

YASMIM DO NASCIMENTO CANIZO

**LIPOPROTEÍNA DE *Staphylococcus aureus*: EXPRESSÃO E
PARTICIPAÇÃO NA INVASÃO DE CÉLULAS MAC-T EM CONDIÇÕES
ENCONTRADAS NA GLÂNDULA MAMÁRIA BOVINA**

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

Orientadora: Andréa de Oliveira Barros Ribon

Coorientadores: Renato Lima Senra

Tiago Antônio de Oliveira Mendes

VIÇOSA - MINAS GERAIS

2024

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

T

C223L
2024
Canizo, Yasmim do Nascimento, 1998-
Lipoproteína de *Staphylococcus aureus*: expressão e participação na invasão de células MAC-T em condições encontradas na glândula mamária bovina / Yasmim do Nascimento Canizo. – Viçosa, MG, 2024.
1 dissertação eletrônica (45 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Andréa de Oliveira Barros Ribon.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, 2024.
Referências bibliográficas: f. 38-45.
DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.591>
Modo de acesso: World Wide Web.

1. *Staphylococcus aureus*. 2. Lipoproteínas. 3. Expressão gênica. I. Ribon, Andréa de Oliveira Barros, 1971-.
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada. III. Título.

CDD 22. ed. 579.353


YASMIM DO NASCIMENTO CANIZO

**LIPOPROTEÍNA DE *Staphylococcus aureus*: EXPRESSÃO E
PARTICIPAÇÃO NA INVASÃO DE CÉLULAS MAC-T EM CONDIÇÕES
ENCONTRADAS NA GLÂNDULA MAMÁRIA BOVINA**

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


APROVADA: 27 DE AGOSTO DE 2024

Assentimento:

 Documento assinado digitalmente
YASMIM DO NASCIMENTO CANIZO
Data: 03/10/2024 11:22:01-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Yasmim do Nascimento Canizo

Autor

 Documento assinado digitalmente
ANDREA DE OLIVEIRA BARROS RIBON
Data: 30/09/2024 19:09:39-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Andréa de Oliveira Barros Ribon

Orientadora

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudos.

RESUMO

CANIZO, Yasmim do Nascimento, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2023. **Lipoproteína de *Staphylococcus aureus*: expressão e participação na invasão de células MAC-T em condições encontradas na glândula mamária bovina.** Orientadora: Andréa de Oliveira Barros Ribon. Coorientadores: Renato Lima Senra e Tiago Antônio de Oliveira Mendes.

Lipoproteínas são proteínas de membrana encontradas em *S. aureus* que exercem diversas funções celulares e estão relacionadas à patogenicidade bacteriana. Um grupo especial de lipoproteínas, denominadas lipoproteínas-like (*lpls*) vem sendo associado à invasão em células humanas. Essas proteínas são codificadas por genes que estão organizados em um *cluster* localizado em uma ilha de patogenicidade. Um estudo realizado por nosso grupo identificou no genoma de *S. aureus* 302, cepa isolada de mastite bovina subclínica, um *cluster* contendo 6 *lpls* que têm uma identidade superior a 80%, porém baixa homologia com as *lpls* de *S. aureus* RF122, cepa associada à mastite clínica severa. Para avaliar o papel da Lpl na invasão de células imortalizadas do epitélio mamário bovino (MAC-T), uma Lpl de SAU302 foi expressa em *Escherichia coli* C41 e purificada por cromatografia de afinidade. O sequenciamento do clone comprovou a clonagem do gene de interesse. A proteína recombinante de 31 kDa foi expressa nas frações solúvel e insolúvel. Para os ensaios de invasão, células MAC-T foram incubadas por uma hora com concentrações de 35 a 4.375 µg/mL de lipoproteína recombinante antes da adição da bactéria. Observou-se que apenas as concentrações de 35 e 17,5 µg/mL aumentaram significativamente a invasão em 87% e 53%, respectivamente. Células MAC-T foram incubadas com *S. aureus* 302 por 30 minutos, 1:30 h e 3 h em meio DMEM contendo 0,6 mM de biperidina (quelante de ferro), 0,6 mM de biperidina e concentrações subinibitórias (0,5xCIM) de ampicilina, ciprofloxacina e gentamicina. No tempo de 30 minutos, houve diminuição de até 62% na invasão em todas as condições, quando comparadas ao controle. No tempo de 1 hora e 30 minutos, apenas o acréscimo de biperidina causou diminuição significativa na invasão. No tempo de 3 horas, a combinação de biperidina e ciprofloxacina e biperidina e gentamicina diminuiu a invasão em 77,61% e 81,96%, respectivamente. Para analisar a expressão dos genes *lpls*, a cepa *S. aureus* 302 foi cultivada em diferentes condições de estresse, em meio BHI. A extração do RNA total foi feita da cultura na fase de crescimento estacionária, seguida de síntese do cDNA com *random primers* e RT-qPCR com *primer* complementar a todos os genes *lpls*. Observou-se que o acréscimo de biperidina 0,6 mM, de concentrações subinibitórias de ciprofloxacina e o cultivo da bactéria a 39 °C com ou sem presença de biperidina 0,6 mM diminuiu significativamente a expressão dos genes *lpls*. O acréscimo de

bipiridina 0,6 mM e concentrações subinibitórias de ampicilina, ciprofloxacina e gentamicina juntos diminuiu drasticamente a expressão. Os resultados confirmam a expressão de uma Lpl de *S. aureus* e sugerem que ela promove a invasão bacteriana. Este trabalho foi o primeiro a avaliar a expressão de genes que codificam *lpls* em condições que simulam o ambiente encontrado pela bactéria e sugere que a lipoproteína auxilia na invasão de células mamárias do epitélio bovino.

Palavras-chave: Lipoproteína; Invasão celular; Expressão gênica.

ABSTRACT

CANIZO, Yasmim do Nascimento, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2023. **Lipoprotein of *Staphylococcus aureus*: expression and contribution for MAC-T cell invasion in conditions found in the bovine mammary gland.** Advisor: Andréa de Oliveira Barros Ribon. Co-advisers: Renato Lima Senra e Tiago Antônio de Oliveira Mendes.

Lipoproteins are membrane proteins found in *S. aureus* that execute a variety of cellular functions and are related to pathogenicity. Lipoproteins-like (*lpls*), a special group of lipoproteins, has been associated with human cells invasion. These proteins are encoded by genes that are contained in a *cluster* located in a pathogenicity island. Previous studies made by our group identified in the genome of *S. aureus* 302, a strain isolated from subclinical bovine mastitis, a *cluster* containing 6 *lpls* with over 80% identity but low homology with *lpls* of *S. aureus* RF122, a strain associated with severe clinical mastitis. To assess the role of one Lpl in immortalized bovine mammary epithelial (MAC-T) cells invasion, a Lpl from SAU302 was expressed in *Escherichia coli* C41 and purified by affinity chromatography. Sanger's sequencing confirmed the gene's cloning. The 31 kDa recombinant protein was expressed in both soluble and insoluble fractions. For invasion assays, MAC-T cells were incubated for one hour with protein concentrations from 35 to 4.375 µg/mL before adding bacteria. Only 35 and 17.5 µg/mL significantly increased invasion by 87% and 53%, respectively. MAC-T cells were incubated with *S. aureus* 302 for 30 minutes, 1:30 h and 3 h in DMEM medium containing 0.6 mM bipyridine (iron chelator), 0.6 mM bipyridine and subinhibitory concentrations (0.5xMIC) of ampicillin, ciprofloxacin and gentamicin. After 30 minutes, invasion decreased up to 62% in treatments when compared to control. After 1 hour and 30 minutes, only the addition of bipyridine caused a significant decrease in invasion. At 3 hours, the combination of bipyridine and ciprofloxacin and bipyridine and gentamicin decreased invasion by 77.61% and 81.96%, respectively. To analyze *lpls* genes expression, *S. aureus* 302 strain was cultured under different stress conditions in BHI medium. Total RNA was extracted during the stationary growth phase, followed by cDNA synthesis with random primers and RT-qPCR with primers complementary to all *lpls* genes. *Lpls* genes expression significantly decreased with the addition of 0.6 mM bipyridine, subinhibitory concentrations of ciprofloxacin, and culturing the bacteria at 39 °C with or without the presence of 0.6 mM bipyridine. Addition of 0.6 mM bipyridine and subinhibitory concentration of ampicillin, ciprofloxacin and gentamicin together drastically reduced expression. Results confirm the expression of a Lpl from *S. aureus* and suggest that it increases bacterial invasion. This study was the first to assess *lpls* genes expression under

conditions that mimic the environment found by bacteria and suggests that *lpIs* promote bovine mammary epithelial cells invasion.

Keywords: Lipoproteins; Cellular invasion; Gene expression.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
2.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	11
2.2. Exposição a antibióticos e expressão de genes de virulência em <i>Staphylococcus aureus</i> 13	
2.3. Lipoproteínas de <i>Staphylococcus aureus</i>	14
3. OBJETIVOS.....	17
3.1. Objetivo Geral	17
3.2. Objetivos Específicos	17
4. MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1. Microrganismo e condições de cultivo.....	18
4.2. Clonagem da lipoproteína 3 de <i>Staphylococcus aureus</i> 302	18
4.3. Expressão heteróloga da lipoproteína recombinante	19
4.4. SDS-PAGE e Western Blotting.....	20
4.5. Purificação da proteína recombinante	21
4.6. Determinação de concentração inibitória mínima (CIM).....	21
4.7. Ensaio de invasão em células MAC-T	21
4.8. Extração de RNA total.....	22
4.9. Desenho dos primers para quantificação dos transcritos de lipoproteínas-like (<i>lpls</i>).....	23
4.10. Quantificação dos transcritos de lipoproteínas-like (<i>lpls</i>)	24
4.11. Análises estatísticas	25
5. RESULTADOS.....	26
5.1. Expressão heteróloga e purificação da lipoproteína recombinante	26
5.2. Invasão bacteriana em células MAC-T	30
5.3. Efeito da exposição a antibióticos na invasão bacteriana.....	31
5.4. Quantificação dos transcritos de lipoproteínas-like (<i>lpls</i>)	33
6. DISCUSSÃO.....	34
7. CONCLUSÃO	36
MATERIAL SUPLEMENTAR	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

1. INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus é uma bactéria comensal que coloniza quase metade da população mundial. Apesar da colonização geralmente não ser nociva, caso a resposta imune do hospedeiro esteja comprometida, o patógeno pode causar infecções crônicas de difícil tratamento e erradicação. A disseminação eficaz de *S. aureus* é atribuída a seus mecanismos de virulência, formação de biofilmes e capacidade de evasão do sistema imunológico. Além disso, existe uma grande diversidade genética populacional que influencia no estabelecimento e progressão da doença, o que dificulta o tratamento e a erradicação da infecção.

S. aureus também é um importante patógeno animal causando a mastite bovina, uma doença inflamatória da glândula mamária de bovinos leiteiros e de grande importância na pecuária leiteira mundial. A doença pode se manifestar na forma clínica ou subclínica, sendo esta última mais desafiadora devido à ausência de sintomas visíveis. Diferentes clones bacterianos circulam nos rebanhos leiteiros e por isso estudos vêm sendo realizados na tentativa de identificar características que possam associá-los a determinadas manifestações da doença. Sabe-se que ao depender do clone a resposta imune do hospedeiro e a gravidade da mastite podem variar.

Ao analisar o genoma de cepas de *S. aureus* causadoras de mastite bovina, Rocha et al. (2019) encontraram uma variação de sequência em um gene que codifica uma lipoproteína de membrana que diferenciava as cepas subclínicas e clínicas. Essa variação pode impactar na estrutura e função da proteína com possível implicação na patogênese bacteriana. Uma análise mais detalhada revelou a presença de um *cluster* de seis genes denominados lipoproteínas-like (*lpls*), que estão organizados *em tandem* em uma ilha de patogenicidade presente no genoma de *S. aureus* 302, cepa isolada de mastite bovina subclínica.

Estudos recentes mostraram que as *lpls* de *S. aureus* USA300, um clone resistente à meticilina e que infecta humanos, aumentam a patogenicidade da bactéria e promovem a invasão de queratinócitos humanos (Nguyen et al., 2015). Tribelli et al. (2020) demonstraram a ligação de uma lipoproteína purificada a proteínas de choque térmico 90 (Hsp90) na membrana de queratinócitos humanos, promovendo um aumento na invasão celular.

Esse trabalho teve por objetivo investigar a participação de uma Lpl da cepa *S. aureus* 302 na internalização bacteriana em células imortalizadas do epitélio mamário bovino (MAC-T), avaliar a invasão bacteriana em algumas condições que simulam aquelas encontradas pelo patógeno no úbere bovino e a expressão dos genes *lpls* quando a bactéria foi cultivada nas mesmas condições.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus é um importante patógeno que coloniza quase metade da população humana mundial (Chen et al., 2022). Apesar da colonização geralmente não ser nociva, a falta de uma resposta imune inata do hospedeiro pode desencadear o início de um processo infeccioso que pode evoluir para cronicidade e se tornar de difícil tratamento e erradicação (Balasubramanian et al., 2018). As doenças mais comuns causadas por *S. aureus* são infecções de pele, tecidos moles, pulmonares e osteoarticulares, bacteremia, endocardite e síndrome do choque tóxico (Tong et al., 2015; Linz et al., 2023).

