Universidade do Minho
Escola de Ciências

Romero Carlos de Albuquerque Lima Filho

Investigação da Ação de Bacteriófagos e Suas Enzimas Endolíticas no Controlo de *Enterococcus faecalis*

Julho de 2024

Investigação da Ação de Bacteriófagos e Suas Enzimas Endolíticas no Controlo de *Enterococcus faecalis*

Romero Carlos de Albuquerque Lima Filho

UMinho | 2024

Universidade do Minho
Escola de Ciências

Romero Carlos de Albuquerque Lima Filho

Investigação da Ação de Bacteriófagos e Suas Enzimas Endolíticas no Controlo de *Enterococcus faecalis*

Dissertação de Mestrado
Mestrado em Genética Molecular

Trabalho efetuado sob a orientação de
Doutor James Anthony Collins

e de

Doutora Diana Alexandra Rodrigues

Julho de 2024

Direitos de autor e condições de utilização do trabalho por terceiros

Este é um trabalho académico que pode ser utilizado por terceiros desde que respeitadas as regras e boas práticas internacionalmente aceites, no que concerne aos direitos de autor e direitos conexos.

Assim, o presente trabalho pode ser utilizado nos termos previstos na licença abaixo indicada.

Caso o utilizador necessite de permissão para poder fazer um uso do trabalho em condições não previstas no licenciamento indicado, deverá contactar o autor, através do RepositóriUM da Universidade do Minho.

Título da dissertação: Investigação da Ação de Bacteriófagos e Suas Enzimas Endolíticas no Controlo de *Enterococcus faecalis*

Orientadores: Doutor James Anthony Collins e Doutora Diana Alexandra Rodrigues

Ano de conclusão: 2024

Mestrado em Genética Molecular

Licença concedida aos utilizadores deste trabalho



Atribuição

CC BY

https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

Universidade do Minho, 29 de julho de 2024

Agradecimentos

Esta dissertação foi produto de trabalho duro a qual só foi possível graças a ajuda de incontaveis pessoas, das quais deixo meu profundo agradecimento no texto a seguir.

Primeiramente gostaria de agradecer ao Doutor Tony Collins, a doutora Diana Alexandra e a doutora Joana Azeredo pela oportunidade de viabilização do projeto, por terem estado comigo em todas as fases. Em especial meus orientadores, o Doutor Tony Collins e a doutora Diana Alexandra, os quais também sou grato pelo valoroso conhecimento compartilhado e pelos acalourados debates a cerca do tema. Sinto que foram duas pessoas que enrriqueceram bastante o meu lexico de conhecimento.

Aos meus colegas do LBM, Diogo Felix e Diogo Ferreira agradeço-os por terem me ajudado com minhas duvidas laborais quanto com questões pessoais.

E por ultimo gostaria de agradecer aos meus familiares, em especial minha mãe Maria Elza, meu irmão Matheus Galliza e a minha amada avó Anita da Silbeira Barros. Pois estes são e serão os pilares da minha existencia.

Declaração de Integridade

Declaro ter atuado com integridade na elaboração do presente trabalho académico e confirmo que não recorri à prática de plágio nem a qualquer forma de utilização indevida ou falsificação de informações ou resultados em nenhuma das etapas conducente à sua elaboração.
Mais declaro que conheço e que respeitei o Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

Resumo

A *Enterococcus faecalis* é uma bactéria Gram-positiva que habita o trato gastrointestinal humano, mas pode se tornar um patógeno oportunista. Está frequentemente associada a infecções endodônticas. Seu crescente papel como patógeno deve-se, em parte, à resistência intrínseca a antibioticos.

Essa resistência cria desafios no tratamento e na erradicação de *E. faecalis*, o que exige a busca por novas abordagens em tratamentos endodônticos. Atualmente os antibióticos são usados na endodontia para capeamento pulpar (tetraciclina), medicação intracanal (tetraciclina, clindamicina e neomicina), irrigação intracanal (doxiciclina), desinfecção do canal para revascularização pulpar (metronidazol, minociclina e ciprofloxacina) e em material obturador final (tetraciclina e metronidazol). Entretanto, em casos de infecção da polpa dentária, os antibióticos não são usados devido a resistência bacteriana do biofilme aos fármacos; sendo assim necessário realizar a remoção da polpa dentária (pulpectomia). Atualmente os bacteriófagos são estudados para transpassar a resistência antibiótica das bactérias.

Os bacteriófagos têm potencial para controlar infecções bacterianas, e suas enzimas hidrolíticas, chamadas endolisinas, podem degradar o peptidoglicano da parede celular bacteriana. Este estudo focou na ação do fago de *E. faecalis*, podovirus *vB_EfaP-Max (Max)*, em culturas simples e mistas, com *Staphylococcus. aureus (S. aureus)*. Resultados mostraram que, embora não houve redução significativa da *E.faecalis* na fase estacionária do crescimento bacteriano; na fase exponencial ele inibiu significativamente o crescimento de *E. faecalis*, especialmente em culturas mistas com *S. aureus*.

Estudos bioinformáticos dos genes de endolisinas dos fagos Max e do siphovirus *vB_EfaS-Zip (Zip)* indicaram que ambas endolisinas possuem um domínio catalítico do tipo amidase-2. Os genes de ambas as endolisinas foram clonados no vector de expressão pET28A e transformados em *E. coli* BL21(DE3) usando uma abordagem baseada numa recombinação homóloga in vivo. A produção em "batch" permitiu a produção com sucesso da endolisina do Zip em meio LB. Em contraste, não foi possível produzir a endolisina do Max sob nenhuma das condições de produção testadas.

Palavras-chave: *E. faecalis*, bacteriofagos, cultura mista, recombinação homologa da endolisina, produção de proteínas recombinantes

Abstract

Enterococcus faecalis is a Gram-positive bacterium that inhabits the human gastrointestinal tract but can become an opportunistic pathogen. It is frequently associated with endodontic infections, being found in up to 77% of unsuccessful root canal treatments.

Its intrinsic resistance to antibiotics creates challenges in the treatment and eradication of *E. faecalis*, which requires the search for new approaches in endodontic treatments. Currently, antibiotics are used in endodontics for pulp capping (tetracycline), intracanal medication (tetracycline, clindamycin and neomycin), intracanal irrigation (doxycycline), canal disinfection for pulp revascularisation (metronidazole, minocycline and ciprofloxacin) and in final obturator material (tetracycline and metronidazole). However, in cases of infection of the dental pulp, antibiotics are not used due to the bacterial resistance of the biofilm to the drugs; it is therefore necessary to remove the dental pulp (pulpectomy). Bacteriophages are currently being studied to overcome the antibiotic resistance of bacteria.

