso em: 26 abr. 2026.

TOUAITIA, Rahima; IBRAHIM, Nasir A.; TOUATI, Abdelaziz; IDRES, Takfarinas. *Staphylococcus aureus* in Bovine Mastitis: A Narrative Review of Prevalence, Antimicrobial Resistance, and Advances in Detection Strategies. **Antibiotics**, v. 14, n. 8, ago. 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antibiotics14080810>. Acesso em: 05 abr. 2026.

VANDER ELST, Elst. Bacteriophage-derived endolysins as innovative antimicrobials against bovine mastitis-causing streptococci and staphylococci: a state-of-the-art review. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 66, n. 20, mai. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13028-024-00740-2>. Acesso em: 28 jun. 2026.

VANDER ELST, N. Clinical implementation of endolysins targeting gram-positive bacteria points toward a combination strategy with standard-of-care antibiotics: a selective review. **European Journal of Medical Research**, v. 31, n. 152, 2026. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40001-025-03655-4>. Acesso em: 28 jun. 2026

VÁZQUEZ, Roberto; DOMENECH, Mirian; IGLESIAS-BEXIGA, Manuel; MENÉNDEZ, Margarita; GARCÍA, Pedro. Csl2, a novel chimeric bacteriophage lysin to fight infections caused by *Streptococcus suis*, an emerging zoonotic pathogen. **Scientific Reports**, v. 7, n. 16506, nov. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16736-0>. Acesso em: 28 jun. 2026.

VEZINA, Ben; AL-HARBI, Hulayyil; RAMAY, Hena R.; SOUST, Martin; MOORE, Robert J.; OLCOWY, Timothy W. J.; ALAWNEH, John I. Sequence characterisation and novel insights into bovine mastitis-associated *Streptococcus uberis* in dairy herds. **Scientific Reports**, v. 11, n. 3046, fev. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82357-3>. Acesso em: 18 abr. 2026.

WANG, Honglan; LIU, Yannan; BAI, Changqing; LEUNG, Sharon S. Y. Translating bacteriophage-derived depolymerases into antibacterial therapeutics: Challenges and prospects. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 14, n. 1, p. 155-169, jan. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2023.08.017>. Acesso em: 28 jun. 2026.

WARD, Philip N.; HOLDEN, Matthew; LEIGH, James A.; LENNARD, Nicola; BIGNELL, Alexandra; BARRON, Andy; CLARK, Louise; QUAIL, Michael A.; WOODWARD, John; BARREL, Bart G.; EGAN, Sharon A.; FIELD, Terence R.; MASKELL, Duncan; KEHOE, Michael; DOWSON, Christopher; CHANTER, Neil; WHATMORE, Adrian M.; BENTLEY, Stephen D.; PARKHILL, Julian. Evidence for niche adaptation in the genome of the bovine pathogen *Streptococcus uberis*. **BMC Genomics**, v. 10, n. 54, jan. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-54>. Acesso em: 17 abr. 2026.

WATARADEE, Sirirat; BOONSERM, Thanasak; SAMNGAMNIM, Sukuma; AJARIYAKHAJORN, Kittisak. Characterization of Virulence Factors and Antimicrobial Susceptibility of *Streptococcus agalactiae* Associated with Bovine Mastitis Cases in Thailand. **Animals**, v. 14, n. 3, jan. 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ani14030447>. Acesso em: 11 abr. 2026.

YIN, Yin; WANG, Xinwei; MOU, Zehua; REN, Huiying; ZHANG, Can; ZOU, Ling; LIU, Huanqi; LIU, Wenhua; LIU, Zongzhu. Characterization and genome analysis of *Pseudomonas aeruginosa* phage vB_PaeP_Lx18 and the antibacterial activity of its lysozyme. **Archives of Virology**, v. 167, p. 1807-1817, jun. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00705-022-05472-0>. Acesso em: 02 mai. 2026.