Em animais, *S. aureus* é um agente comumente associado à mastite bovina subclínica, uma doença inflamatória da glândula mamária de bovinos leiteiros que se manifesta sem sintomas aparentes e que pode ser diagnosticada por meio da contagem de células somáticas presentes no leite (Haxhiaj et al., 2022). A mastite subclínica pode se tornar crônica graças à capacidade de persistência das bactérias nas células não-fagocíticas profissionais presentes no úbere (Günther et al., 2017; Zaatout et al., 2019). Outros fatores como alta eficácia em escape do sistema imune, invasão celular, alta capacidade formadora de biofilme estão também relacionados à essa persistência (Morales-Ubaldo et al., 2023). A cronicidade pode ainda ser causada pelas variantes de colônias pequenas (SCVs), subpopulações que apresentam propriedades como formação de colônias pequenas, metabolismo desacelerado, baixo potencial de virulência e alta resistência a antibióticos (Loss et al., 2019). Todos esses fatores contribuem para que o patógeno escape da ação de antibacterianos, que são a principal forma de tratamento da mastite (Zaatout et al., 2020; Pedersen et al., 2021).

Os mecanismos de virulência e evasão do sistema imune contribuem para a disseminação de *S. aureus* (Cheung et al., 2021). Apesar de a bactéria infectar diferentes hospedeiros, os fatores de virulência usados para o estabelecimento da infecção são similares. Os fatores de agregação CflA e CflB juntamente com uma gama de proteínas de ligação a fibronectinas (FnBP), fibrinogênio (FgBP) e colágeno (Cna), auxiliam na adesão da bactéria à superfície para o início da colonização. Esse conjunto de proteínas é conhecido como os componentes de superfície microbiana que reconhecem moléculas de matriz adesiva (MSCRAMMs) (Pérez et al., 2020). Toxinas são fundamentais para a patogênese de *S. aureus* em homens e animais, promovendo a invasão e danos aos tecidos e evasão do

sistema imune (Tam e Torres, 2019). Entre as toxinas mais bem conhecidas está a alfa-hemolisina (Hla), proteína que forma poros nas membranas do hospedeiro promovendo a lise celular para a liberação de nutrientes que vão favorecer o crescimento bacteriano (Grumann et al., 2014; Goc et al., 2023). De maneira especial, a lise das células vermelhas do sangue libera a hemoglobina, importante fonte de ferro para o patógeno (Skaar e Schneewind, 2004; Wang et al., 2023). Leucotoxinas têm como alvo os leucócitos, em especial os neutrófilos, e ao formar poros na superfície dessas células, impactam fortemente o sistema imune. Isso promove a liberação de mediadores que aumentam a inflamação dos tecidos (Cheung et al., 2021). Diferentes superantígenos são secretados para promover uma potente resposta imune por meio da ativação de células T e a liberação de citocinas para modular a resposta inflamatória do hospedeiro (Côté-Gravel e Malouin, 2019).

Embora possa haver sobreposição de muitos fatores de virulência, sabe-se que há diferenças fenotípicas e genéticas entre cepas humanas e animais, revelando que habitats distintos contribuem para que as cepas adquiram características específicas ao hospedeiro (Fitzgerald, 2012). A estrutura populacional de *S. aureus* é geralmente definida por meio de tipagem de sequência de múltiplos loci (MLST), técnica que caracteriza isolados bacterianos a partir das sequências de fragmentos internos de sete genes de manutenção (*house-keeping genes*). Um tipo de sequência (ST) é atribuído a cada isolado com base no perfil alélico da sequência contida em sete loci de manutenção. Ao compartilhar cinco dos sete *loci*, isolados são agrupados em complexos clonais (CC) que descrevem linhagens (Bal et al., 2016).

S. aureus associados à mastite bovina pertencem a uma população geneticamente distinta, onde os isolados se diferenciam em fatores de virulência, reguladores gênicos e capacidade de formação de biofilme, o que resulta em uma resposta imune diferenciada e reflete no estabelecimento e progressão da doença (Murphy et al., 2019). Os clones mais prevalentes em rebanhos bovinos pertencem aos complexos clonais (CC) CC151, CC97, CC133, CC479 e CC771 (Hoekstra et al., 2020). O CC97 é apontado como o genótipo mais disseminado por ter sido identificado em 197 países, sendo a linhagem dominante em países como Chile, Japão e EUA. Isso também é verificado no Brasil, onde além do CC97, relata-se a alta prevalência de CC1, CC5, CC8, CC97, CC126, CC133 (Bonsaglia et al., 2018; Rossi et al., 2019). Gonçalves et al. (2023) demonstraram que CC97, CC1 e CC5 são os complexos mais dominantes em Minas Gerais, considerado hoje o maior produtor de leite do país. Porém, alguns CCs associados a infecções humanas, como o CC5 e o CC8, têm

emergido em infecções bovinas recentemente a partir de um salto de hospedeiros, entre humanos e bovinos (Campos et al., 2022).

2.2. Exposição a antimicrobianos e expressão de genes de virulência em *Staphylococcus aureus*

A regulação dos fatores de virulência de *S. aureus* está sujeita a uma rede complexa e coordenada que integra sinais derivados do hospedeiro e do ambiente (Jenul e Horswill, 2019). Embora haja diversos sistemas de dois componentes (TCSs), mecanismo composto por uma proteína sensora de membrana e um regulador citossólico que percebe as mudanças ambientais, o sistema *agrAC* é um dos mais bem elucidados (Choudhary et al., 2018). O regulador de genes acessórios (*agr*) é um tipo de regulação de *quorum-sensing*, no qual a bactéria regula a expressão gênica a partir da densidade da população bacteriana existente no local por meio de comunicação célula-célula (Le e Otto, 2015; Sabino et al., 2023).

A expressão de genes de virulência em *S. aureus* sofre alterações quando a bactéria é exposta a diferentes condições ambientais como temperatura, pH e disponibilidade de nutrientes e de oxigênio (Adame-Gómez et al., 2020; Cruz et al., 2021). Buscando simular o ambiente encontrado *in vivo*, Maréchal et al. (2009) e Lammers et al. (2000) demonstraram que as condições *in vitro* que mais se assimilam as condições *in vivo* são quando *S. aureus* é cultivada em leite ou em meio RPMI com acréscimo de quelantes de ferro, por exemplo deferoxamina e biperidina. A limitação de ferro é importante defesa do hospedeiro contra a infecção bacteriana. Estima-se que a solubilidade do íon férrico (Fe^{+3}) em ambiente aeróbico e pH neutro é da ordem de 10^{-9} a 10^{-10} M, insuficiente para suportar o crescimento microbiano (Ratledge e Dover, 2000). Aliado a isso, os estoques de ferro encontram-se dentro das células do hospedeiro ou sequestrados com proteínas de ligação a ferro como lactoferrina, presente no leite. Sabe-se da grande dependência bacteriana por ferro já que ele participa como cofator enzimático e constituinte de proteínas, e em processos como biossíntese de DNA e respiração. Logo, na ausência desse mineral o patógeno altera a expressão de seus genes para garantir a aquisição de ferro (Diarra et al., 2002).

O tratamento da mastite bovina é baseado no uso de antimicrobianos. Diversos estudos relatam que bactérias quando expostas a concentrações subinibitórias (subCIM) de antibióticos alteram o perfil de expressão gênica (Davies et al., 2006; Laureti et al., 2013; Gao et al., 2022). *In vivo* a bactéria enfrenta subCIM devido a farmacocinética de

medicamentos, barreiras de difusão, emissão de resíduos, emergência de organismos resistentes e a forma de aplicação (Chen et al., 2021; Thurner e Alatraktchi, 2023).

No geral, subCIM em *S. aureus* contribuem para o aumento da mutagênese e processos envolvendo síntese de DNA e proteínas intracelulares e de membrana, inclusive lipoproteínas (Olatunji et al., 2020), são afetados (Andersson e Hughes, 2014). Alguns antibióticos, da classe de fluoroquinolonas e beta-lactâmicos como ciprofloxacina e penicilina, induziram o aumento da expressão gênica de fatores de virulência quando presentes em subCIM (Ohlsen, 1998; Mesak e Davies, 2009; Otto et al., 2013; Ching et al., 2020; Bo et al., 2024). Concentrações subinibitórias de gentamicina diminuíram o nível de expressão do gene TSST-1 (toxina da síndrome do choque tóxico 1), superantígeno produzido por *S. aureus* e que causa síndrome do choque tóxico especialmente em crianças e mulheres (Hodille et al., 2017), e aumentaram a formação de variantes de colônias pequenas (SCVs) (Zhang et al., 2010; Chen et al., 2021). Concentrações subinibitórias de ciprofloxacina diminuíram a expressão dos genes Hla, importante fator de virulência de *S. aureus* (Haddadin et al., 2010; Tavares et al., 2014). Concentrações subinibitórias de ampicilina aumentaram a invasão celular da *S. aureus* USA300 em células HeLa, células humanas obtidas a partir de câncer cervical (Selan et al., 2018).

2.3. Lipoproteínas de *Staphylococcus aureus*

Lipoproteínas (Lpps) são proteínas de membrana presentes em bactérias gram-positivas que possuem uma porção lipídica ancorada à membrana da bactéria, e uma porção proteica, que fica projetada para o meio extracelular. A parte lipídica é ligada à membrana plasmática por meio de um resíduo de cisteína localizado na região N-terminal da proteína que, no caso da *S. aureus*, serve como um padrão molecular associado a patógenos (PAMP) que alerta o sistema imunológico das células hospedeiras através dos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) (Nguyen et al., 2020).

A maturação das Lpps se dá por várias etapas de acetilação no resíduo de cisteína ancorado à membrana. Elas são sintetizadas como pré-prolipoproteínas, contendo um peptídeo sinal ligado a resíduo de cisteína, e são translocadas através da membrana citoplasmática pelas vias de secreção geral (SEC) ou de translocação de argininas (TAT). A enzima diacilglicerol transferase (Lgt) é responsável pela transferência de um diacilglicerol ao resíduo de cisteína formando a prolipoproteína e, por fim, uma peptidase de sinal (Lsp)

cliva o peptídeo sinal gerando a lipoproteína madura, que pode ser di ou tri acetilada. (Mohammad et al., 2022).

O número de Lpp presente em *S. aureus* varia a depender da cepa, a exemplo das cepas USA300 e N315 que têm mais de 60 (Shahmirzadi et al., 2016). As Lpps desempenham diversas funções, entre elas transporte de ânions, de ferro e outros cátions, aminoácidos e açúcares, biossíntese, translocação de proteínas, respiração e outras funções ainda desconhecidas (Kurokawa et al., 2012). As lipoproteínas de superfície aumentam a expressão do receptor *toll-like 2* (TLR2), responsável por ativar vias de sinalização de MAP quinase (MAPK), proteínas que respondem estímulos extracelulares e que regulam diversas funções celulares como expressão gênica (Braicu et al., 2019). Células epiteliais mamárias bovinas infectadas com uma cepa de *S. aureus* no qual o gene responsável pela enzima que faz acetilação da proteína foi deletado, mostraram aumento da produção do fator de transcrição NF- κ B, aumento da expressão de mRNA de TLR2, estimulação da secreção de mediadores inflamatórios, como IL-6, e produção de prostaglandinas (PGE₂) (Liu et al., 2022). Estudos em camundongos confirmaram que a inflamação e a ativação de receptores TLR2 é dependente das lipoproteínas de superfície de *S. aureus* (Schmaler et al., 2009; Mohammad et al., 2019; Kopparapu et al., 2021). A injeção subcutânea das lipoproteínas de superfície em lesões na pele de camundongos induziu a formação de abscessos que protegem a bactéria da ação do sistema imune do hospedeiro, o que constitui em mais um mecanismo de evasão imune bacteriana (Mohammad et al., 2021).

As Lpps também podem aumentar a patogenicidade da bactéria e promover a invasão celular (Shahmirzadi et al., 2016). Os genes que codificam as lipoproteínas com essa função são denominados lipoproteínas-*like* (*lpls*) e estão organizados em tandem dentro de um *cluster* que se encontra em uma ilha de patogenicidade no genoma de *S. aureus*, *vSaa* (Nyugen et al., 2015). A cepa *S. aureus* USA300 tem dez genes *lpls* enquanto a *S. aureus* RF122 possui sete, mas ainda faltam estudos que relacionem o número de cópias à patogenicidade bacteriana. A deleção do *cluster lpl* do genoma da cepa USA300 promoveu a diminuição da invasão celular e da produção de citocinas pró-inflamatórias em células epiteliais humanas. A expressão do *cluster lpl* em *S. carnosus* conferiu à bactéria a capacidade de invasão em queratinócitos (Nguyen et al., 2015). A comprovação da importância da *lpl* na virulência *in vivo* se deu pela diminuição da carga bacteriana em rins quando a cepa mutante foi usada na infecção de murinos.

A porção proteica de uma Lpl purificada de *S. aureus* USA 300 interagiu com proteínas de choque térmico 90 (Hsp90) presentes na superfície de queratinócitos humanas

(HaCaT), aumentando a invasão celular, enquanto anticorpos anti-Hsp90 diminuíram o processo invasivo (Tribelli et al., 2020). Liu et al. (2022) demonstraram o papel das *lpls* no aumento da invasão de células do epitélio mamário bovino (bMEC), ao constatarem que quando há deleção do cluster *lpl*, a invasão diminui.

Ao analisar o genoma de cepas de *S. aureus* causadoras de mastite bovina, Rocha et al. (2019) observaram uma variação na sequência de um gene que codifica uma lipoproteína de membrana nas cepas subclínicas, que pode impactar na estrutura e função da proteína com possível implicação na patogênese bacteriana. Por comparação com o genoma da cepa *S. aureus* RF122, verificou-se que essa lipoproteína está localizada na ilha de patogenicidade *vSaa*, exclusiva de *S. aureus* e que também possui genes que codificam exotoxinas e homoserina desidrogenase (Baba et al., 2008). Seis genes que codificam proteínas que variam de 234 a 271 aminoácidos foram identificados no genoma da cepa *S. aureus* 302. As proteínas possuem identidade média de 83,81% quando comparadas entre si e de 62,44% quando comparadas às lipoproteínas de RF122. Não se sabe se essa diferença está relacionada à diferença de invasão de cepas causadoras de mastite bovina. Também faltam estudos que avaliam a expressão desses genes sob condições que simulam a infecção de *S. aureus* na glândula mamária.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar a participação de uma lipoproteína na invasão celular e avaliar a expressão de genes que codificam lipoproteínas-*like* (*lpIs*) em diferentes condições de uma cepa de *Staphylococcus aureus* isolada de mastite bovina subclínica.