Bacteriophages have the potential to control bacterial infections, and their hydrolytic enzymes, called endolysins, can degrade the peptidoglycan of the bacterial cell wall. This study focused on the action of the *E. faecalis* phage, named Max, in single and mixed cultures (with S. aureus). Results showed that although there was no significant reduction in *E. faecalis* in the stationary phase of bacterial growth. it significantly inhibited the growth of *E. faecalis*, especially in mixed cultures with *S. aureus* in the exponential phase.

Bioinformatics studies of the endolysin genes of the Max and Zip phages indicated that both endolysins have a catalytic domain of the amidase-2 type. The genes for both endolysins were successfully cloned into the pET28A expression vector and transformed into *E. coli BL21*(DE3) using an approach based on homologous recombination in vivo. Batch production enabled Zip endolysin to be successfully produced in LB medium. In contrast, Max endolysin could not be made under any of the production conditions tested.

Key words: *E. faecalis*, bacteriophages, mixed culture, endolysin, homologus recombination, recombinant protein production

Índice

Direitos de autor e condições de utilização do trabalho por terceiros ii

Agradecimentos iii

Declaração de Integridade iv

Resumo v

Abstract vi

Índice vii

Abreviaturas 1

Lista de Figuras 2

Lista de Tabelas 3

1. Introdução 4

1.1 *Enterococcus faecalis* e a sua importância clínica 4

1.2 Relação entre *E. faecalis* e *S. aureus* 5

1.3 Resistência antibiótica 6

1.4 Bacteriófagos 7

1.5 Fagos de *Enterococcus faecalis* 12

1.6 Endolisina 14

1.7 Peptidoglicano 17

1.8 Produção de proteínas recombinantes 19

1.9 Objetivos do projeto 22

2. Metodologia 23

2.1 Estirpes bacterianas 23

2.2 Bacteriófagos 24

2.2.1 Produção 24

2.2.2 Purificação 25

2.2.3 Quantificação 25

2.3 Aplicação de fago para controlo de *E. faecalis* 25

2.3.1 Testes com culturas bacterianas em fase estacionária 25

2.3.2 Testes com culturas bacterianas em fase exponencial 26

2.4 Clonagem do gene de endolisina 26

2.4.1 Bioinformática: Análise da sequência 26

2.4. 2 Clonagem por Recombinação Homóloga 27

2.5 Produção de proteínas recombinantes 33

2.5.1 Transformação de *E.coli* BL21 (DE3) 33

2.6 Pré-processamento: sonicação 34
2.7 Análise por SDS-PAGE 35
2.7.1 SDS-PAGE 35
2.7.2 Preparação das amostras para analise em SDS-PAGE 35
2.7.3 Coloração do gel SDS-PAGE 36
2.8 Ensaio de atividade da endolisina 36
3. Resultados e discussão 36
3.1 Avaliação do crescimento bacteriano – cultura simples e cultura mista 37
3.2 Avaliação do efeito do fago Max – cultura simples e cultura mista 38
3.2.1 Culturas em fase estacionária 38
3.2.2 Culturas em fase exponencial 40
3.3 Clonagem genética da endolisina 43
3.3.1 Bioinformatica: análise da sequência 43
3.3.2 Clonagem por recombinação homologa 48
3.4 Produção da endolisina 53
5. Conclusão 56

Abreviaturas

Bp: “Base-pairs” (par de bases)

C: Citosina

°C: Graus Celcius

DO: Densidade Optica

ds: ADN de dupla cadeia

G: Guanina

g: Relativo à força de centrifugação

IPTG: Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo

Kan: Kanamicina

kb: Kilobases

LB: Meio Luria Bertani

PCR: “Polymerase chain reaction” (Reação de Cadeia de Polimerase)

RPMS: Rotações Por Minuto

SOC: “Super optimal broth with catabolite repression” (Meio optimal com repressão de catabolicos)

Tn: “Replicative Transposon” (Transposões Replicativos)

TSB: “Tryptic Soy Broth” (Meio de Soja Tríptico)

U: Unidades

UFC´s: Unidades Formadoras de Colonias

UFP´s: Unidades Formadoras de Placas

Van*:* Vancomicina

Lista de Figuras

Figura 1: Famílias de fagos conhecidas atualmente..... 9

Figura 2: Ciclo de vida dos bacteriófagos..... 11

Figura 3: Mecanismo de ação do T7SS..... 14

Figura 4: Arranjo dos domínios observados nas endolisinas..... 15

Figura 5: Local de atuação das endolisinas..... 16

Figura 6: Estrutura da parede celular de bactérias..... 18

Figura 7: Componentes do vetor de expressão pET28a..... 21

Figura 8: Estratégia usada para inserção do gene da endolisina ZIP em pET28a..... 31

Figura 9: Curva de crescimento da *E. faecalis*..... 37

Figura 10: Curva de crescimento da Cultura Mista (*E. faecalis* + *S. aureus*)..... 38

Figura 11: Testes com bacteriófagos em fase estacionária..... 40

Figura 12: Testes com bacteriófagos em fase exponencial..... 41

Figura 13: Identificação do local de clivagem..... 44

Figura 14: Análise pFAM e SMART da endolisina MAX..... 45

Figura 15: Análise pFAM e SMART da endolisina ZIP..... 46

Figura 16: Sequência de aminoácidos da endolisina Max com identificação dos domínios..... 47

Figura 17: Sequência de aminoácidos da endolisina ZIP com identificação dos domínios..... 48

Figura 18: PCR da endolisina ZIP..... 50

Figura 19: Eletroforese em gel de agarose de plasmídeos digeridos com *Nde*I de transformantes obtidos com as 4 condições diferentes de digestão com *Dpn*I..... 52

Figura 20: Curvas de crescimento para ZIP Endolysin-pET28a-*E. coli* BL21 (DE3)..... 54

Figura 21: Comparação por análise SDS-PAGE das frações celulares totais para as diferentes condições de produção..... 55

Lista de Tabelas

Tabela 1: Tabela sobre a resistência antibiótica da *E. faecalis*..... 7

Tabela 2: Condições usadas no PCR..... 28

Tabela 3: Várias condições utilizadas para a digestão *DpnI*..... 30

Tabela 4: Condições de incubação e indução usadas para produção da endolisina..... 34

Tabela 5: Composiçã dos geis SDS-PAGE..... 35

Tabela 6: Identificação de potenciais peptídeos de sinalização da endolisina MAX..... 43