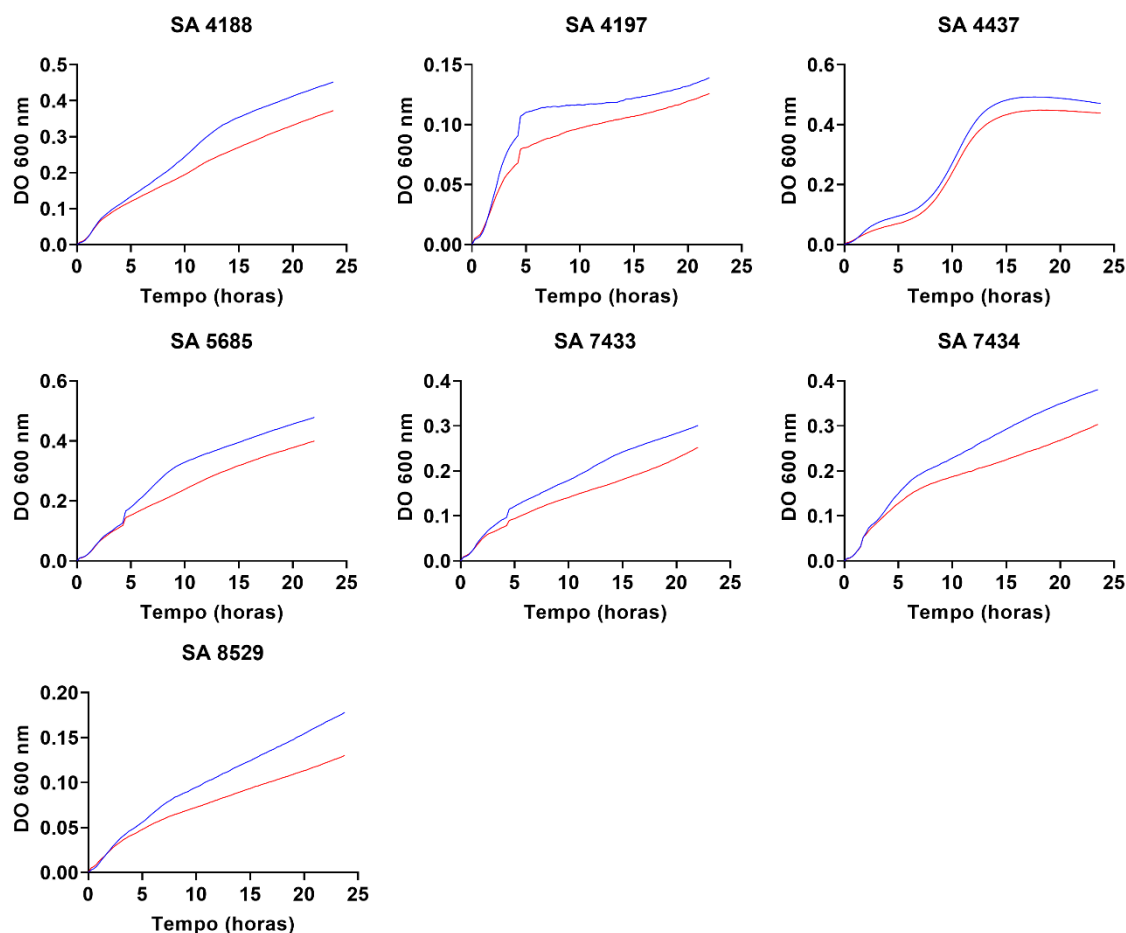
ZADOKS, Ruth N.; MIDDLETON, John R.; MCDOUGALL, Scott; KATHOLM, Jorgen; SCHUKKEN, Ynte H. Molecular Epidemiology of Mastitis Pathogens of Dairy Cattle and Comparative Relevance to Humans. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 16, p. 357-372, out. 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10911-011-9236-y>. Acesso em: 03 abr. 2026.

ZAO, Ailing; SUN, Jiazheng; LIU, Yipin. Understanding bacterial biofilms: From definition to treatment strategies. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 13, abr. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1137947>. Acesso em: 20 abr. 2026.

ZASTEMPOWSKA, Ewa; TWARUŻEK, Magdalena; GRAJEWSKI, Jan; LASSA, Henryka. Virulence Factor Genes and Cytotoxicity of *Streptococcus agalactiae* Isolated from Bovine Mastitis in Poland. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 3, mai., 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/spectrum.02224-21>. Acesso em: 11 abr. 2026.