3.2. Objetivos Específicos

- Expressar uma proteína Lpl em sistema de expressão heterólogo;
- Avaliar a participação da Lpl na internalização bacteriana em células imortalizadas do epitélio mamário bovino (MAC-T);
- Avaliar o efeito de antibióticos na internalização bacteriana em células MAC-T;
- Avaliar o efeito da exposição aos antibióticos na expressão dos genes *lpIs*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Microrganismo e condições de cultivo

Para os ensaios foi utilizada a cepa *Staphylococcus aureus* 302 (SAU302) (GenBank: LNOR00000000), isolada de uma vaca acometida com mastite bovina subclínica (Silva, M. P. 2015). Ao longo de seis meses, Silva (2015) isolou a cepa *S. aureus* de um animal acometido com mastite bovina subclínica. Essa cepa pertence ao ST126, é altamente invasiva e possui alta atividade hemolítica. Para os ensaios de determinação de concentração inibitória mínima (CIM) dos antimicrobianos: ampicilina, ciprofloxacina e gentamicina, foi utilizado caldo Mueller-Hinton (MH). Ampicilina é um antibiótico semissintético que faz parte da classe dos β -lactâmicos, que agem inibindo a síntese da parede celular em bactérias gram-negativas e positivas (Lima et al., 2020). Ciprofloxacina é um antibiótico sintético de segunda geração da classe das fluoroquinolonas, que agem diretamente no processo de replicação do DNA, inibindo as enzimas DNA girase e topoisomerase IV (Bhatt e Chatterjee, 2022). Gentamicina é um antibiótico da classe dos aminoglicosídeos, que agem inibindo a síntese proteica, ao se ligarem ao cromossomo 30S por meio do sítio A do RNA ribossomal 16S (Kotra et al., 2000; Krause et al., 2016).

4.2. Clonagem da lipoproteína 3 de *Staphylococcus aureus* 302

O gene que codifica uma proteína do *cluster lpl* de *S. aureus* 302 foi amplificado por PCR a partir do DNA genômico da mesma (Tabela 1). Os *primers* R e F foram desenhados com sítios de restrição para as enzimas *NheI* e *XhoI* e as reações de PCR foram feitas com 1 μ L de Taq DNA Polimerase da Cellco, $1,2 \times 10^{-3}$ μ M de dNTP, 0,1 μ M de *primers* R e F e 50 ng de DNA. O programa de PCR consistiu das seguintes etapas: uma desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, 35 ciclos com 30 segundos de desnaturação a 95 °C, 30 segundos de anelamento a 55 °C e 1 minuto de extensão a 72 °C, e uma extensão final a 72 °C por 7 minutos. O resultado da PCR foi analisado por meio de eletroforese em gel de agarose. O *amplicon* obtido foi clonado no vetor pGEM T-Easy (Promega), sendo o vetor transformado em *E. coli* DH5 α e as células plaqueadas em meio LB sólido, contendo ampicilina (100 mg/mL) e X-gal (40 mg/ml). O DNA plasmidial das transformantes foi extraído pelo kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) e a

confirmação da clonagem foi feita por meio de digestão com as enzimas de restrição citadas acima. O DNA plasmidial foi sequenciado pelo método de Sanger usando o *primer* M13 (Tabela 1) pela empresa ACTGene.

Para clonagem no vetor de expressão pET-28a, as digestões do DNA plasmidial recombinante e do vetor pET-28a vazio foram feitas com as enzimas de restrição *NheI* e *XhoI*, para obtenção do inserto e vetor aberto, respectivamente. A reação de ligação foi feita usando 1 U T4 DNA Ligase (Thermofisher), 36 ng de inserto, 100 ng de vetor e 1 U/uL de tampão de ligação, a 4 °C por 24 h. O DNA plasmidial foi sequenciado pelo método de Sanger usando os *primers* T7 (Tabela 1) pela empresa ACTGene.

Tabela 1: *Primers* utilizados para clonagem em vetores de expressão pGEM T-Easy e pET-28a e confirmação da transformação nas cepas *Escherichia coli* DH5 α e C41.

Nome	Sequência (5'-3')	Tamanho do amplicon (bp)	Fonte
<i>SAU302T</i>	R- TATATAACTCGAGTTATTTATCCTCACTGG F- TATATAGCTAGCCTAGAGGATTTATAC	677	Este estudo
<i>M13</i>	R- CAGGAAACAGCTATGACC F- TGTAACGACGGCCAGT	977	-
<i>T7</i>	R- AATACGACTCACTATAGG F- GCTAGTTATTGCTCAGCGG	977	-

4.3. Expressão heteróloga da lipoproteína recombinante

O vetor pET-28a contendo o inserto foi transformado na cepa *Escherichia coli* C41 e a confirmação da transformação foi feita por meio de PCR com os *primers* SAU302T e T7 (Tabela 1), seguido de eletroforese em gel de agarose a 1%. A transformação da *E. coli* C41 foi feita pelo método do choque térmico segundo Sambrook e Russel (2006). As transformantes foram selecionadas em meio contendo 100 μ g/mL de canamicina. Para a expressão, um clone foi crescido em 30 mL de LB contendo canamicina até a fase exponencial. Em seguida, a indução da expressão foi feita por 3 h com adição de 0.5 mM de IPTG. O *pellet* da suspensão bacteriana foi obtido por centrifugação a 14000 rpm a 4 °C por 15 minutos e ressuspenso em tampão de ligação (20 mM fosfato de sódio, 500 mM de NaCl, 20 mM imidazol). Para a lise celular, sonicou-se o precipitado de células por 10

minutos a 20 kHz (Sonicador Sonics Vibra-Cell VCX 130, Biovera). Em seguida, o extrato foi novamente centrifugado a 14000 rpm a 4 °C por 15 minutos para separação das frações solúvel e insolúvel. Por fim, o *pellet* contendo a fração insolúvel foi ressuspenso em tampão de ligação contendo 8M de ureia, com a proporção de 15 ml de tampão para cada 1 g de *pellet*.

4.4. SDS-PAGE e Western Blotting

As frações solúvel e insolúvel foram avaliadas em gel SDS-PAGE 13,5% e por Western Blotting para escolha da fração que continha a proteína desejada. Dois géis foram preparados: gel de separação (solução de bis-acrilamida 30%, tampão Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, SDS 0,01%, persulfato de amônio 0,5% v/v e TEMED 0,05% v/v) e gel de concentração (solução de bis-acrilamida 30%, tampão Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, SDS 0,01%, persulfato de amônio 0,5% v/v e TEMED 0,05% v/v). À cada fração foi adicionado tampão contendo azul de Bromofenol 1% e 2-β-mercaptoetanol 5% e foram fervidas em termociclador por 10 minutos, para desnaturação proteica. Tampão de corrida (Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1% e pH 8,3) foi utilizado para eletroforese, que prosseguiu por 2 h a 100 Volts. Posteriormente, o gel foi corado com solução de Coomassie Blue (Coomassie Brilliant Blue R-250 0,1%, metanol 50% e ácido acético 10%) por 5 min sob agitação e descorados em solução metanol 25% e ácido acético 7,5% *overnight*.

Para o Western Blotting, prosseguiu-se com a corrida do gel em eletroforese como descrito anteriormente. Uma membrana de nitrocelulose foi utilizada para realizar a transferência das proteínas separadas anteriormente no SDS-PAGE 13,5% utilizando sistema semi-seco. O bloqueio da membrana prosseguiu por 1 h com BSA 3% em PBS-W. Para retirar todo resquício do bloqueio, PBS-W foi utilizado para lavar a membrana 3 vezes e a incubação com solução de anticorpo primário *anti-his tag* em proporção 1:3000 (GE Healthcare; código: 27-4710-01) prosseguiu por 1 h. Para retirar todo resquício do anticorpo primário, PBS-W foi utilizado para lavar a membrana 3 vezes e a incubação com solução em anticorpo secundário *anti-mouse* conjugado à peroxidase, em proporção 1:7500, prosseguiu por mais 1 h. Para revelação da membrana e detecção da proteína recombinante utilizou-se uma solução contendo 10 mg de DAB (3,3'-diaminobenzidina), 1 mL de solução de NiCl₂ 0,3%, 1 mL de tampão Tris 1M pH 7,6, 8mL de H₂O destilada e 10 µL de H₂O₂.

4.5. Purificação da proteína recombinante

A expressão foi feita em 1 L de meio LB, seguindo as mesmas condições anteriores. O *pellet* da suspensão bacteriana foi obtido por centrifugação e ressuspenso em tampão de lise (20 mM fosfato de sódio, 500 mM de NaCl, 20 mM imidazol, 0,2 mg/mL de lisozima, 5% v/v glicerol, 1 mM de PMSF). Posteriormente à lise celular, a purificação da proteína recombinante obtida a partir da fração solúvel foi realizada por cromatografia de afinidade por cauda de histidina no AKTA *Start Protein Purification System* (Cytiva). A coluna utilizada, “*HisTrap FF*”, foi inicialmente equilibrada usando 5 vezes o seu volume com tampão de ligação e eluída com tampão de eluição (20 mM NaHPO₄, 500 mM NaCl e 500 mM imidazol). As frações purificadas foram avaliadas em gel SDS-PAGE 13,5% e Western Blotting para escolha da fração que continha a proteína em maior concentração e pureza. A concentração de proteína total de cada fração foi determinada utilizando o método de Bradford (Sigma, A55866).

4.6. Determinação de concentração inibitória mínima (CIM)

A determinação de CIM foi feita pelo método de microdiluição em microplacas de 96 poços adicionando-se em cada poço 180 µL de meio Mueller Hinton (MH) e 20 µL de uma suspensão bacteriana contendo 10⁶ UFC/mL conforme recomendações do Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI 2022, <https://clsi.org>). A CIM foi determinada para os antibióticos ampicilina (Sigma, A0166), ciprofloxacina (Sigma, 17850) e gentamicina (Sigma, G1264), que foram testados nas concentrações de 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1 e 0,5 µg/mL. As microplacas foram incubadas a 37 °C por 24 h e o resultado foi avaliado visualmente. A CIM foi definida como a menor concentração de antibiótico onde não se visualizou o crescimento bacteriano. Metade do valor da CIM foi usada nos ensaios para avaliar a expressão dos genes e invasão bacteriana.

4.7. Ensaio de invasão em células MAC-T

As células imortalizadas do epitélio mamário bovino (MAC-T) foram descongeladas e transferidas para garrafas com meio DMEM (Vitrocell) suplementado com

piruvato de sódio e 4,5% de glicose em estufa a 37 °C com 5% de CO₂. Após alcançar confluência, as células foram tratadas com tripsina 0,025% (Sigma, T4799), transferidas para placas de 12 poços com DMEM, com 2x10⁵ células/poço, e incubadas a 37 °C com 5% de CO₂ até atingir confluência.

Para os ensaios de invasão, primeiramente os poços contendo as células MAC-T foram lavados com PBS 1X estéril. A cada poço, foi adicionada uma suspensão bacteriana da cepa *S. aureus* 302 ressuspensa em meio de invasão (DMEM com 1% de soro fetal bovino) ajustada para 10⁶ UFC/poço com base na escala McFarland, para obtenção de uma multiplicidade de infecção (MOI) de 10:1. As placas foram incubadas a 37 °C com 5% de CO₂ por 30 minutos, 1:30 h e 3 h. O meio de cultivo celular foi cuidadosamente aspirado e cada poço foi lavado 3 vezes com PBS 1X estéril. Para eliminação das bactérias não internalizadas, foram adicionados a cada poço 500 µL de meio de invasão contendo gentamicina e ampicilina, ambos a 1 mg/mL, e as placas foram incubadas por 30 minutos a 37 °C com 5% de CO₂. Os poços foram então lavados com PBS 1X estéril e, posteriormente, com água destilada estéril, para lise das células e liberação das bactérias internalizadas. A concentração das bactérias internalizadas foi determinada por meio de diluição seriada com contagem de microgotas em placas de Petri contendo meio BHI ágar.

Para avaliar o efeito da concentração sub CIM de antibióticos na invasão bacteriana, adotou-se o mesmo procedimento acima, adicionando-se 0,6 mM de biperidina, 0,5XCIM de ampicilina, ciprofloxacina ou gentamicina, nos poços contendo DMEM, antes da adição da bactéria. A invasão foi feita em triplicatas biológicas, duplicatas técnicas e procedeu por 30 min, 1:30 h e 3 h, antes da lise celular. Para avaliar o efeito da lipoproteína recombinante no potencial de invasão da cepa utilizada, adotou-se o mesmo procedimento acima, com concentrações decrescentes de proteína purificada em uma faixa de 35 a 4.375 µg/mL. A invasão foi feita em triplicatas biológicas e duplicatas técnicas e procedeu por 1:30 h antes da lise celular.

4.8. Extração de RNA total

Para extração de RNA total, tentou-se mimetizar algumas condições encontradas no úbere bovino: deficiência de ferro no meio, limitação de oxigênio, febre (39 °C) e concentrações subinibitórias de antibióticos (simular condições de tratamento da vaca acometida com mastite). As bactérias foram cultivadas em meio BHI (controle), meio BHI

a 39 °C, meio BHI contendo 0,6 mM de biperidina (BP) a 37 e 39 °C, meio BHI e concentrações subinibitórias de ampicilina, ciprofloxacina, gentamicina e meio BHI, BP 0,6 mM e subCIM de ampicilina, ciprofloxacina e gentamicina.