Tabela 7: Sequências e composição dos "primers"..... 49

Tabela 8: Condições testadas para a digestão de *Dpn*I e número resultante de transformantes 51

1. Introdução

1.1 *Enterococcus faecalis* e a sua importância clínica

O corpo humano é colonizado por mais de 10^{12} bactérias (Batinovic *et al.*, 2019), a cavidade oral pode albergar cerca de 916 espécies bacterianas diferentes (Rodrigues Lima, 2017), de entre as quais apenas algumas podem formar biofilme oral e, eventualmente, infetar tecidos orais como a dentina, o periodonto e a polpa dentária (Santos *et al.*, 2011). Apesar da colossal quantidade de espécies bacterianas que colonizam a cavidade bucal, apenas um pequeno e seleto grupo de microrganismos podem infetar a cavidade pulpar (Rodrigues Lima, 2017), dado que a sobrevivência bacteriana intra-radicular depende de propriedades patogénicas que são influenciadas por uma combinação de fatores como: interação sinérgica entre espécies, a capacidade de interferir e evadir à resposta do hospedeiro, a libertação de endotoxinas e a síntese de enzimas prejudiciais aos tecidos do hospedeiro (Canato Martinho, 2011).

Entre as bactérias presentes numa infeção endodôntica, a *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis)* destaca-se por ser frequentemente encontrada em infeções secundárias persistentes associadas ao insucesso do tratamento endodôntico (El-Telbany *et al.*, 2021; Khalifa *et al.*, 2015, 2016; Nishio Ayre *et al.*, 2018; Shlezinger *et al.*, 2019), estando presente em 77% desses casos (Xiang *et al.*, 2020). *E. faecalis* é uma bactéria Gram-positiva anaeróbia facultativa e comporta-se como um microrganismo comensal *(Bolocan et al., 2019; El-Telbany et al., 2021; Khalifa et al., 2015, 2016; Nishio Ayre et al.*, 2018; Shlezinger *et al.*, 2019) que por vezes pode ser um patogénico oportunista (Bolocan *et al.*, 2019; Tagliaferri *et al.,* 2019). Para além das infeções orais, *E. faecalis* podem ser encontradas no intestino, trato urinário e órgãos reprodutores de humanos e animais (Xiang *et al.*, 2020). Dentro do género *Enterococcus* são conhecidas pelo menos 73 espécies, sendo a *E. faecalis* e a *E. faecium* as mais comuns no corpo humano (Li *et al.*, 2022) estando presentes em mais de 90% dos isolados bacterianos provenientes de amostras clínicas (sangue e outras amostras de locais infeciosos) (Bolocan *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2022).

A presença da *E. faecalis* em infeções endodônticas persistentes é justificada pela sua capacidade de formar biofilme nas paredes do canal radicular e dentro dos túbulos dentinários, aliada ao fato de a estrutura complexa do sistema de canais radiculares permitir a evasão bacteriana do sistema imunitário e de antibióticos (Shlezinger *et al.*, 2019; Xiang *et al.*, 2020). Outro fator importante a ser destacado sobre a *E. Faecalis* é a sua plasticidade genética, que lhe permite obter altos níveis de resistência antibiótica, culminando no comprometimento d e tratamentos clínicos (Bolocan *et al.,* 2019; El-Telbany *et al.*, 2021; Tagliaferri *et al.*, 2019). Tal

resistência antimicrobiana pode ser adquirida através de mutações pontuais ou por transferência horizontal de elementos genéticos, ou conjugação. Considera-se que a conjugação seja a forma mais comum de troca de elementos genéticos, seja por transposões conjugativos ou por transferência horizontal de plasmídeos (Alzahrani *et al.*, 2022; Li *et al.*, 2022).

1.2 Relação entre *E. faecalis* e *S. aureus*

Juntamente com a *E. faecalis*, a *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) é não só um microrganismo frequentemente encontrado em infeções pulpares mas também uma das principais causas do insucesso do tratamento endodôntico (Afami *et al.*, 2021). Para além de infeções orais, *E. faecalis* e *S. aureus* estão relacionadas a outras infeções associadas a biofilme, tais como infeções nosocomiais, endocardite, infeções do trato urinário e feridas crónicas. Ambas são frequentemente co-isoladas em feridas crónicas como úlceras de pé diabético, úlceras venosas das pernas e feridas por pressão (Ch'ng *et al.*, 2022). Tal como a *E. faecalis, S. aureus* também é uma bactéria Gram-positiva, anaeróbia facultativa (Li *et al.*, 2022; Tigabu & Getaneh, 2021). Dentro do corpo humano, a *S. aureus* encontra-se em ambientes polimicrobianos comportando-se principalmente como organismo comensal e patogénico oportunista (colonizando cerca de 30% dos humanos de maneira assintomática (Li *et al.*, 2022)), e pode produzir biofilmes robustos em superfícies abióticas e bióticas (Ch'ng *et al.*, 2022; Schilcher & Horswill, 2020).

O biofilme bacteriano consiste num arranjo dinâmico bacteriano, no qual os seus membros formam uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares. Essa configuração confere ao biofilme proteção contra tensões fisiológicas e químicas (incluindo fármacos), forças de resistência e predação. No que toca à ocupação do biofilme, os microrganismos são extremamente heterogéneos, apresentando níveis variáveis de atividade metabólica, realizando diversas interações entre espécies com caracter cooperativo ou antagónico (Ch'ng *et al.*, 2022; Luo *et al.*, 2022). Tal como outros microrganismos em biofilme, *E. faecalis* e *S. aureus* apresentam uma relação sinérgica, na qual promovem a troca de metabolitos para outros microorganismos (Ch'ng *et al.*, 2022; Gibson *et al.*, 2021; Kao *et al.*, 2023), o compartilham genes que transmitem resistência antibiótica ou imunitária (Ch'ng *et al.*, 2022; Kao *et al.*, 2023; Li *et al.*, 2022), ou a transferência de fatores de virulência entre membros da comunidade (Ch'ng *et al.*, 2022; Gibson *et al.*, 2021).

Apesar do biofilme ser o modo dominante da vida bacteriana, os microrganismos do biofilme apresentam padrões de comportamento diferentes daqueles observados em culturas planctónicas (Ch'ng *et al.*, 2022). Fora do contexto do biofilme bacteriano, os microrganismos

podem defender-se e também proteger o hospedeiro através da produção de agentes antimicrobianos que suprem a invasão de patogénicos que competem por recursos e/ou espaços (Gibson *et al.*, 2021). Quanto a *E. faecalis*, que é uma bactéria presente em várias microbiotas humanas (Xiang *et al.*, 2020), já foi reportada a sua capacidade de atuar contra bactérias invasoras (incluindo *S. aureus*) em defesa do hospedeiro e afim de evitar a escassez de recursos (Ford *et al.*, 2022; Kao *et al.*, 2023; LaPlante *et al.*, 2006).