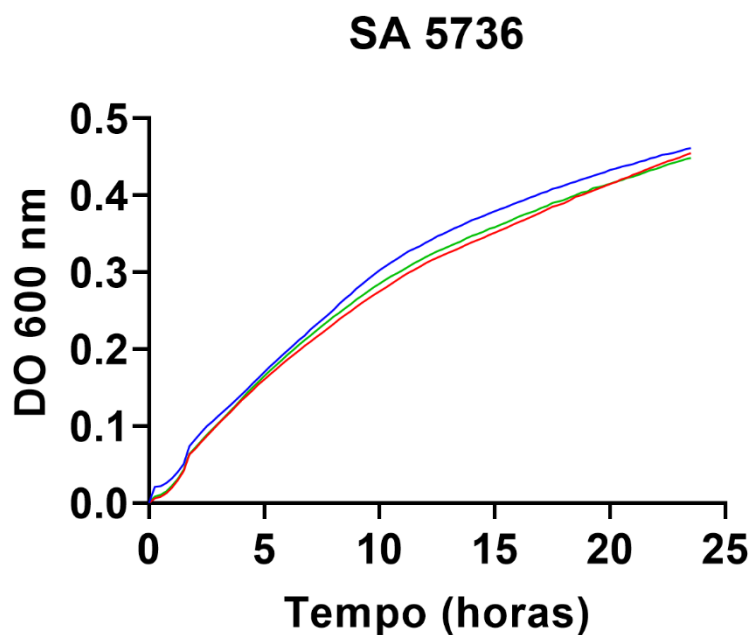
ZHOU, Yan; ZHANG, Hui; BAO, Hongduo; WANG, Xiaomeng; WANG, Ran. The lytic activity of recombinant phage lysin LysK Δ amidase against staphylococcal strains associated with bovine and human infections in the Jiangsu province of China. **Research in Veterinary Science**, v. 111, p. 113-119, abr. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.02.011>. Acesso em: 02 mai. 2026.

Apêndice A - Curvas de crescimento dos isolados de *S. aureus* tratados com tampão Tris-NaCl contendo 0,05 M de imidazol. As linhas azuis representam os isolados não tratados (controle) e as linhas vermelhas representam os isolados tratados com o tampão. Os dados correspondem à densidade óptica (DO 600 nm) monitorada durante 24 h. As diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste *t* de Student.



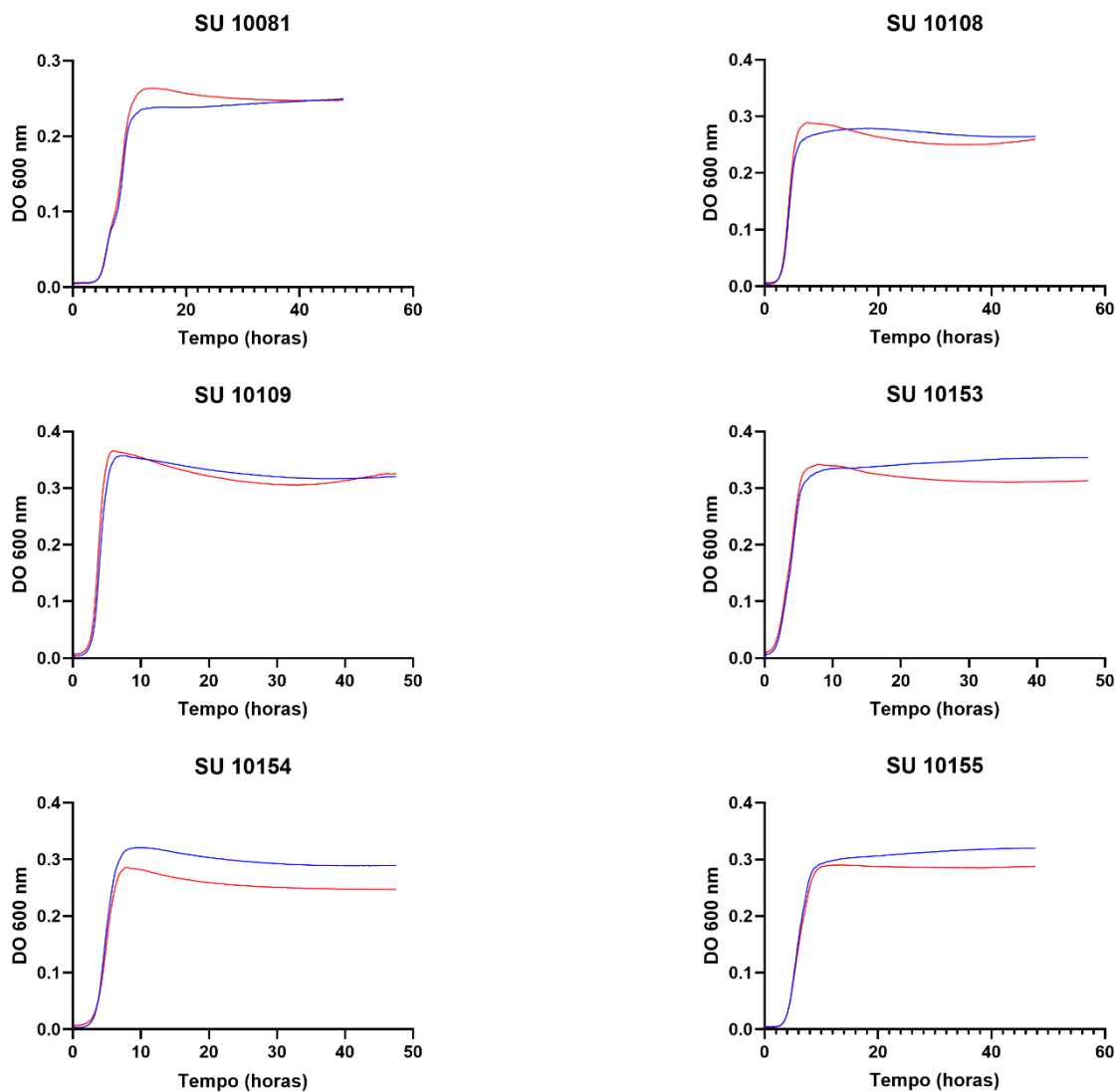
Fonte: Autoria própria.