Tubos Falcon cheios com 15 mL de BHI foram inoculados com uma colônia bacteriana e mantidos a 37 °C. Após 4 h e 16 h, a suspensão bacteriana presente em cada tubo foi centrifugada a 5000 rpm por 3 minutos para obtenção do *pellet* e, que, após o descarte do sobrenadante, foi ressuscitado em tampão TE 1mM. Foram adicionados 50 mg/mL de lisozima (Sigma, 6876) e 0,5 U/mL de lisostafina (Sigma, L7386) e incubados a 37 °C por 40 minutos para lise celular, seguido de homogeneização cuidadosa a cada 5 minutos. A extração seguiu o protocolo do Trizol, conforme recomendações do fabricante. Por fim, os microtubos foram incubados a 60 °C por 7 minutos, para desativação de RNAses. A integridade e a qualidade do RNA foram avaliadas em gel de agarose 1%. A concentração das amostras foi determinada por fluorimetria em Qubit (TechTarget, EUA), conforme protocolo do fabricante. As extrações foram realizadas em triplicatas biológicas.

4.9. Desenho dos *primers* para quantificação dos transcritos de lipoproteínas-like (*lpls*)

O *cluster* de *lpls* presente no genoma da cepa *S. aureus* 302 possui 6 lipoproteínas-like organizadas *em tandem* em uma ilha de patogenicidade. O tamanho de cada uma varia, indo de 705-804 pb. A identidade entre eles varia de 80,34 a 86,72% (Tabela 2). Com intuito de desenhar *primers* que conseguissem amplificar todos os 6 genes presentes no *cluster*, foi escolhida uma região conservada entre todas os 6 genes (Figura 1). O desenho foi feito pelo programa Primer3Plus (disponível em: <https://www.primer3plus.com>).

Tabela 2: Matriz de percentagem de identidade das 6 *lpls* organizadas *em tandem* no *cluster lpl* da cepa *S. aureus* 302.

	<i>lpl1</i>	<i>lpl2</i>	<i>lpl3</i>	<i>lpl4</i>	<i>lpl5</i>	<i>lpl6</i>
<i>lpl1</i>	100	82,75	80,73	86,72	84,44	80,34
<i>lpl2</i>	82,75	100	85,62	83,4	84,71	84,76
<i>lpl3</i>	80,73	85,62	100	84,82	81,05	84,4
<i>lpl4</i>	86,72	83,4	84,82	100	84,71	84,4
<i>lpl5</i>	84,44	84,71	81,05	84,71	100	82,91
<i>lpl6</i>	80,34	84,76	84,4	84,4	82,91	100

a 0,75 ng/uL. O método da curva padrão relativa foi usada para cálculo dos valores de quantidade relativa (Rq) para os genes *lpls* em cada amostra (Mendes et al., 2013).

Tabela 3: *Primers* utilizados para quantificação dos transcritos de lipoproteínas-like (*lpls*) da cepa *S. aureus* 302.

Nome	Sequência (5'-3')	Tamanho do amplicon (bp)	Fonte
<i>lpl</i>	R-CGCGTTATTTGTTGGTATGTCA F-AAGTTCTTCGCGCAATATGG	169	Este estudo
<i>gyrB</i>	R-CCAACACCATGTAAACCACCAGAT F-AGTAACGGATAACGGACGTGGTA	150	Beeken <i>et al.</i> , 2004

4.11. Análises estatísticas

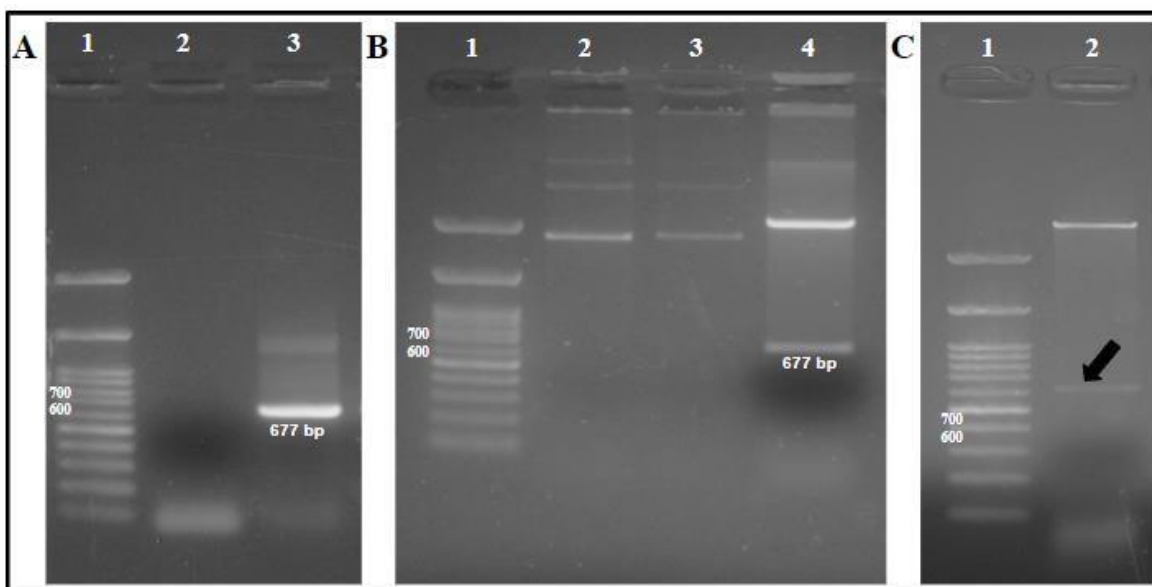
As médias das replicatas técnicas em cada réplica biológica foram comparadas ao valor médio dos controles. Os dados foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) unidirecional e plotados no software GraphPad Prism (v.6). Valores de $p < 0,01$ e $p < 0,05$ foram considerados significativos pelo teste de Dunnett.

5. RESULTADOS

5.1. Expressão heteróloga e purificação da lipoproteína recombinante

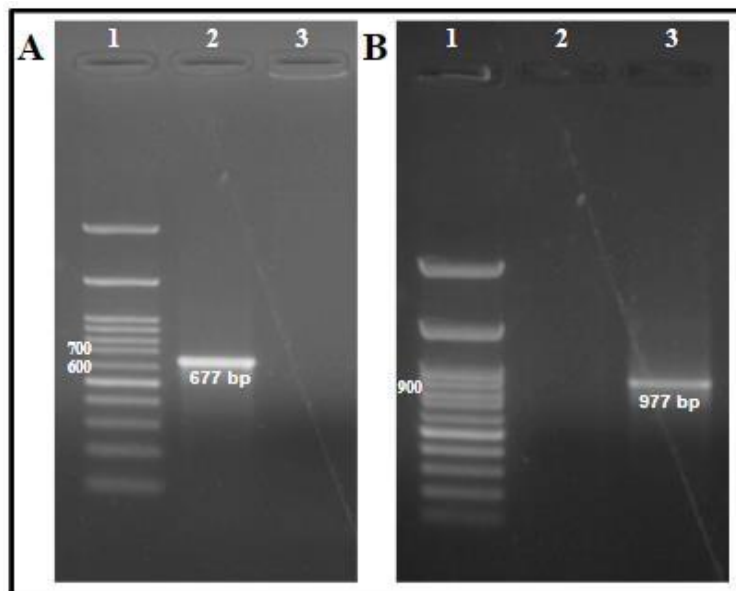
O gene que codifica uma Lpl da cepa *S. aureus* 302 foi amplificado por meio de PCR obtendo-se um *amplicon* do tamanho esperado (677 bp) (Figura 2A). Um fragmento de mesmo tamanho foi obtido da clivagem do DNA plasmidial recombinante com as enzimas de restrição *XhoI* e *NheI*, confirmando o sucesso da clonagem em pGEM T-Easy (Figura 2B) e no vetor de expressão pET-28a (Figura 2C).

Figura 2: Clonagem do gene *lpl* de *Staphylococcus aureus* 302. O gene foi amplificado a partir do DNA Genômico da cepa *S. aureus* 302 e o *amplicon* foi analisado por gel de agarose 1% de PCR (canaleta 3A). O DNA Plasmidial da bactéria transformada foi extraído (canaletas 2 e 3 B) e o inserto clonado em pGEM T-Easy foi liberado usando as enzimas *XhoI* e *NheI* (canaleta 4B). A seta em C indica que o inserto clonado em pET-28a foi liberado usando as mesmas enzimas (canaleta 2C). Canaleta 1: padrão 100 bp DNA Ladder (Cellco).



O plasmídeo pET-28a contendo o gene Lpl foi transformado na cepa *E. coli* C41 e a extração de DNA plasmidial de colônias transformantes seguida por PCR, confirmou a presença do fragmento de 677 pb (Figura 3A). Uma outra amplificação usando os *primers* T7, confirmou que o inserto estava dentro do plasmídeo. O *amplicon* obtido (977 bp) foi a soma dos valores do tamanho do inserto e do tamanho da região de clonagem do vetor, que contém o promotor e terminador T7 (Figura 3B).

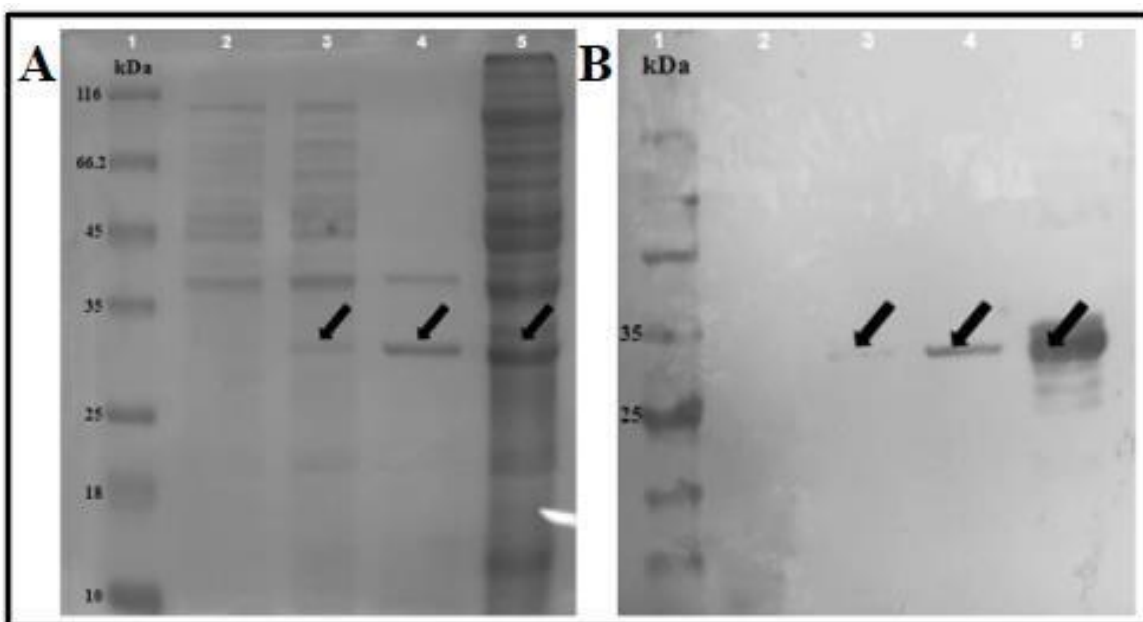
Figura 3: Análise por gel de agarose 1% da amplificação por meio de PCR dos genes *lpl* (canaleta 2A) e T7 (canaleta 3B) a partir do DNA Plasmidial da cepa *E. coli* C41 transformada com vetor de expressão pET-28a. Canaleta 1: padrão 100 bp DNA Ladder (Cellco).



Para verificar a expressão da proteína recombinante na hospedeira C41, alíquotas contendo a suspensão bacteriana da cultura selvagem, da C41 transformada antes da indução com IPTG e as frações solúvel e insolúvel foram analisadas por gel de poliacrilamida 13,5%. A Figura 4A mostra a banda característica da lipoproteína com tamanho de aproximadamente 31 kDa (entre 25 e 35 kDa).

O ensaio de Western Blotting prosseguiu com as mesmas alíquotas do SDS-PAGE, as quais foram submetidas a uma transferência para uma membrana de nitrocelulose. A revelação com diaminobenzidina (DAB) confirmou a proteína recombinante nas três frações: não induzida, solúvel e insolúvel (Figura 4B), sendo a concentração da proteína observada em expressão em níveis crescentes.

Figura 4: Expressão da Lpl recombinante em *Escherichia coli* C41. Em A, SDS-Page 13,5% de extratos proteicos preparados do sobrenadante de culturas bacterianas transformadas (C41) e selvagens (WT). Em B, Western Blotting usando anticorpo anti-His. As setas indicam a banda característica da proteína recombinante, com tamanho de 31 kDa. Canaleta 1: PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermofisher). Canaleta 2: sobrenadante de cultura de C41 WT. Canaleta 3: sobrenadante de cultura de C41 transformada não induzida. Canaleta 4: fração solúvel da C41 transformada. Canaleta 5: fração insolúvel da C41 transformada.



Na purificação a partir da fração solúvel, foram obtidas um total de 14 frações que foram analisadas a partir de SDS-Page 13,5% (Figura 5A) e Western Blotting (Figura 5B). A fração escolhida foi a número 11, que apresentou maior pureza e concentração, demonstrada em uma banda única de tamanho esperado (aproximadamente 31 kDa) (Figura 6).

Figura 5: Análise das frações purificadas da Lpl recombinante por SDS-Page e Western Blotting. Marcador utilizado: PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermofisher). Canaleta 1-14: frações purificadas. A seta indica a banda característica da proteína recombinante, com tamanho de 31 kDa, e a fração escolhida para ensaios posteriores de invasão celular.