1.3 Resistência antibiótica

Entre *E. faecalis* isoladas a partir de raízes dentárias infetadas, diversos são os genes que lhes conferem resistência antibiótica (El-Telbany *et al.*, 2021; Jain *et al.*, 2016). Esses genes de resistência são por sua vez transferidos e obtidos pela *E. faecalis* através da transferência de plasmídeos ou transposição conjugativa (Brooks *et al.*, 2022; Jain *et al.*, 2016; Torres *et al.*, 2018), sendo estes elementos genéticos móveis autónomos e os principais veículos de propagação da resistência para diversas bactérias (Rubio-Cosials *et al.*, 2018). Entre as *E. faecalis* resistentes a antibiótico(s), os transposões conjugativos mais encontrados são as famílias Tn916, Tn545 (Brooks *et al.*, 2022; Jain *et al.*, 2016; Torres *et al.*, 2018) e Tn1546 (Li *et al.*, 2022). Entre os genes que conferem a *E. faecalis* resistência antibiótica, o *tet*(M) confere ao seu hospedeiro resistência à tetraciclina (El-Telbany *et al.*, 2021; Jain *et al.*, 2016) e destaca-se dos restantes por estar presente em cerca de 42 géneros bacterianos obtidos de isolados endodônticos (Jain *et al.*, 2016) e em cerca de 53% das bactérias resistentes à tetraciclina, dentre as quais em metade delas o gene *tet*(M) estava localizado dentro do Tn916 (Jain *et al.*, 2016; Jungermann *et al.*, 2011). Entre estes isolados endodônticos, outro gene que também se destaca é o *van*A, que confere ao seu hospedeiro resistência a antibióticos glicopeptídicos como a vancomicina (Jain *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2022) e pode ser encontrado em Tn1546 *(Li et al.*, 2022). Esses mesmos métodos de aquisição de resistência antibiótica também podem ser observados em *S. aureus*, sendo inclusivé possível encontrar estirpes resistentes que possuem o gene *van*A situado em Tn1546 (Li *et al.*, 2022) e o gene *tet*(M) (que lhe confere resistência à tetraciclina) localizado em Tn916 *(Vries et al., 2009; Li et al.*, 2022). A Tabela 1 apresenta a prevalência de *E. faecalis* com resistência antibiótica que foram isoladas a partir de sangue de pacientes hospitalizados em diferentes regiões do mundo (Jabbari Shiadeh *et al.*, 2019).

Tabela 1. Prevalência combinada de resistência a diferentes antibióticos em *E. faecalis* isoladas a partir de sangue de pacientes hospitalizados em diferentes regiões do mundo.

Antibiótico	**Prevalência de Resistência (%)**
Gentamicina	89%
Vancomicina	88%
Ampicilina	48%
Ciprofloxacina	40%
Teicoplanina	41%
Linezolida	34%
Estreptomicina	35%
Cloranfenicol	30%
Eritromicina	27%
Penicilina	26%
Tetraciclina	21%
Levofloxacina	17%
Nitrofurantoína	14%
Daptomicina	11%
Quinupristina/dalfopristina	9%
Imipenem	6%
Amoxicilina/ácido clavulânico	5%
Tigeciclina	4%
Linezolida	4%
Norfloxacina	3%
Amicacina	2%

1.4 Bacteriófagos

Os bacteriófagos, ou fagos, são por vírus que parasitam bactérias e são constituídos por ácido nucleico (ADN ou ARN) e por um invólucro proteico denominado capsídeo (Moryl et al., 2022). Foram descobertos separadamente por dois investigadores no início do século XX, em 1915 (por Frederick Twort) e em 1917 (por Félix d'Herelle) (Clokie *et al.*, 2011; Ioannou *et al.*, 2023; Ofir & Sorek, 2018; Ryan *et al.*, 2012; Taati Moghadam *et al.*, 2020). Inicialmente foram utilizados para tratar infeções bacterianas na Europa durante a era pré-antibiótica. Contudo,

aquando do aparecimento dos antibióticos houve um declínio do interesse e na utilização dos fagos nos países ocidentais. As pesquisas sobre a terapia fágica foram continuadas pela União das Repúblicas Socialistas Soviéticas (Glonti & Pirnay, 2022; Ofir & Sorek, 2018; Ssekatawa *et al.*, 2021; Taati Moghadam *et al.*, 2020), que a utilizou para o tratamento de infeções bacterianas a partir de 1940 (Ofir & Sorek, 2018; Ssekatawa *et al.*, 2021; Taati Moghadam *et al.*, 2020).

Os bacteriófagos encontram-se em praticamente em todos os habitats do planeta, tais como solo, água, efluentes de esgoto e trato gastrointestinal de humanos e animais (Federici *et al.*, 2021; Taati Moghadam *et al.*, 2020). Ecologicamente, os fagos desempenham um papel fundamental no controlo e regulação da população bacteriana em vários habitats (Tanoeiro, 2021), dado que se estima que os bacteriófagos matem metade das bactérias globais a cada 48 horas (Oechslin *et al.*, 2022). Esta ostensiva presença faz deles a forma de vida mais abundante e as estimativas indicam que haja mais de 30 bilhões de partículas de bacteriófagos na biosfera (Batinovic *et al.*, 2019; Strathdee *et al.*, 2023),o que faz com que este seja o reservatório genético mais diversos do planeta *(Federici et al.*, 2021).

Os fagos são considerados os predadores naturais das bactérias, tendo co-evoluído com elas por quase 4 bilhões de anos (Strathdee *et al.*, 2023). Do ponto de vista genético possuem uma composição em mosaico, a qual resulta na ausência de genes fágicos universais, embora alguns genes individuais ou regiões genómicas possam ser encontrados em fagos não relacionados. A transferência horizontal de genes entre ancestrais não idênticos é o principal mediador da evolução fágica, de tal forma que por vezes fagos que infetam o mesmo hospedeiro exibem uma considerável diversidade genómica (Oechslin *et al.*, 2022).