Apêndice B - Curvas de crescimento do isolado *S. aureus* SA 5736 tratado com diferentes concentrações da lisozima de BigMira. A linha azul representa o controle não tratado; a linha vermelha, o tratamento com 30 µg/mL; a linha verde, o tratamento com 50 µg/mL. Os dados correspondem a médias das triplicatas biológicas à densidade óptica (OD 600 nm) monitorada durante 24 h. As diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste *t* de Student.



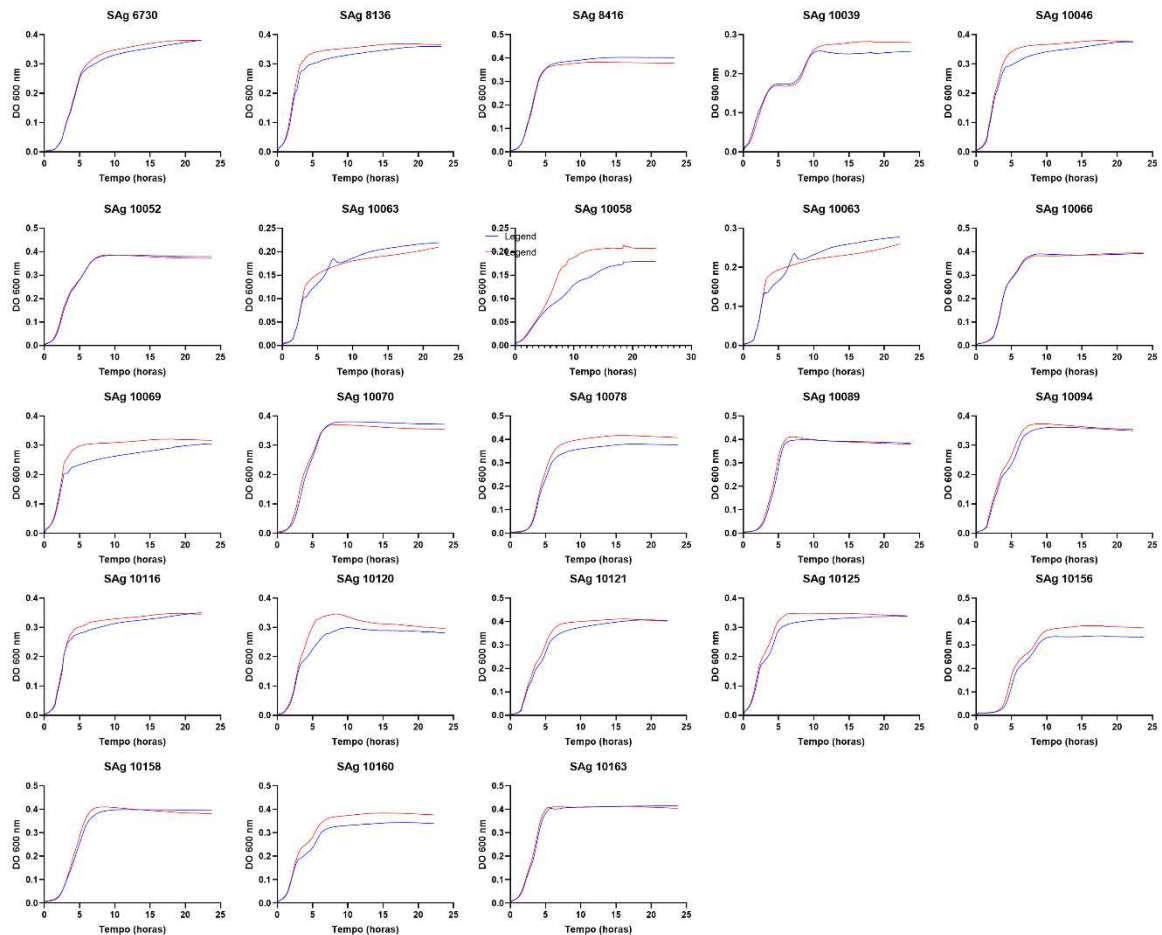
Fonte: Autoria própria.