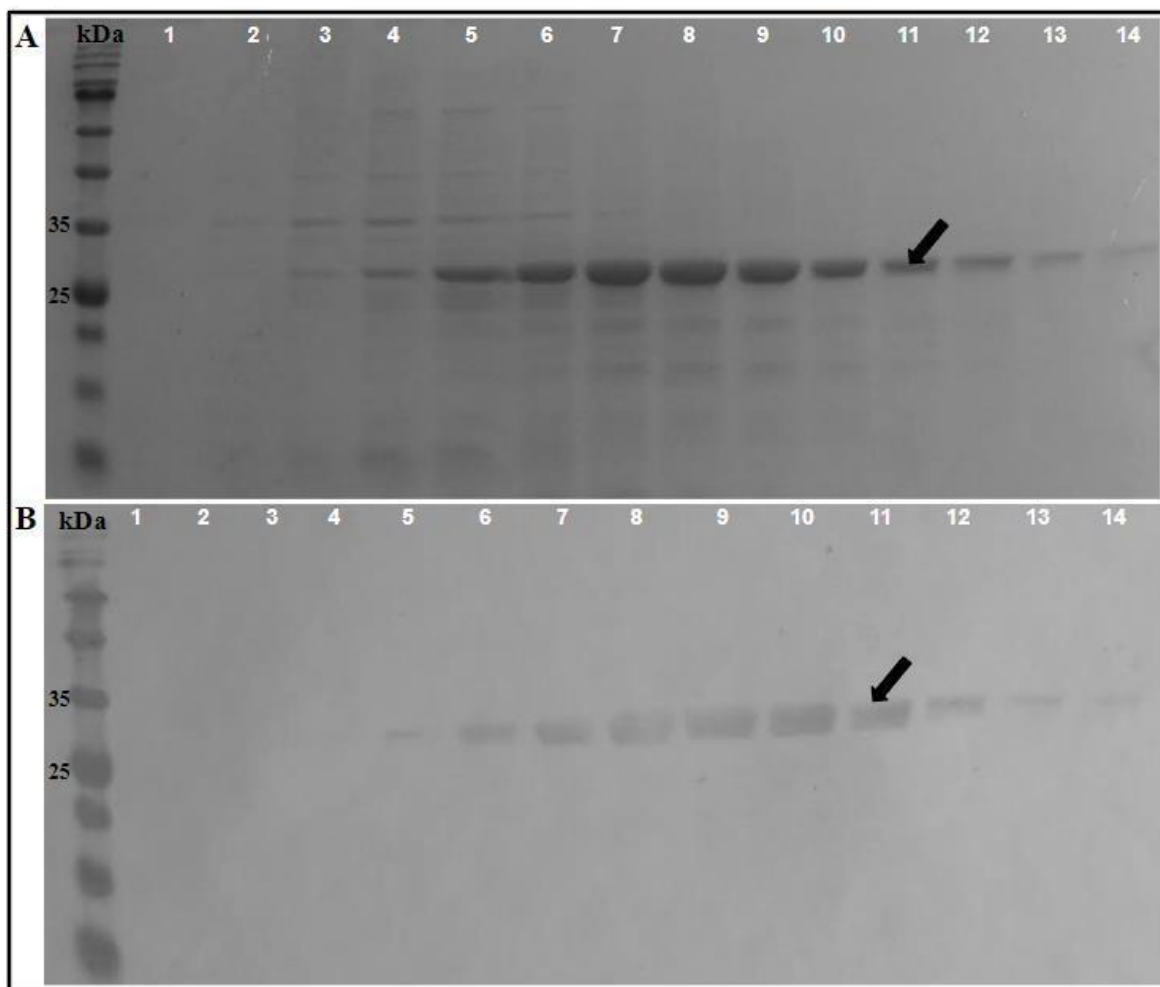
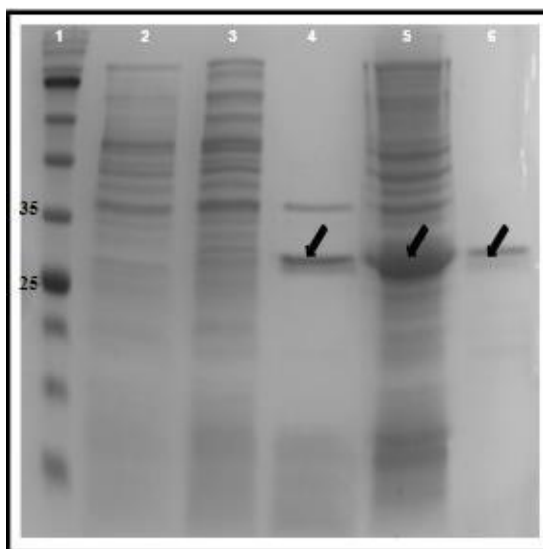


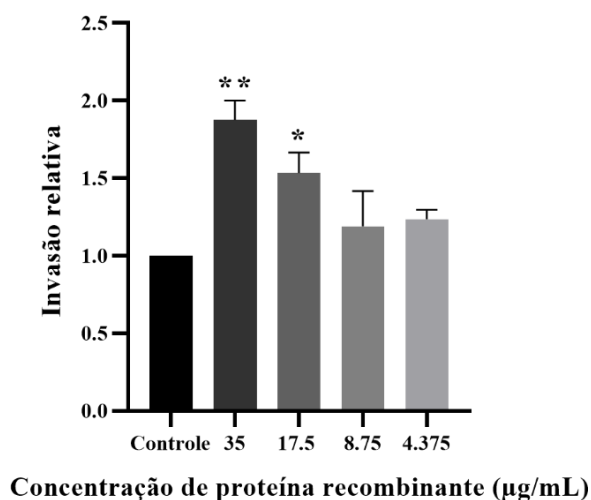
Figura 6: Purificação da proteína recombinante por SDS-Page. As setas indicam a banda característica da proteína recombinante, com tamanho de 31 kDa. Canaleta 1: PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermofisher). Canaleta 2: sobrenadante de cultura de C41 WT. Canaleta 3: sobrenadante de cultura de C41 transformada não induzida. Canaleta 4: fração solúvel da C41 transformada. Canaleta 5: fração insolúvel da C41 transformada. Canaleta 6: fração solúvel purificada.



5.2. Invasão bacteriana em células MAC-T

Com intuito de avaliar a participação da lipoproteína recombinante na invasão bacteriana, células MAC-T foram incubadas com diferentes concentrações da proteína purificada seguida da adição da bactéria. A pré-incubação com a lipoproteína recombinante aumentou significativamente a invasão apenas em duas concentrações (Figura 7). A invasão relativa aumentou para $1,87 \pm 0,12$ e $1,53 \pm 0,13$ nas concentrações de 35 e 17.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente, quando comparado ao controle sem a proteína. Utilizando 8.75 e 4.375 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de lipoproteína recombinante, os valores de invasão relativa foram $1,31 \pm 0,22$ e $1,23 \pm 0,06$, respectivamente.

Figura 7: Impacto de diferentes concentrações de lipoproteína recombinante na invasão da cepa *S. aureus* 302 em células MAC-T. As células eucariotas foram pré-incubadas com concentrações decrescentes de proteína, de 35 a 4.375 µg/mL, seguida da adição das células bacterianas. No controle não foi usada proteína antes da adição das bactérias. Os experimentos foram feitos em triplicatas biológicas. ANOVA unidirecional foi utilizada para indicar significância estatística comparando com o controle. Diferenças entre tratamentos e controle foram consideradas significativas quando $p < 0,01$ (**) e $p < 0,05$ (*), de acordo com o teste de Dunnett.



5.3. Efeito da exposição a antibióticos na invasão bacteriana

A influência de ampicilina, gentamicina e ciprofloxacina na invasão bacteriana foi avaliada ao longo de 3 h (Tabela 4 e Figura 8). A partir de 30 minutos, houve diminuição significativa da invasão (até 62%) em todas as condições avaliadas. Com 1 hora e 30 minutos de invasão, a diminuição na invasão continuou, mas só foi significativa quando houve acréscimo de biperidina (64%), para os tratamentos com acréscimo biperidina e ampicilina, biperidina e ciprofloxacina e biperidina e gentamicina diminuiu-se 16%, 48% e 52%, respectivamente.

Após 3 h de invasão, o acréscimo de biperidina e biperidina e ampicilina interferiu pouco na invasão, em contraste a adição de biperidina e ciprofloxacina e biperidina e gentamicina que afetou significativamente ($p < 0,01$) a invasão, com diminuição de 77,61% e 81,96%, respectivamente. Foi possível observar que apesar de todas as condições afetarem a invasão da cepa *S. aureus* 302 em células MAC-T, as condições que mais afetaram a

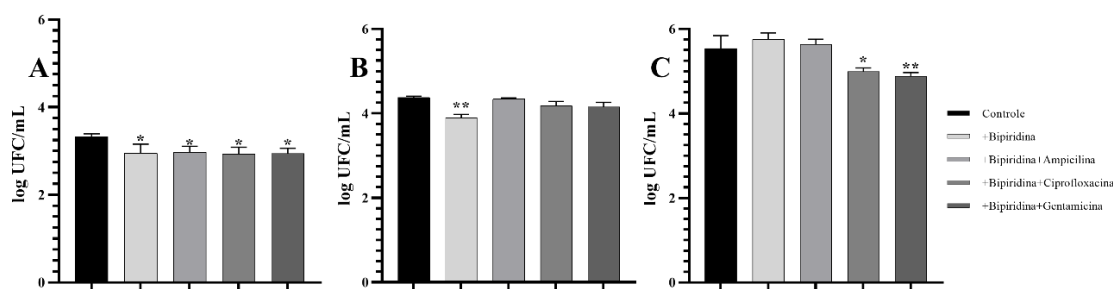
invasão foram o acréscimo de 0,6 mM de biperidina e concentrações subinibitórias de ciprofloxacina e gentamicina (Figura 8).

Tabela 4: Contagem em UFC/mL e invasão relativa em células MAC-T por *S. aureus* 302 mediante exposição a quelante de ferro e antimicrobianos. No controle, foi utilizado somente meio DMEM.

Condições	30 min		1:30 h		3 h	
	UFC/mL	Invasão Relativa (%)	UFC/mL	Invasão Relativa (%)	UFC/mL	Invasão Relativa (%)
Controle	$2,1 \pm 0,3 \times 10^3$	100	$2,5 \pm 0,25 \times 10^4$	100	$4,6 \pm 2,17 \times 10^5$	100
+BP	$8 \pm 0,47 \times 10^2$	38	$9 \pm 0,52 \times 10^3$	36	$4,5 \pm 3,33 \times 10^5$	97,82
+BP+AMP	$9 \pm 0,3 \times 10^2$	42,8	$2,1 \pm 0,97 \times 10^4$	84	$4,5 \pm 1,2 \times 10^5$	97,82
+BP+CIP	$9 \pm 0,3 \times 10^2$	42,8	$1,3 \pm 0,5 \times 10^4$	52	$1,03 \pm 0,17 \times 10^5$	22,39
+BP+GEN	$8 \pm 0,3 \times 10^2$	38	$1,2 \pm 0,65 \times 10^4$	48	$8,3 \pm 0,14 \times 10^4$	18,04

+BP: acréscimo de biperidina 0,6 mM. +BP+AMP: acréscimo de biperidina 0,6 mM e subCIM de ampicilina. +BP+CIP: acréscimo de biperidina 0,6 mM e subCIM de ciprofloxacina. +BP+GEN: acréscimo de biperidina 0,6 mM e subCIM de gentamicina.

Figura 8: Efeito de diferentes condições de cultivo na invasão da cepa *S. aureus* 302 em células MAC-T com 30 min (A), 1:30 h (B) e 3 h (C) de invasão. No controle, foi utilizado somente meio DMEM. Em cada tratamento o antibiótico e/ou quelante de ferro adicionado está indicado com símbolo “+”. Os experimentos foram feitos em triplicatas biológicas. ANOVA unidirecional foi utilizada para indicar significância estatística com comparações com o controle. Diferenças entre tratamentos e controle foram consideradas significativas quando $p < 0,01$ (**) e $p < 0,05$ (*) de acordo com o teste de Dunnett.

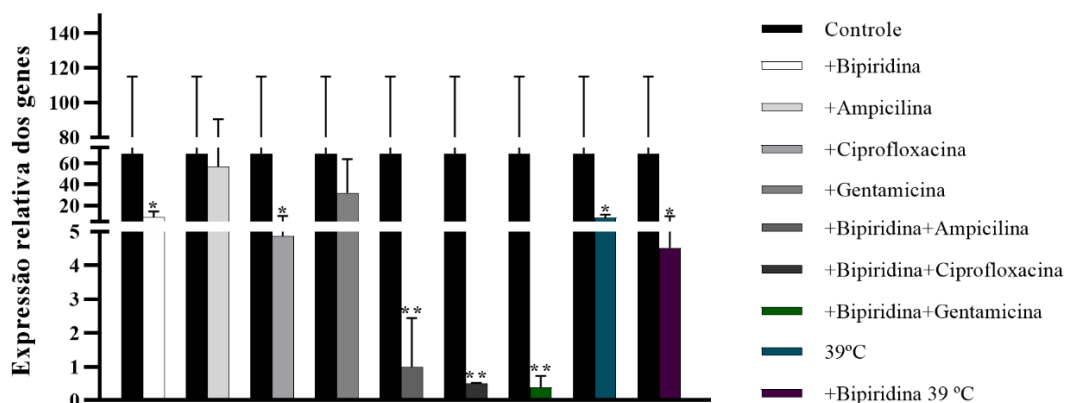


5.4. Quantificação dos transcritos de lipoproteínas-like (*lpls*) em diferentes condições

Para a quantificação da expressão dos genes *lpls*, inicialmente as culturas foram crescidas em BHI e BHI + BP até as fases exponencial e estacionária. Porém, não se observou a expressão gênica na fase exponencial e por isso foi usada apenas a fase estacionária no estudo.