Diante da omnipresença e subsequente eficiente adaptação a vários ecossistemas, os fagos apresentam morfologias muito diferentes entre si, com o seu tamanho variando entre 50–200 nm (Hatfull *et al.*, 2022). O tamanho do seu genoma pode variar entre 3,5 kb e 540 kb, sendo estruturalmente compostos por cadeias duplas ou simples de ADN (ssDNA, dsDNA), ou de ARN (ssRNA, dsRNA) (Zuppi *et al.*, 2022). Apesar disto, mais de 95% dos fagos isolados pertencem à ordem *Caudovirales* (Lopes *et al.*, 2014; Ofir & Sorek, 2018). É característico desta ordem possuir genomas lineares de ADN de cadeia dupla (dsDNA), o qual está envolvido numa cápsula (cabeça) que está ligada a uma cauda *(Lopes et al., 2014; Ofir & Sorek, 2018; Strathdee et al.*, 2023). A ordem dos *Caudovirales* pode ser dividida em quatro famílias tendo como base a morfologia da cauda - *Siphoviridae*, *Myoviridae*, *Podoviridae* e *CrAssphage*. (Federici *et al.*, 2021; Zuppi *et al.*,

2022) – tal como ilustrado na Figura 1. Os outros 5% dos fagos isolados pertencem à família de fagos com cadeia de ADN simples, como o *Microviridae* e *Inoviridae* (Zuppi *et al.*, 2022).

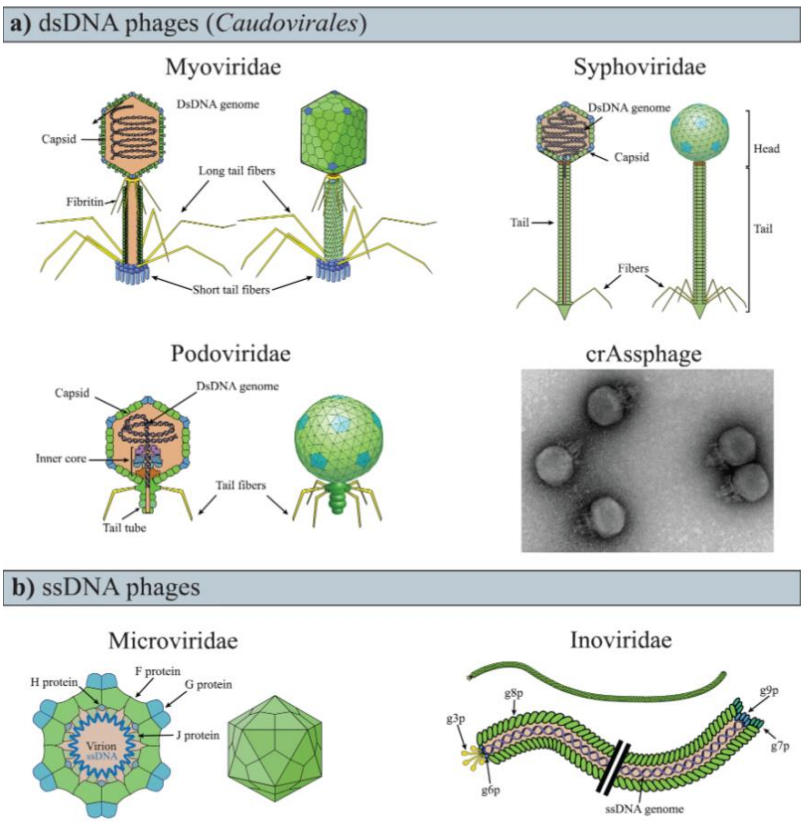


Figura 1. Famílias de fagos conhecidas até à data. (Zuppi *et al.*, 2022)

Quanto à infeção, os *Caudovirales* podem ser classificados em dois tipos: fagos líticos, que realizam ciclo lítico e possuem uma maior virulência; fagos temperados, que podem apresentar ciclo lisogénico ou ciclo lítico (Strathdee *et al.*, 2023). Assim como outros vírus, os bacteriófagos não possuem metabolismo próprio, sendo portanto obrigados a infetar um hospedeiro para se reproduzirem (Brady *et al.*, 2021; Clokie *et al.*, 2011; Federici *et al.*, 2021; Ssekatawa *et al.*, 2021; Strathdee *et al.*, 2023). Na primeira etapa de ambos os ciclos de infeção, os fagos ligam-se à bactéria hospedeira através da interação dos recetores bacterianos (tais como hidratos de carbono, lipopolissacáridos e proteínas (Batinovic *et al.*, 2019)) e a sua cauda (Federici *et al.*, 2021; Sørensen *et al.*, 2021; Ssekatawa *et al.,* 2021). Durante esta interação, a cápsula do fago permanece no exterior da célula (Federici *et al.*, 2021) enquanto que na cauda, proteínas chamadas "tail spikes" são usadas para identificação e adesão a recetores da célula hospedeira. As proteínas do fago que interagem com a bactéria costumam apresentar hidrolases de

peptidoglicano incorporadas, que hidrolisam o peptidoglicano da parede celular bacteriana, criando assim uma abertura local que permite injetar o genoma bacteriofágico, dando assim início ao processo de infeção (Sørensen *et al.*, 2021; Ssekatawa *et al.*, 2021). Esta interação fago-recetor do hospedeiro geralmente determina o espetro de ação dos bacteriófagos, de maneira tal que o reconhecimento de uma região altamente específica pode levara uma gama estreita de potenciais hospedeiros, podendo até estar restrita a apenas uma espécie ou estirpe (Batinovic *et al.*, 2019).

Uma vez localizado no citoplasma do hospedeiro, o material genético viral pode existir em dois estados principais e vir a desempenhar dois ciclos de vida - o ciclo litíco ou o ciclo lisogénico (Federici *et al.*, 2021). No ciclo lítico, o fago infecta a bactéria com o seu material genético e assume o controlo da maquinaria do hospedeiro, usando-a para produzir os componentes estruturais necessários para à sua reprodução (Brady *et al.*, 2021; Clokie *et al.*, 2011; Federici *et al.*, 2021; Ssekatawa *et al.*, 2021; Strathdee *et al.*, 2023). Na maioria dos fagos de dsADN, a lise do hospedeiro é uma ação coordenada por duas proteínas (Oechslin *et al.*, 2022). Numa primeira fase entram em ação as holinas, que são pequenas proteínas membranares que se acumulam na membrana do hospedeiro até ocorrer a lise. Perante o início do processo da lise celular, as holinas permeabilizam a membrana interna do hospedeiro permitindo a difusão das enzimas líticas, chamadas de endolisinas (Oechslin *et al.*, 2022; I.-N. Wang *et al.*, 2000). As endolisinas são hidrolases de peptidioglicano e são e utilizadas para degradar o peptidioglicano, rompendo a barreira celular e libertando as novas partículas fágicas no meio extracelular (Rahman *et al.*, 2021; Ssekatawa *et al.*, 2021).