Apêndice C – Curvas de crescimento dos isolados de *S. uberis* responsivos à enzima recombinante tratados com tampão Tris-NaCl (0,05 M de imidazol). Cada gráfico representa um isolado e apresenta as médias das triplicatas biológicas do controle não tratado (azul) e do tratamento com o tampão (vermelho). A significância estatística foi considerada para $p < 0,05$.



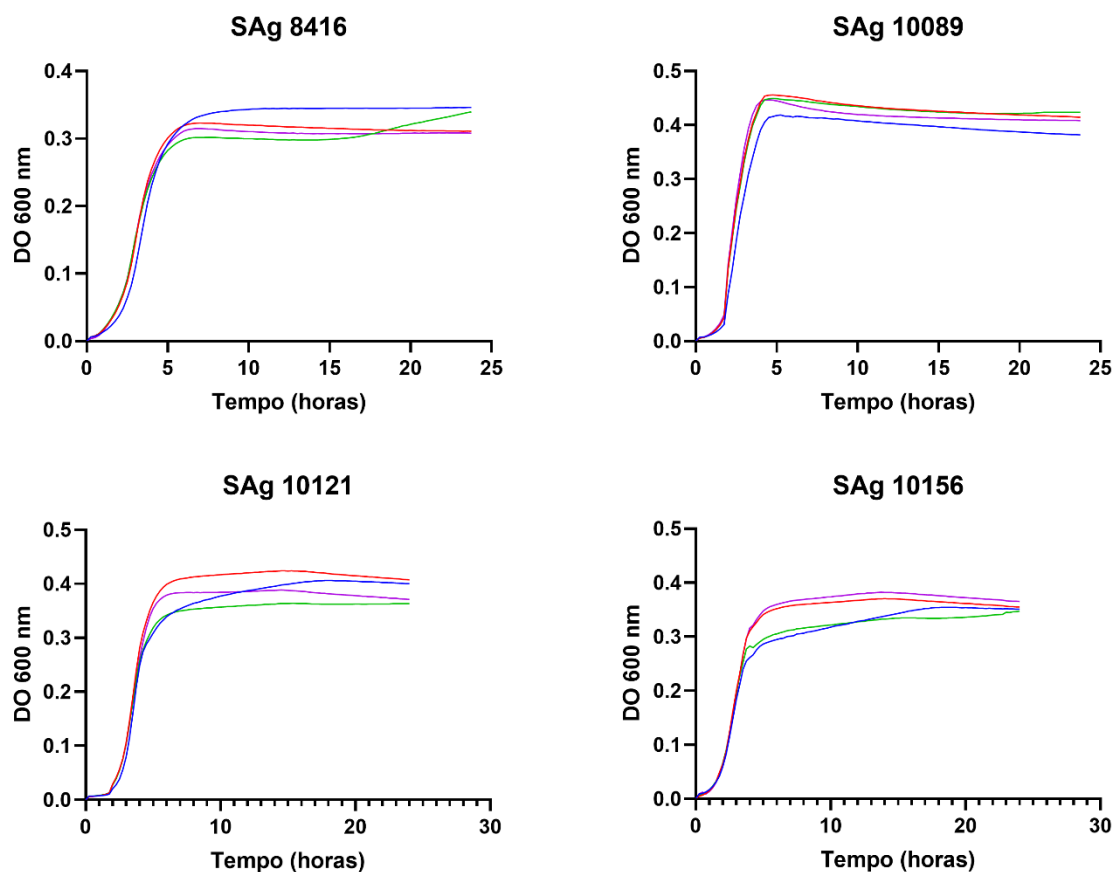
Fonte: Autoria própria.