Os resultados de expressão mostram uma redução dos transcritos na presença de BP e subCIM de ciprofloxacina (CIP), quando comparados ao controle (figura 9). O aumento da temperatura de 37°C para 39°C também diminuiu a expressão gênica, o que também foi observado quando BP foi adicionado ao meio. Ao comparar com o controle, observa-se que somente concentrações subinibitórias de ampicilina e gentamicina não tiveram impacto significativo sob a expressão e que houve diminuição significativa ($p < 0,05$) da expressão quando há a adição de biperidina, tanto a 37 quanto 39 °C, concentrações subinibitórias de ciprofloxacina e cultivo a 39 °C. Na presença de BP e subCIM dos antibióticos, a expressão se aproxima de zero (figura 9).

Figura 9: Expressão de genes que codificam *lpls* em diferentes condições de estresse. No controle, a bactéria cresceu somente em meio BHI a 37 °C. Em cada tratamento o antibiótico e/ou quelante de ferro adicionado está indicado com símbolo “+”. Os experimentos foram feitos em triplicatas biológicas. ANOVA unidirecional foi utilizada para indicar significância estatística comparando com o controle. Diferenças entre tratamentos e controle foram consideradas significativas quando $p < 0,01$ (**) e $p < 0,05$ (*), de acordo com o teste de Dunnett.



6. DISCUSSÃO

Lipoproteínas-like (*lpls*) são lipoproteínas organizadas em um *cluster* da ilha de patogenicidade *vSaα* no genoma de *S. aureus* e influenciam na patogenicidade e invasão celular desse patógeno (Nyugen et al., 2015; Shahmirzadi et al., 2016). Apesar de diversos estudos avaliarem o papel dessas *lpls*, tais estudos se limitam ao avaliar a cepa USA300 e pouco se sabe sobre as lipoproteínas em isolados causadores de mastite bovina. O presente estudo demonstrou que a expressão dos genes *lpls* é influenciada por antibióticos e que uma lipoproteína recombinante de *S. aureus* 302, isolado de animal com mastite subclínica, é capaz de interferir na invasão em células do epitélio mamário bovino.

A lipoproteína recombinante foi mais expressa em corpos de inclusão, o que era esperado porque se trata de uma proteína de membrana, com tamanho elevado (>31 kDa). Com intuito de manter a conformação nativa da proteína, e evitar desnaturação causada por ureia, optou-se por trabalhar com a fração solúvel. A proteína recombinante purificada neste estudo foi capaz de aumentar significativamente a invasão em células MAC-T, resultados condizentes com estudos conduzidos com a cepa USA300 em células epiteliais humanas, onde o aumento foi de mais de 50%, quando comparado ao controle sem interferência da lipoproteína (Nguyen et al., 2015; Nguyen et al., 2018; Tribelli et al., 2020), e epiteliais bovinas (Liu et al., 2022). O mecanismo de invasão de células do hospedeiro por *S. aureus* mais conhecido depende de proteínas de ligação à fibronectina conhecidas por FnBPA e FnBPB (Sinha et al., 1999), porém Tribelli et al. (2020) demonstraram que uma Lpl da cepa USA300 se liga a duas isoformas de proteínas de choque térmico (Hsp90 α e β) expressas na superfície celular de células epiteliais humanas.

O genoma de SAU 302 tem seis genes em *cluster* localizados em uma ilha de patogenicidade (Rocha et al., 2022), cuja identidade varia de 80,34 a 86,72%. A cepa *S. aureus* RF122 tem sete genes *lpl* e cujas identidades variam de 46,9 a 63,8% com os genes da cepa *S. aureus* 302 (Baba et al., 2008; Rocha et al., 2022). Até o momento nenhum estudo mostrou a expressão desses genes ou se todos são funcionais. Neste estudo optou-se por construir *primers* que anelassem em todas as sequências para diminuir as chances de ter como alvo um gene que não fosse expresso. Os estudos de quantificação de expressão apresentaram diferença estatística significativa entre alguns dos tratamentos, porém também alto grau de variação, o que pode ser devido ao fato de que o *primer* utilizado foi desenhado de forma a amplificar uma região conservada em todos os genes presentes no *cluster*, que podem apresentar diferentes níveis de expressão ou serem pseudogenes, que são genes que

adquiriram muitas mutações e por isso não codificam proteínas funcionais e que podem estar envolvidos em processos de regulação gênica (Xie et al., 2019; Singh et al., 2020).

Utilizando algumas condições encontradas pela bactéria no úbere bovino, como baixa disponibilidade de ferro e subCIM de antimicrobianos (Allard et al., 2006; Thurner e Alatraktchi, 2023), demonstrou-se que a invasão celular ocorre em proporções diferentes e que os antimicrobianos ciprofloxacina e gentamicina são os que mais afetam esse processo. Essas condições são as mesmas em que a quantificação dos transcritos *lpls* é significativamente diminuída. Assume-se que a ciprofloxacina e a gentamicina afetaram mais esse processo pois são antimicrobianos que inibem os processos de replicação e síntese proteica (Kotra et al., 2000; Krause et al., 2016; Bhatt e Chatterjee, 2022), respectivamente, o que pode ter causado um efeito bactericida na cepa *S. aureus* 302. Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que após três horas de incubação em biperidina + ampicilina, não houve diferença na invasão de MAC-T em relação ao controle. Porém, a expressão dos genes *lpls* foi drasticamente reduzida. A presença de subCIM de ampicilina já foi descrita como uma condição que aumenta a expressão de genes de virulência e a invasão celular (Chen et al., 2021; Gao et al., 2022). Além disso, considerando que as proteínas de ligação à fibronectina (FnBPA e FnBPB) são a principal forma utilizada por *S. aureus* para a invasão, pode-se supor que elas permaneceram sendo expressas.

O estudo atual foi o primeiro a demonstrar a expressão de genes do *cluster lpl* presente na ilha de patogenicidade de *S. aureus* de origem bovina. Comprovou-se também a participação da proteína na invasão celular e a influência da limitação de ferro e a exposição a antibióticos no processo invasivo. Contudo, novos estudos devem ser conduzidos para elucidar a influência da variação da sequência dos genes *lpl* de *S. aureus* de origem bovina na capacidade de invasão de isolados provenientes de mastite subclínica e clínica, além da funcionalidade e expressão de todos os genes presentes no *cluster* em diferentes condições de que simulam a glândula mamária bovina. Essas informações são importantes para elucidar os mecanismos envolvidos na patogenicidade bacteriana e avançar no combate à mastite bovina.

7. CONCLUSÃO

Este trabalho demonstrou o papel significativo de lipoproteínas-*like* (*lpIs*) de uma cepa isolada de mastite bovina subclínica na invasão de células epiteliais bovinas. Foi possível expressar um Lpl de forma heteróloga e provar que ela aumenta significativamente a capacidade invasiva da bactéria. Além disso, demonstrou-se que a expressão de genes *lpIs* é sensível a diferentes condições, algumas que simulam o ambiente *in vivo* do úbere bovino, como presença de quelantes de ferro e concentrações subinibitórias de antibióticos, bem como temperaturas elevadas, e que as mesmas condições interferem na invasão bacteriana em células epiteliais bovinas, diminuindo-a. Tais resultados indicam a grande importância das *lpIs* para patogênese bacteriana. Este é o primeiro estudo a analisar a expressão de *lpIs* em condições que imitam o ambiente *in vivo*, reforçando a relevância dessas lipoproteínas na patogenicidade de *S. aureus* em infecções associadas à mastite bovina.

MATERIAL SUPLEMENTAR

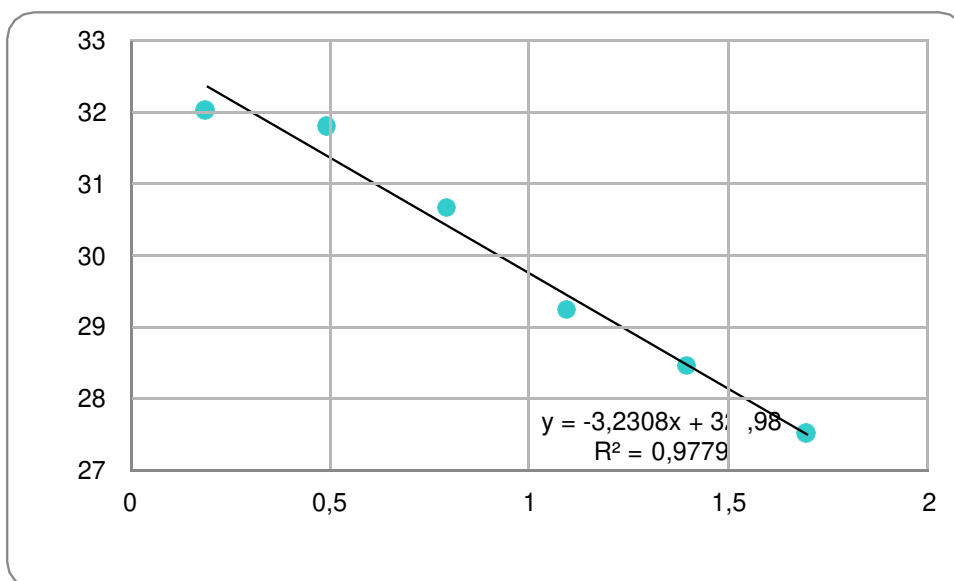


Fig. Sup. 1 – Curva padrão de eficiência dos *primers gyrB* (tabela 3).

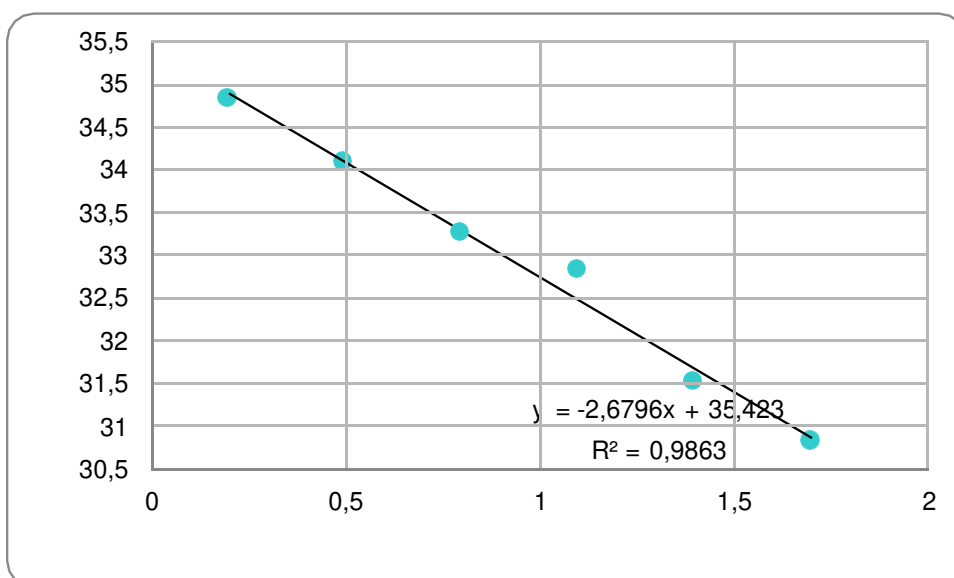


Fig. Sup. 2 – Curva padrão de eficiência dos *primers lpl* (tabela 3).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adame-Gómez, R., Castro-Alarcón, N., Vences-Velázquez, A., Toribio-Jiménez, J., Pérez-Valdespino, A., Leyva-Vázquez, M. A., Ramírez-Peralta, A. Genetic Diversity and Virulence Factors of *S. aureus* Isolated from Food, Humans, and Animals (2020). *International Journal of Microbiology*, 1048097. doi: 10.1155/2020/1048097
- Allard, M., Moisan, H., Brouillette, E., Gervais, A. L., Jacques, M., Lacasse, P., Diarra, M. S., Malouin, F. Transcriptional modulation of some *Staphylococcus aureus* iron-regulated genes during growth in vitro and in a tissue cage model in vivo (2006). *Microbes and Infection*, 8(7), 1679-1690. doi: 10.1016/j.micinf.2006.01.022
- Andersson, D. I., Hughes, D. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics (2014). *Nature Reviews Microbiology* 12, 465-478. doi: 10.1038/nrmicro3270
- Baba, T., Bae, T., Schneewind, O., Takeuchi, F., Hiramatsu, K. Genome sequence of *Staphylococcus aureus* strain Newman and comparative analysis of staphylococcal genomes: polymorphism and evolution of two major pathogenicity islands (2008). *Journal of Bacteriology*, 190(1), 300-310. doi: 10.1128/JB.01000-07
- Bal, A. M., Coombs, G. W., Holden, M. T. G., Lindsay, J. A., Nimmo, G. R., Tattevin, P., Skov, R. L. Genomic insights into the emergence and spread of international clones of healthcare-, community- and livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Blurring of the traditional definitions (2016). *Journal of Antimicrobial Resistance*, 6, 95-101. doi: 10.1016/j.jgar.2016.04.004
- Balasubramanian, D., Harper, L., Shopsin, B., Torres, V. J. *Staphylococcus aureus* pathogenesis in diverse host environments (2018). *Pathogens and Disease*, 75(1). doi: 10.1093/femspd/ftx005
- Beeken, K. E., Dunman, P. M., McAleese, F., Macapagal, D., Murphy, E., Projan, S. J., Blevins, J. S., Smeltzer, M. S. Global gene expression in *Staphylococcus aureus* (2004). *Journal of Bacteriology*, 186(14), 4665-4684. doi: 10.1128/JB.186.14.4665-4684.2004
- Bhatt, S., Chatterjee, S. Fluoroquinolone antibiotics: Occurrence, mode of action, resistance, environmental detection, and remediation – A comprehensive review (2022). *Environmental Pollution*, 315, 120440. doi: 10.1016/j.envpol.2022.120440
- Bo, L., Sun, H., Li, Y-D., Zhu, J., Wurfel, J. N. D., Lin, H., Chen, Z-S. Combating antimicrobial resistance: the silent war (2024). *Frontiers Pharmacology*, 15, 1347750. doi: 10.3389/fphar.2024.1347750
- Bonsaglia, E. C. R., Silva, N. C. C., Rossi, B. F., Camargo, C. H., Dantas, S. T. A., Langoni, H., Guimarães, F. F., Lima, F. S., Fitzgerald, J. R., Fernandes Júnior, A., Rall, V. L. M. Molecular epidemiology of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) isolated from milk of cows with subclinical mastitis (2018). *Microbial Pathogenesis*, 124, 130-135. doi: 10.1016/j.micpath.2018.08.031
- Braicu, C., Buse, M., Busuioc, C., Drula, R., Gulei, D., Raduly, L., Rusu, A., Irimie, A., Atanasov, A. G., Slaby, O., Ionescu, C., Berindan-Neagoe, I. A Comprehensive Review on MAPK: A Promising Therapeutic Target in Cancer (2019). *Cancers*, 11(10), 1618. doi: 10.3390/cancers11101618
- Campos, B., Pickering, A. C., Rocha, L. S., Aguilar, A. P., Fabres-Klein, M. H., Mendes, T. A. O., Fitzgerald, J. R., Ribon, A. O. B. *et al.* Diversity and pathogenesis of *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis: current understanding and future perspectives (2022). *BMC Veterinary Research* 18, 115. doi: 10.1186/s12917-022-03197-5
- Chen, J., Zhou, H., Huang, J., Zhang, R., Rao, X. Virulence alterations in *Staphylococcus aureus* upon treatment with the sub-inhibitory concentrations of antibiotics (2021). *Journal of Advanced Research*, 31, 165-175. doi: 10.1016/j.jare.2021.01.008