No ciclo lisogénico o genoma do fago integra-se no cromossoma bacteriano, onde permanece em hibernação, replicando-se juntamente com o genoma bacteriano (Brady *et al.*, 2021; Clokie *et al.*, 2011; Federici *et al.*, 2021; Ssekatawa *et al.*, 2021; Strathdee *et al.*, 2023). Do ponto de vista do hospedeiro, os fagos temperados podem fornecer-lhes genes que codificam toxinas, genes virulentos e determinantes genéticos de resistência a antibióticos adquiridos de outros hospedeiros bacterianos (Ssekatawa *et al.*, 2021). Por outro lado, os genes necessários para o ciclo lítico são desligados, fazendo com que o fago seja estabelecido como um profago, no qual o fago existe apenas como componente genético no interior da bactéria. No estado profágico, o genoma viral pode estar integrado no genoma bacteriano ou existir extra cromossomicamente, num estado semelhante a um plasmídeo (Brady *et al.*, 2021; Strathdee *et al.*, 2023) Este ciclo de vida lisogénico pode acompanhar o hospedeiro durante milhares de gerações (Clokie *et al.*, 2011), podendo transformar o fenótipo da bactéria hospedeira e toda a sua descendência de estirpes

(Brady *et al.*, 2021; Clokie *et al.*, 2011; Ssekatawa *et al.*, 2021). As alterações fenotípicas podem incluir a ativação ou aumento da virulência bacteriana e/ou conferi-lhes resistência a antibióticos (Ssekatawa *et al.*, 2021).

Ao contrário dos fagos virulentos, que passam por um ciclo de vida estritamente lítico, os fagos temperados podem alternar o seu ciclo de vida entre ciclo lítico e lisogénico durante o decorrer da infeção *(Brady et al., 2021; Federici et al.*, 2021; Ssekatawa *et al.*, 2021; Strathdee *et al.*, 2023). Face ao stress microbiano que culmina em danos no ADN, os profagos percecionam esses danos como uma ameaça à sua própria estabilidade genómica e, em resposta, induzem a excisão do cromossoma bacteriano e iniciam o ciclo lítico (Brady *et al.*, 2021). A Figura 2 exemplifica os dois tipos de ciclos de vida dos fagos.

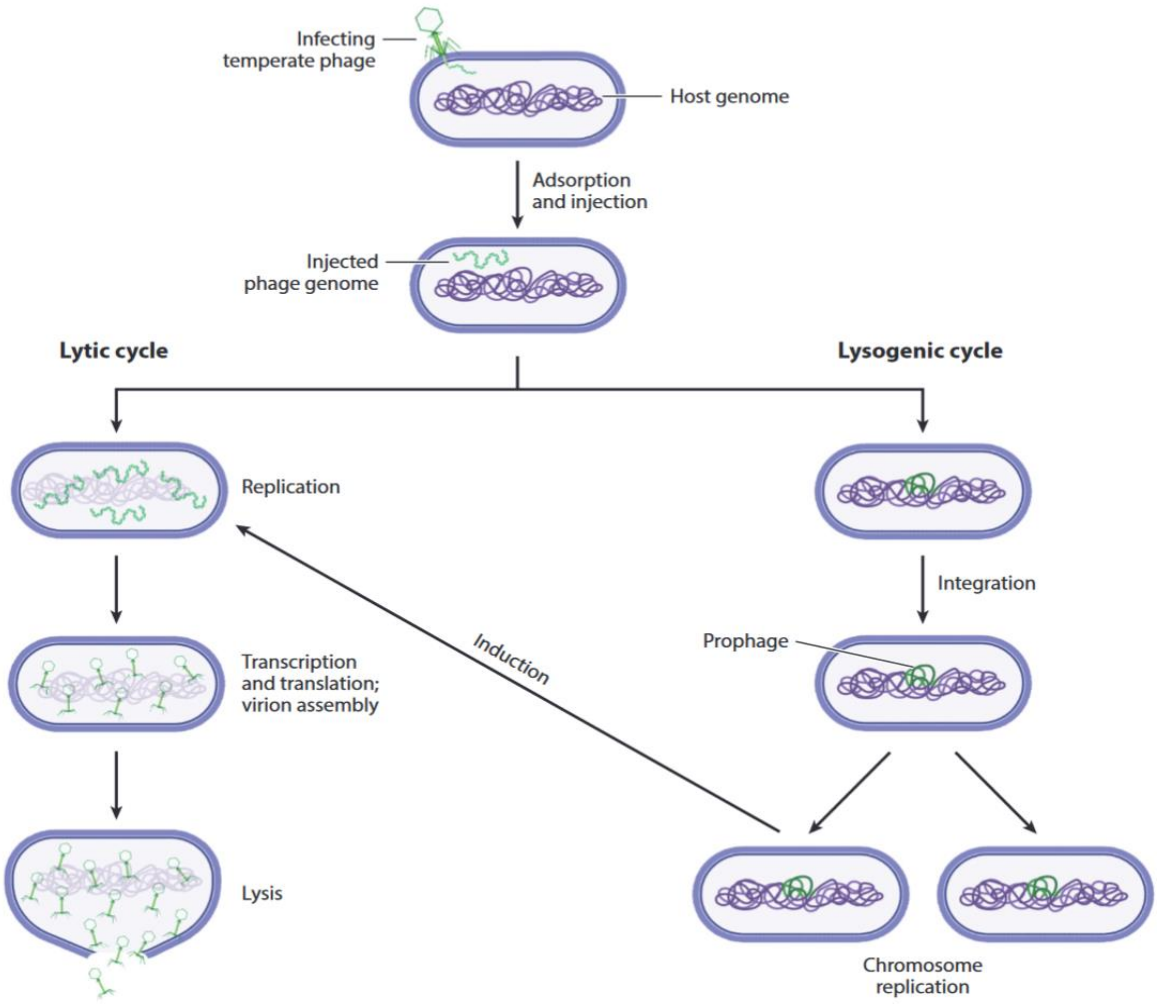


Figura 2. Ciclos de vida bacteriofágicos. (Brady *et al.*, 2021)