Apêndice D – Curvas de crescimento dos isolados de *S. agalactiae* tratados com 10 µg/mL de lisozima do BigMira. Cada painel representa um isolado e apresenta as médias das triplicatas biológicas do controle não tratado (azul) e do tratamento com a lisozima do BigMira (vermelho). A significância estatística foi considerada para $p < 0,05$.



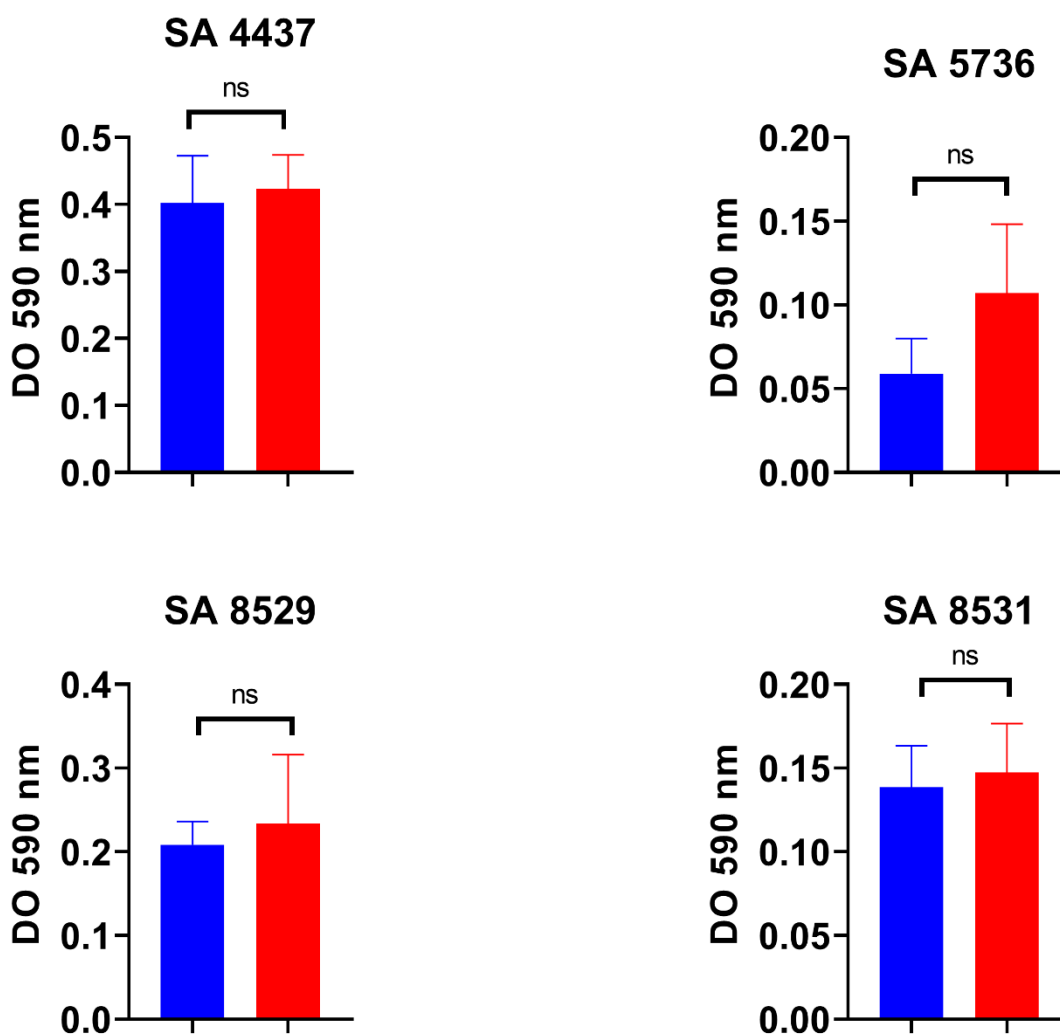
Fonte: Autoria própria.