- Chen, H., Zhang, J., He, Y., Lv, Z., Liang, Z., Chen, J., Li, P., Liu, J., Yang, H., Tao, A., Liu, X. Exploring the role of *Staphylococcus aureus* in inflammatory diseases (2022). *Toxins*, 14(7), 464. doi: 10.3390/toxins14070464
- Cheng, W. N., Han, S. G. Bovine mastitis: risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments — A review (2020). *Asian-Australian Journal of Animal Science*, 33(11), 1699-1713. doi: 10.5713/ajas.20.0156
- Cheung, G. Y. C., Bae, J. S., Otto, M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus* (2021). *Virulence*, 12(1), 547-569. doi: 10.1080/21505594.2021.1878688
- Ching, C., Orubu, E. S. F., Sutradhar, I., Wirtz, V. J., Boucher, H. W., Zaman, M. H. Bacterial antibiotic resistance development and mutagenesis following exposure to subinhibitory concentrations of fluoroquinolones *in vitro*: a systematic review of the literature (2020). *JAC – Antimicrobial Resistance*, 2(3). doi: 10.1093/jacamr/dlaa068
- Choudhary, K. S., Mih, N., Monk, J., Kavvas, E., Yurkovich, J. T., Sakoulas, G., Palsson, B. O. The *Staphylococcus aureus* Two-Component System AgrAC Displays Four Distinct Genomic Arrangements That Delineate Genomic Virulence Factor Signatures (2018). *Frontiers in Microbiology*, 9. doi: 10.3389/fmicb.2018.01082
- Côte-Gravel, J., Malouin, F. Features of *Staphylococcus aureus* mastitis pathogenesis that guide vaccine development strategies (2019). *Journal of Dairy Science*, 102(5), 4727-4740. doi: 10.3168/jds.2018-15272
- Cruz, A. R., van Strijp, J. A. G., Bagnoli, F., Manetti, A. G. O. Virulence Gene Expression of *Staphylococcus aureus* in Human Skin (2021). *Frontiers in Microbiology*, 12. doi: 10.3389/fmicb.2021.692023
- Davies, J., Spiegelman, G. B., Yim, G. The world of subinhibitory antibiotic concentrations (2006). *Current Opinion in Microbiology*, 9(5), 445-453. doi: 10.1016/j.mib.2006.08.006
- Diarra, M. S., Petitclerc, D., Lacasse, P. Response of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis to exogenous iron sources (2002). *Journal of Dairy Science*, 85(9), 2141-2148. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(02)74292-6
- Fitzgerald, J. R. Livestock-associated *Staphylococcus aureus*: origin, evolution and public health threat (2012). *Trends in Microbiology*, 20(4), 192-198. doi: 10.1016/j.tim.2012.01.006
- Gao, P., Wei, Y., Wan, R. E., Wong, K. W., Iu, H. T. V., Tai, S. S. C., Li, Y., Yam, H. C. B., Halebeedu Prakash, P., Chen, J. H. K., Ho, P. L., Yuen, K. Y., Davies, J., Kao, R. Y. T. Subinhibitory Concentrations of Antibiotics Exacerbate Staphylococcal Infection by Inducing Bacterial Virulence (2022). *Microbiology Spectrum*, 10(4). doi: 10.1128/spectrum.00640-22
- Grumann, D., Nübel, U., Bröker, B. M. *Staphylococcus aureus* toxins – Their functions and genetics (2014). *Infection, Genetics and Evolution*, 21, 583-592. doi: 10.1016/j.meegid.2013.03.013
- Goc, A., Sumera, W., Rath, M., Niedzwiecki, A. Inhibition of α -hemolysin activity of *Staphylococcus aureus* by theaflavin 3,3'-digallate (2023). *PLoS One*, 18(8), e0290904. doi: 10.1371/journal.pone.0290904
- Gonçalves, M. S., Dorneles, E. M. S., Heinemann, M. B., Paiva e Brito, M. A. V., Guimarães, A. S. Genetic diversity and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Minas Gerais, Brazil (2023). *Ciência Rural*, 53(3). doi: 10.1590/0103-8478cr20210643
- Gunther, J., Petzl, W., Bauer, I., Ponsuksili, S., Zerbe, H., Schuberth, H. J., Brunner, R. M., Seyfert, H. M. Differentiating *Staphylococcus aureus* from *Escherichia coli* mastitis: *S. aureus* triggers unbalanced immune-dampening and host cell invasion immediately

- after udder infection (2017). *Scientific Reports*, 7(1), 4811. doi: 10.1038/s41598-017-05107-4
- Guo, Y., Song, G., Sun, M., Wang, J., Wang, Y. Prevalence and therapies of antibiotic-resistance in *Staphylococcus aureus* (2020). *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 107. doi: 10.3389/fcimb.2020.00107
- Haddadin, R. N. S., Saleh, S., Al-Adham, I. S., Buultjens, T. E., Collier, P. J. The effect of subminimal inhibitory concentrations of antibiotics on virulence factors expressed by *Staphylococcus aureus* biofilms (2010). *Journal of Applied Microbiology*, 108(4), 1281-1291. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04529.x
- Haxhiaj, K., Wishart, D. S., Ametaj, B. N. Mastitis: What it is, current diagnostics, and the potential of metabolomics to identify new predictive biomarkers (2022). *Dairy*, 3(4), 722-746. doi: 10.3390/dairy3040050
- Hoekstra, J., Zomer, A. L., Rutten, V. P. M. G., Benedictus, L., Stegeman, A., Spaninks, M. P., Bennedsgaard, T. W., Biggs, A., De Vlieghe, S., Mateo, D. H., Huber-Schlenstedt, R., Katholm, J., Kovács, P., Krömker, V., Lequeux, G., Moroni, P., Pinho, L., Smulski, S., Supré, K., Swinkels, J. M., Holmes, M. A., Lam, T. J. G. M., Koop, G. Genomic analysis of European bovine *Staphylococcus aureus* from clinical versus subclinical mastitis (2020). *Scientific Reports*, 10(1), 18172. doi: 10.1038/s41598-020-75179-2
- Hodille, E., Rose, W., Diep, B. A., Goutelle, S., Lina, G., Dumitrescu, O. The Role of Antibiotics in Modulating Virulence in *Staphylococcus aureus* (2017). *Clinical Microbiology Reviews*, 30(4), 887-917. doi: 10.1128/cmr.00120-16
- Hommel, J. W., Surewaard, B. G. J. Intracellular habitation of *Staphylococcus aureus*: molecular mechanisms and prospects for antimicrobial therapy (2022). *Biomedicines*, 8(8), 1804. doi: 10.3390/biomedicines10081804
- Howden, B. P., Giulieri, S.G., Wong Fok Lung, T., Baines, S. L., Sharkey, L. K., Lee, J. Y. H., Hachani, A., Monk, I. R., Stinear, T. P. *Staphylococcus aureus* host interactions and adaptation (2023). *Nature Reviews in Microbiology*, 21, 380-395. doi: 10.1038/s41579-023-00852-y
- Jenul, C., Horswill, A. R. Regulation of *Staphylococcus aureus* Virulence (2019). *Microbiology Spectrum*, 7(2). doi: 10.1128/microbiolspec.gpp3-0031-2018
- Jong, N. W. M., Kessel, K. P. M., Strijp, J. A. G. Immune Evasion by *Staphylococcus aureus* (2019). *Microbiology Spectrum*, 7(2). doi: 10.1128/microbiolspec.gpp3-0061-2019
- Kopparapu, P. K., Deshmukh, M., Hu, Z., Mohammad, M., Maugeri, M., Götz, F., Valadi, H., Jin, T. Lipoproteins are responsible for the pro-inflammatory property of *Staphylococcus aureus* extracellular vesicles (2021). *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13), 7099. doi: 10.3390/ijms22137099
- Kotra, L. P., Haddad, J., Mobashery, S. Aminoglycosides: Perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance (2000). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(12), 3249–3256. doi: 10.1128/aac.44.12.3249-3256.2000
- Krause, K. M., Serio, A. W., Kane, T. R., Connolly, L. E. Aminoglycosides: An Overview (2016). *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(6), a027029. doi: 10.1101/cshperspect.a027029
- Kurokawa, K., Kim, M. S., Ichikawa, R., Ryu, K. H., Dohmae, N., Nakayama, H., Lee, B. L. Environment-mediated accumulation of diacyl lipoproteins over their triacyl counterparts in *Staphylococcus aureus* (2012). *Journal of Bacteriology*, 194(13), 3299–3306. doi: 10.1128/JB.00314-12
- Lammers, A., Kruijt, E., van de Kuijt, C., Nuijten, P. J. M., Smith, H. E. Identification of *Staphylococcus aureus* genes expressed during growth in milk: a useful model for selection of genes important in bovine mastitis? (2022). *Microbiology Society*, 146(4), 981-987. doi: 10.1099/00221287-146-4-981

- Laureti, L., Matic, I., Gutierrez, A. Bacterial Responses and Genome Instability Induced by Subinhibitory Concentrations of Antibiotics (2013). *Antibiotics*, 2(1), 100-114. doi: 10.3390/antibiotics2010100
- Le, K. Y., Otto, M. Quorum-sensing regulation in staphylococci—an overview (2015). *Frontiers Microbiology*, 6. doi: 10.3389/fmicb.2015.01174
- Lima, L. M., Silva, B. N. M., Barbosa, G., Barreiro, E. J. β -lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective (2020). *European Journal of Medicinal Chemistry*, 208, 112829. doi: 10.1016/j.ejmech.2020.112829
- Linz, M. S., Mattappallil, A., Finkel, D., Parker, D. Clinical Impact of *Staphylococcus aureus* Skin and Soft Tissue Infections (2023). *Antibiotics*, 12(3), 557. doi: 10.3390/antibiotics12030557
- Lister, J. L., Horswill, A. R. *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal (2014). *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4, 178. doi: 10.3389/fcimb.2014.00178
- Liu, B., Li, Q., Gong, Z., Zhao, J., Gu, B., Feng, S. *Staphylococcus aureus* lipoproteins play crucial roles in inducing inflammatory responses and bacterial internalization into bovine mammary epithelial cells (2022). *Microbial Pathogenesis*, 162, 105364. doi: 10.1016/j.micpath.2021.105364
- Loss, G., Simões, P. M., Valour, F., Cortês, M. F., Gonzaga, L., Bergot, M., Trouillet-Assant, S., Josse, J., Diot, A., Ricci, E., Vasconcelos, A. T., Laurent, F. *Staphylococcus aureus* Small Colony Variants (SCVs): news from a chronic prosthetic joint infection (2019). *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9, 363. doi: 10.3389/fcimb.2019.00363
- Maréchal, C. L., Jan, G., Even, S., McCulloch, J. A., Azevedo, V., Thiéry, R., Vautor, E., Le Loir, Y. Development of serological proteome analysis of mastitis by *Staphylococcus aureus* in ewes (2009). *Journal of Microbiological Methods*, 79(1), 131-136. doi: 10.1016/j.mimet.2009.08.017
- Mayer, K., Kucklick, M., Marbach, H., Ehling-Schulz, M., Engelmann, S., Grunert, T. Within-host adaptation of *Staphylococcus aureus* in a bovine mastitis infection is associated with increased cytotoxicity (2021). *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), 8840. doi: 10.3390/ijms22168840
- Mendes, T. A. O., Reis Cunha, J. L., de Almeida Lourdes, R., Rodrigues Luiz, G. F., Lemos, L. D., dos Santos, A. R., da Câmara, A. C., Galvão, L. M., Bern, C., Gilman, R. H., Fujiwara, R. T., Gazzinelli, R. T., Bartholomeu, D. C. Identification of strain-specific b-cell epitopes in *Trypanosoma cruzi* using genome-scale epitope prediction and high-throughput immunoscreening with peptide arrays (2013). *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(10), 524. doi: 10.1371/journal.pntd.0002524
- Mesak, L. R., Davies, J. Phenotypic changes in ciprofloxacin-resistant *Staphylococcus aureus* (2009). *Research in Microbiology*, 160(10), 785-791. doi: 10.1016/j.resmic.2009.09.013
- Miroux, B., Walker, J. E. Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels (1996). *Journal of Molecular Biology*, 260(3), 289-298. doi: 10.1006/jmbi.1996.0399
- Mohammad, M., Nguyen, M. T., Engdahl, C., Na, M., Jarneborn, A., Hu, Z., Karlsson, A., Pullerits, R., Ali, A., Götz, F., Jin, T. The YIN and YANG of lipoproteins in developing and preventing infectious arthritis by *Staphylococcus aureus* (2019). *PloS Pathogens*, 15(6). doi: 10.1371/journal.ppat.1007877
- Mohammad, M., Na, M., Hu, Z., Nguyen, M. T., Kopparapu, P. K., Jarneborn, A., Karlsson, A., Ali, A., Pullerits, R., Götz, F., Jin, T. *Staphylococcus aureus* lipoproteins promote