Diante do atual aumento de casos de bactérias patogénicas resistentes a antibióticos, a terapia bacteriofágica teve seu interesse renovado e vem sendo apresentada como uma alternativa eficaz para o controle de doenças infeciosas (Chatterjee *et al.*, 2020, 2021; Hatfull *et al.*, 2022; Ioannou *et al.*, 2023). Para além do uso medicinal, os fagos já são utilizados em alguns países na agricultura, aquacultura, segurança alimentar e tratamento de águas residuais (Ioannou *et al.*, 2023), enquanto no âmbito laboratorial são usados para de técnicas como "phage display" (Grabowski *et al.*, 2023). Em comparação com os antibióticos, os fagos são altamente específicos parasitando geralmente apenas uma estirpe bacteriana (o que pode ser um facto positivo ou negativo) (Zhang *et al.*, 2021). Com vista a contornar a limitação da sua gama de atuação, são utilizadas diferentes combinações entre diferentes fagos e/ou antibióticos. A combinação entre fagos e antibióticos mostra, em alguns casos, um efeito de sinergia entre o composto e o vírus, tendo esta estratégia sido amplamente validada *in vitro* e *in vivo*, o que constitui uma estratégia viável para evitar o desenvolvimento de bactérias resistentes (Federici *et al.*, 2021). Atualmente, algumas infeções podem ser objeto de tratamento por terapia fágica, tais como: otites crónicas, infeções de feridas crónicas, infeções pulmonares associadas à fibrose cística, osteomielite, infeções crónicas do trato urinário, entre outras (Abedon, 2019).

1.5 Fagos de *Enterococcus faecalis*

Segundo Bolocan (2019), já foram isolados mais de 52 fagos diferentes de *Enterococcus*, sendo que a maioria deles pertencem à ordem *Caudovirales* (Canfield & Duerkop, 2020; Viglasky *et al.*, 2023) e integram as famílias *Myoviridae*, *Podovirae* ou *Siphoviridae* (Bolocan *et al.*, 2019; Canfield & Duerkop, 2020; Lee *et al.*, 2019). Até agora todos os fagos de *Enterococcus* já isolados são provenientes da microflora humana (Canfield & Duerkop, 2020; Viglasky *et al.*, 2023), portanto o conhecimento existente sobre fagos de *Enterococcus* restringe-se a fagos de *E. faecalis* e *E. faecium* (Bolocan *et al.*, 2019). Tal facto sugere que a utilização de fagos de *E. faecalis* em humanos não deveria apresentar citotoxicidade às células eucariotas do organismo (Viglasky *et al.*, 2023). Quanto às enzimas bacteriofágicas, a análise genómica mostra que os fagos de *Enterococcus* dispõem de uma variedade de 8 holinas, 7 endolisinas (sendo a ami_2 a mais frequente) e 4 tipos de "Cell Biding Domain" (CBD), sendo que a maioria desses domínios é desconhecida. Com base nas comparações de sequências, foram observadas 21 configurações diferentes de proteínas e dos seus domínios em cassetes líticas. Além das diversas possibilidades que podem constituir os domínios enzimáticos, os fagos de enterococcus também podem realizar

"shuffling" de genes ou domínios, que podem aumentar o espectro de atuação e a eficácia do fago (Viglasky *et al.*, 2023).

Quanto aos fagos de *E. faecalis*, a análise genómica revela que o tamanho do seu genoma varia entre 15-150kb, e que os mesmos podem ser agrupados em 10 "clusters" distintos, caracterizados pelo tamanho do genoma, família do fago, quantidade de guaninas e citosinas contidas e morfologia (Bolocan *et al.*, 2019). A adsorção dos fagos pela *E. faecalis* é dependente de um exopolissacárido conservado, conhecido como antígeno polissacarídeo enterocócico, encontrado na superfície celular. Este exopolissacarídeo é sintetizado pelo gene *epa* e as suas mutações aparentam ser o principal mecanismo de resistência bacteriofágica desenvolvido pela *E. faecalis* (Canfield & Duerkop, 2020; Chatterjee *et al.*, 2020). Estudos apontam que a mutação da glicosiltransferase *epa*R proporciona resistência bacteriofágica a *E. faecalis* além de promover um aumento da sensibilidade ao antibiótico daptomicina e ao stress salino (Canfield & Duerkop, 2020); por outro lado a mutação reduz a suscetibilidade a antibióticos como a ceftriaxona e aos carbapenema (Singh & Murray, 2019).

Uma vez adsorvido o fago, a infeção em *E. faecalis* tem efeitos notáveis que transcendem a mera erradicação de seus hospedeiros bacterianos específicos (Chatterjee *et al.*, 2021). Em resposta à infeção fágica, a *E. faecalis* induz a expressão de genes envolvidos na biossíntese do sistema de secreção do tipo VIIb, conhecidos como T7SS (Chatterjee *et al.*, 2020, 2021). O sistema T7SS está amplamente distribuído entre as bactérias Gram-positivas, estando envolvido na ativação do sistema imunitário, na apoptose de células de mamíferos, no desenvolvimento e lise de células bacterianas, na transferência de ADN e nas interações bacterianas entre espécies (Chatterjee *et al.*, 2020). No filo *Firmicutes*, ao qual os *enterococcus* pertencem, o T7SS codifica proteínas transmembranares e citoplasmáticas envolvidas na secreção de substratos protéicos, e influenciam o antagonismo intra e inter-espécies através da produção de efetores antibacterianos e/ou toxinas. Tal antagonismo afeta algumas espécies Gram-positivas, como *S. aureus* e *Listeria monocytogenes*, mas não interfere com bactérias Gram-negativas (Chatterjee et al., 2021; Spencer & Doran, 2022). Entre as Firmicutes, o sistema T7SS apresenta-se de duas maneiras: T7SSa e T7SSb. Nas *E. faecalis* infetadas por fagos, a indução do sistema T7SSb exige a serina/treonina quinase IreK e um regulador da família aGntR. De um modo geral, em todas as espécies, o T7SSb parece ser induzido *in vivo*, em condições de stresse celular (infeção por fagos e antibióticos como daptomicina, os quais atacam a membrana celular da *E. faecalis*) (Spencer & Doran, 2022). A

Figura 3 demonstra como o sistema T7SS é extremamente útil para as bactérias, tanto para competir com outras bactérias como para se defenderem do sistema imunológico do hospedeiro.