Apêndice E – Avaliação do efeito dose-resposta da lisozima do BigMira em alguns isolados de *S. agalactiae*. Cada painel corresponde a um isolado e apresenta as médias das triplicatas biológicas do controle não tratado (azul) e dos tratamentos com lisozima do BigMira nas concentrações de 30 µg/mL (vermelho), 50 µg/mL (verde) e 100 µg/mL (roxo). A significância estatística foi considerada para $p < 0,05$.



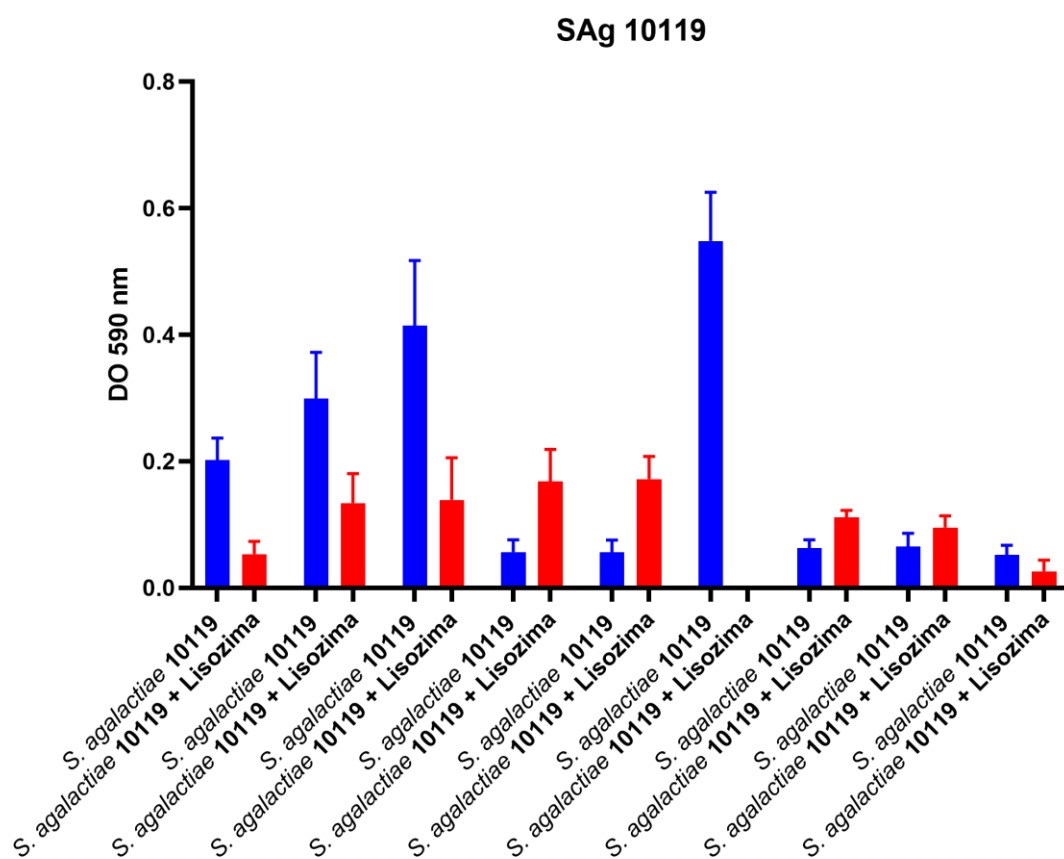
Fonte: Autoria própria.