- abscess formation in mice, shielding bacteria from immune killing (2021). *Communications Biology* 4, 432. doi: 10.1038/s42003-021-01947-z
- Mohammad, M., Ali, A., Nguyen, M. T., Götz, F., Pullerits, R., Jin, T. *Staphylococcus aureus* lipoproteins in infectious diseases (2022). *Infectious Agents and Disease*, 13, 1006765. doi: 10.3389/fmicb.2022.1006765
- Moormeier, D. E., Bayles, K. W. *Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism (2017). *Molecular Microbiology*, 104(3), 365-376. doi: 10.1111/mmi.13634
- Morales-Ubaldo, A. L., Rivero-Perez, N., Valladares-Carranza, B., Velázquez-Ordoñez, V., Delgadillo-Ruiz, L., Zaragoza-Bastida, A. Bovine mastitis, a worldwide impact disease: Prevalence, antimicrobial resistance, and viable alternative approaches (2023). *Veterinary and Animal Science*, 21, 100306. doi: 10.1016/j.vas.2023.100306
- Murphy, M. P., Niedziela, D. A., Leonard, F. C., Keane, O. M. The *in vitro* host cell immune response to bovine-adapted *Staphylococcus aureus* varies according to bacterial lineage (2019). *Scientific Reports* 9, 6134. doi: 10.1038/s41598-019-42424-2
- Nguyen, M-T., Peisl, L., Barletta, F., Luqman, A., Götz, F. Toll-Like Receptor 2 and lipoprotein-like lipoproteins enhance *Staphylococcus aureus* invasion in epithelial cells (2018). *Infection and Immunity*, 86(8). doi: 10.1128/IAI.00343-18
- Nguyen, M-T., Uebele, J., Kumari, N., Nakayama, H., Peter, L., Ticha, O., Woischnig, A. K., Schmalzer, M., Khanna, N., Dohmae, N., Lee, B. L., Bekeradjian-Ding, I., Götz, F. Lipid moieties on lipoproteins of commensal and non-commensal staphylococci induce differential immune responses (2017). *Nature Communications* 8(1), 2246. doi: 10.1038/s41467-017-02234-4
- Nguyen, M-T., Matsuo, M., Niemann, S., Herrmann, M., Götz, F. Lipoproteins in gram-positive bacteria: abundance, function, fitness (2020). *Infectious Agents and Disease*, 11, 582582. doi: 10.3389/fmicb.2020.582582
- Nguyen, M-T., Kraft, B., Yu, W., Demircioglu, D. D., Hertlein, T., Burian, M., Schmalzer, M., Boller, K., Bekeradjian-Ding, I., Ohlsen, K., Schitteck, B., Götz, F. The vSaa specific lipoprotein like cluster (*Lpl*) of *S. aureus* USA300 contributes to immune stimulation and invasion in human cells (2015). *PloS Pathogens*, 11(6). doi: 10.1371/journal.ppat.1004984
- Ohlsen, K., Ziebuhr, W., Koller, K. P., Hell, W., Wichelhaus, T. A., Hacker, J. Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on alpha-toxin (*hla*) gene expression of methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates (1998). *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 42(11), 2817-2823. doi: 10.1128/AAC.42.11.2817
- Olatunji, S., Yu, X., Bailey, J., Huang, C. Y., Zapotoczna, M., Bowen, K., Remškar, M., Müller, R., Scanlan, E. M., Geoghegan, J. A., Olieric, V., Caffrey, M. Structures of lipoprotein signal peptidase II from *Staphylococcus aureus* complexed with antibiotics globomycin and myxovirescin (2020). *Nature Communications* 11, 140. doi: 10.1038/s41467-019-13724-y
- Otto, M. P., Martin, E., Badiou, C., Lebrun, S., Bes, M., Vandenesch, F., Etienne, J., Lina, G., Dumitrescu, O. Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on virulence factor expression by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (2013). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(7), 1524–1532. doi: 10.1093/jac/dkt073
- Pedersen, R. R., Krömker, V., Bjarnsholt, T., Dahl-Pedersen, K., Buhl, R., Jørgensen, E. Biofilm research in bovine mastitis (2021). *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 656810. doi: 10.3389/fvets.2021.656810
- Pérez, V. K. C., Costa, G. M. D., Guimarães, A. S., Heinemann, M. B., Lage, A. P., Dorneles, E. M. S. Relationship between virulence factors and antimicrobial resistance

- in *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis (2020). *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 22, 792-802. doi: 10.1016/j.jgar.2020.06.010
- Prystopiuk, V., Feuillie, C., Herman-Bausier, P., Viela, F., Alsteens, D., Pietrocola, G., Speziale, P., Dufrêne, Y. F. Mechanical forces guiding *Staphylococcus aureus* cellular invasion (2018). *ACS Nano*, 12(4), 3609-3622. doi: 10.1021/acsnano.8b00716
- RATLEDGE, C., DOVER, L. G. Iron Metabolism in Pathogenic Bacteria (2000). *Annual Review of Microbiology*, 54(1), 881-941. doi: 10.1146/annurev.micro.54.1.881
- Rocha, L. S., Silva, D. M., Silva, M. P., Vidigal, P. M. P., Silva, J. C. F., Guerra, S. T., Ribeiro, M. G., Mendes, T. A. O., Ribon, A. O. B. Comparative genomics of *Staphylococcus aureus* associated with subclinical and clinical bovine mastitis (2019). *Plos One*, 14(8). doi: 10.1371/journal.pone.0220804
- Rossi, B. F., Bonsaglia, E. C. R., Castilho, I. G., Dantas, S. T. A., Salina, A., Langoni, H., Pantoja, J. C. F., Budri, P. E., Fitzgerald-Hughes, D., Júnior, A. F., Rall, V. L. M. Genotyping of long-term persistent *Staphylococcus aureus* in bovine subclinical mastitis (2019). *Microbial Pathogenesis*, 132, 45-50. doi: 10.1016/j.micpath.2019.04.031
- Sabino, Y. N. V., Cotter, P. D., Mantovani, H. C. Anti-virulence compounds against *Staphylococcus aureus* associated with bovine mastitis: A new therapeutic option? (2023). *Microbiological Research*, 271, 127345. doi: 10.1016/j.micres.2023.127345
- Schilcher, K., Horswill, A. R. Staphylococcal biofilm development: structure, regulation, and treatment strategies (2020). *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 84(3). doi: 10.1128/MMBR.00026-19
- Schmaler, M., Jann, N. J., Ferracin, F., Landolt, L. Z., Biswas, L., Götz, F., Landmann, R. Lipoproteins in *Staphylococcus aureus* mediate inflammation by TLR2 and iron-dependent growth *in vivo* (2009). *The Journal of Immunology*, 182(11), 7110-7118. doi: 10.4049/jimmunol.0804292
- Selan, L., Vrenna, G., Ettore, E., Papa, R., Artini, M. Virulence of MRSA USA300 is enhanced by sub-inhibitory concentration of two different classes of antibiotics (2018). *Journal of Chemotherapy*, 30(6-8), 384-388. doi: 10.1080/1120009X.2018.1533085
- Shahmirzadi, S. V., Nguyen, M-T., Gotz, F. Evaluation of *Staphylococcus aureus* lipoproteins: role in nutritional acquisition and pathogenicity (2016). *Infectious Agents and Disease*, 7, 1404. doi: 10.3389/fmicb.2016.01404
- Shang, W., Rao, Y., Zheng, Y., Yang, Y., Hu, Q., Hu, Z., Yuan, J., Peng, H., Xiong, K., Tan, L., Li, S., Zhu, J., Li, M., Hu, X., Mao, X., Rao, X. β -Lactam Antibiotics Enhance the Pathogenicity of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* via SarA-Controlled Lipoprotein-Like Cluster Expression (2019). *mBio*, 10(3). doi: 10.1128/mbio.00880-19
- Silva, Mônica Pacheco. Identificação e Caracterização de estirpes de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* associadas às mastites bovinas persistente e não persistente. Tese (Doutorado em Bioquímica Aplicada) – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2015.
- Singh, R. K., Singh, D., Yadava, A., Srivastava, A. K. Molecular fossils “pseudogenes” as functional signature in biological system (2020). *Genes Genomics*, 42(6), 619-630. doi: 10.1007/s13258-020-00935-7
- Sinha, B., François, P. P., Nüsse, O., Foti, M., Hartford, O. M., Vaudaux, P., Foster, T. J., Lew, D. P., Herrmann, M., Krause, K. H. Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasin via fibronectin bridging to integrin $\alpha 5\beta 1$ (1999). *Cellular Microbiology*, 1(2), 101-117. doi: 10.1046/j.1462-5822.1999.00011.x.

- Skaar, E. P., Schneewind, O. Iron-regulated surface determinants (Isd) of *Staphylococcus aureus*: stealing iron from heme (2004). *Microbes and Infection*, 6(4), 390-397. doi: 10.1016/j.micinf.2003.12.008
- Soe, Y. M., Bedoui, S., Stinear, T. P., Hachani, A. Intracellular *Staphylococcus aureus* and host cell death pathways (2020). *Cellular Microbiology*, 23(5), e13317. doi: 10.1111/cmi.13317
- Stoll, H., Dengjel, J., Nerz, C., Götz, F. *Staphylococcus aureus* deficient in lipidation of prelipoproteins is attenuated in growth and immune activation (2005). *Infection and Immunity*, 74(4), 2411-2423. doi: 10.1128/IAI.73.4.2411-2423.2005
- Strobel, M., Pförtner, H., Tuchscher, L., Völker, U., Schmidt, F., Kramko, N., Schnittler, H. J., Fraunholz, M. J., Löffler, B., Peters, G., Niemann, S. Post-invasion events after infection with *Staphylococcus aureus* are strongly dependent on both the host cell type and the infecting *S. aureus* strain (2016). *Clinical Microbiology and Infection*, 22(9), 799-809. doi: 10.1016/j.cmi.2016.06.020
- Tam, K., Torres, V. J. *Staphylococcus aureus* Secreted Toxins and Extracellular Enzymes (2019). *Microbiology Spectrum*, 7(2). doi: 10.1128/microbiolspec.gpp3-0039-2018
- Tavares, A., Nielsen, J. B., Boye, K., Rohde, S., Paulo, A. C., Westh, H., Schønning, K., de Lencastre, H., Miragaia, M. Insights into Alpha-Hemolysin (Hla) Evolution and Expression among *Staphylococcus aureus* Clones with Hospital and Community Origin (2014). *PLoS One*, 9(4). doi: 10.1371/journal.pone.0098634
- Turner, F., Alatraktchi, F. A. Need for standardization in sub-lethal antibiotics research (2023). *Frontiers Microbiology*, 14. doi: 10.3389/fmicb.2023.1299321
- Tong, S. Y. C., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L., Fowler, V. G. Jr. *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management (2015). *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3). doi: 10.1128/cmr.00134-14
- Tribelli, P. M., Luqman, A., Nguyen, M-T., Madlung, J., Fan, S. H., Macek, B., Sass, P., Bitschar, K., Schitteck, B., Kretschmer, D., Götz, F. *Staphylococcus aureus* Lpl protein triggers human host cell invasion via activation of Hsp90 receptor (2020). *Cellular Microbiology*, 22(1). doi: 10.1111/cmi.13111
- Xie, J., Li, Y., Liu, X., Zhao, Y., Li, B., Ingvarsson, P. K., Zhang, D. Evolutionary Origins of Pseudogenes and Their Association with Regulatory Sequences in Plants (2019). *The Plant Cell*, 31(3), 563-576. doi: 10.1105/tpc.18.00601
- Wanderburg, J. B., Williams, W. A., Missiakas, D. Host defenses against *Staphylococcus aureus* infection require recognition of bacterial lipoproteins (2006). *PNAS*, 103(37), 13831-13836 doi: 10.1073/pnas.0603072103.
- Wang, M., Wang, Y., Wang, M., Liu, M., Cheng, A. Heme acquisition and tolerance in Gram-positive model bacteria: An orchestrated balance (2023). *Heliyon*, 9(7), e18233. doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e18233
- Zaatout, N., Ayachi, A., Kecha, M. Interaction of primary mammary bovine epithelial cells with biofilm-forming staphylococci associated with subclinical bovine mastitis (2019). *Iranian Journal of Veterinary Research*, 20(1), 27-32.
- Zaatout, N., Ayachi, A., Kecha, M. *Staphylococcus aureus* persistence properties associated with bovine mastitis and alternative therapeutic modalities (2020). *Journal of Applied Microbiology*, 129(5), 1102-1119. doi: 10.1111/jam.14706.
- Zhang, G., Zhao, Y., Hayes, A. J., Psaltis, A. J., Wormald, P. J., Vreugde, S. *Staphylococcus aureus* small colony variants: Prevalence in chronic rhinosinusitis and induction by antibiotics (2010). *European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 73(12), 2403-2405. doi: 10.1111/all.13580

Yin, W., Wang, Y., Liu, L., He, J. Biofilms: the microbial “protective clothing” in extreme environments (2019). *International Journal of Molecular Sciences*, 20(1), 3423. doi: 10.3390/ijms20143423