Apêndice F – Avaliação do tampão Tris-NaCl (0,05 M de imidazol) em isolados de *S. aureus*. Biomassa de biofilme (DO 590 nm) dos isolados SA 4437, SA 5736, SA 8529 e SA 8531 expostos ao tampão veículo da lisozima BigMira. Em azul: controle não tratado; em vermelho: tratado com o tampão. Dados expressos como média das triplicatas biológicas $\pm$ desvio padrão. Analisado pelo teste *t* de Student. ns: não significativo ($p > 0,05$).



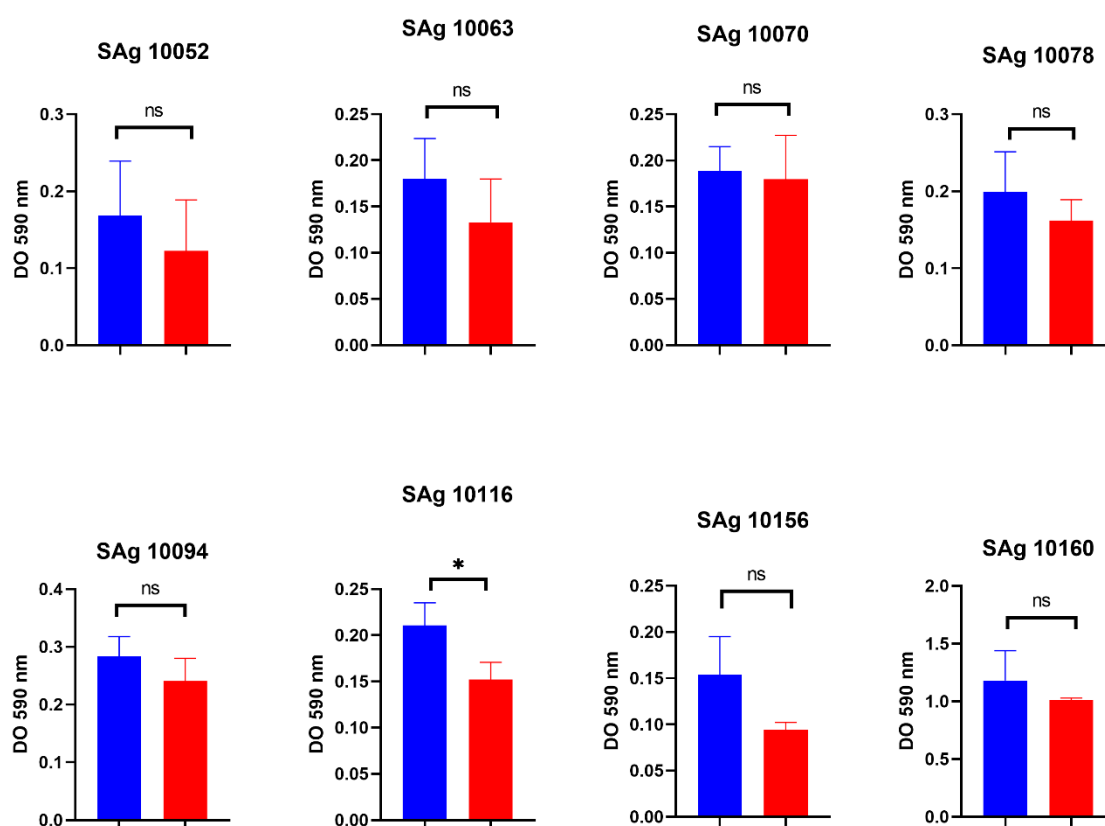
Fonte: Autoria própria.

Apêndice G – Variabilidade observada após múltiplas repetições dos ensaios de quantificação de biofilme por cristal violeta utilizando o isolado SAg 10119.



Fonte: Autoria própria.

Apêndice H – Avaliação dos efeitos do tampão de estocagem da proteína sobre a formação de biofilme dos isolados responsivos de *S. agalactiae*. As barras azuis representam o controle não tratado e as vermelhas o tratamento com o tampão de estocagem. Os dados são apresentados como média das triplicatas biológicas $\pm$ desvio padrão (DP). A significância estatística foi determinada pelo teste *t* de Student. $p < 0,05$ (*); não significativo (ns).



Fonte: Autoria própria.