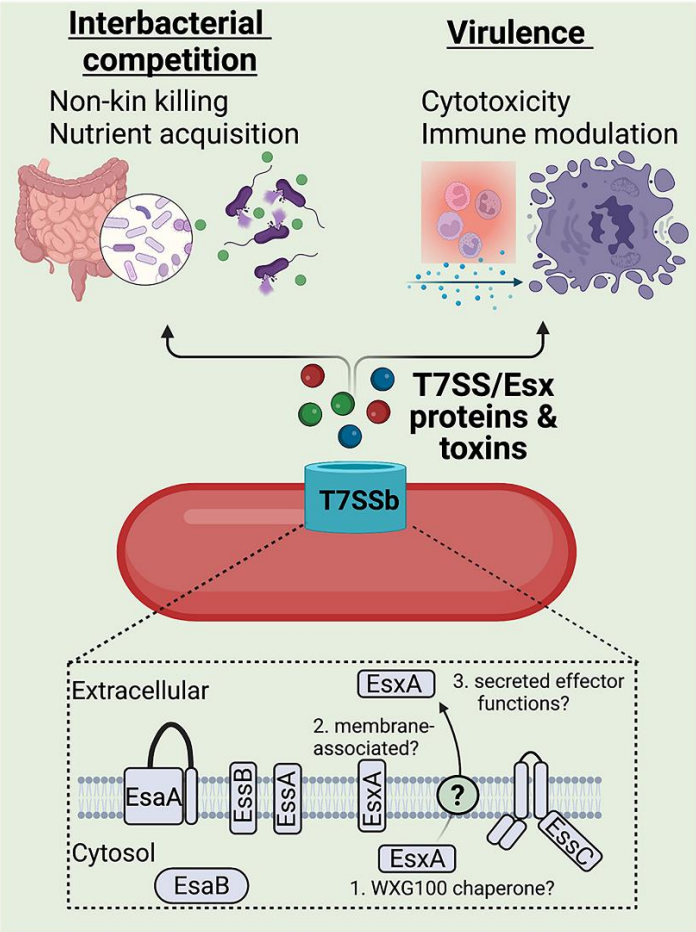


Figura 3. Mecanismo de ação do T7SS. (Spencer & Doran, 2022)

Diante da relevância clínica da *E. faecalis* na polimicrobiota da infeção endodôntica, são vários os testemunhos de testes *in vitro* e *in vivo* que tiveram como objetivo o controlo biológico desta bactéria (Almelan *et al.*, 2023; El-Telbany *et al.*, 2021; Moryl *et al.*, 2022; Shlezinger *et al.*, 2019; Xiang *et al.*, 2022). Todos estes artigos referenciados demonstraram uma crítica redução na população de *E. faecalis* nos grupos testes, e alguns destes autores chegaram mesmo a afirmar que os fagos de *E. faecalis* representam um promissor agente preventivo de infeções endodônticas persistentes (El-Telbany *et al.*, 2021; Moryl *et al.*, 2022; Xiang *et al.*, 2022).

1.6 Endolisina

As endolisinas são enzimas codificadas por bacteriófagos com a função de romper a parede celular das bactérias hospedeiras permitindo a libertação dos fagos no meio circundante

(Abdelrahman *et al.*, 2021; Nelson *et al.*, 2012). Mais especificamente, as endolisinas catalisam a hidrólise do peptidoglicano, sendo a sua eficácia, mecanismo e gama de atuação variáveis dependentes do hospedeiro, devido às diferenças estruturais das suas paredes (Nelson *et al.*, 2012). A maioria das endolisinas ativas na parede celular de organismos Gram-negativos são proteínas de domínio único, enquanto as endolisinas ativas em células Gram-positivas tendem a ter múltiplos domínios, que consistem num domínio ativo, também conhecido como "Enzymatically Active Domain" (EAD), ligado através de uma sequência de ligação a um CBD. Frequentemente, o EAD é N-terminal e o CBD é C-terminal (Abdelrahman *et al.*, 2021; Nelson *et al.*, 2012). No entanto, já foram observadas outras disposições de domínios, como se pode ver na Figura 4.

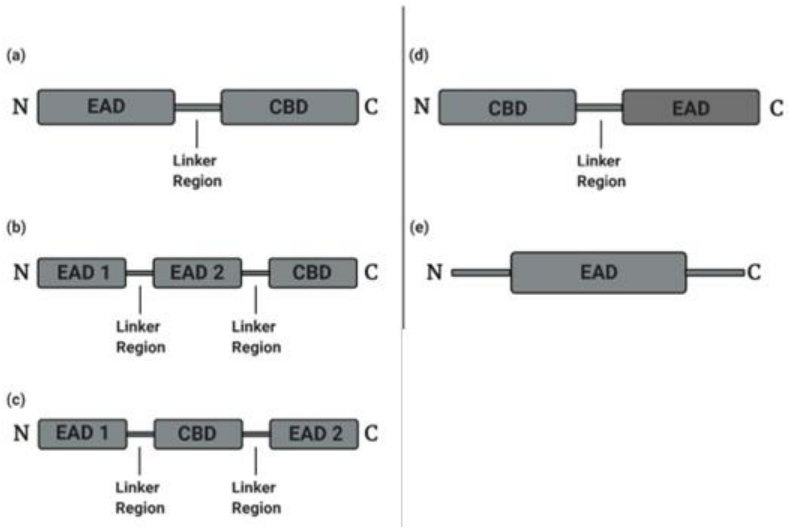


Figura 4. Arranjos dos domínios observados nas endolisinas. EAD é o domínio enzimaticamente ativo.

CBD é o domínio de ligação celular. (a) modelo demonstrativo de endolisina com um domínio catalitico enzimatico N-terminal (EAD) e um domínio de ligação à parede celular C-terminal (CBD). (b) Modelo de multi-domínios com dois EADs e um CBD C-terminal. (c) Modelo de multi-domínios com um CBD localizado entre dois EADs. (d) modelo de uma endolisina modular contendo um EAD no C-terminal e um CBD N-terminal. (e) Modelo de uma endolisina simples contendo um EAD e sem CBD

(Abdelrahman *et al.*, 2021).

Com base no sítio de atuação específico no substrato de peptidoglicano, são conhecidos 3 tipos principais de endolisinas (Figura 4: (1) glicosidases, que clivam a porção glicana do peptidoglicano (MurNAc-GlcNAc); (2) amidases, que clivam a ligação amida entre a porção glicana (MurNAc) e a porção peptídica (L-alanina); e (3) endopeptidases, que clivam a ligação peptídica entre dois

aminoácidos do peptídeo (Abdelrahman *et al.*, 2021; Pennone *et al.*, 2019; Rahman *et al.*, 2021). As glicosidases são uma grande família de enzimas que catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas. Dentre essas, duas são endolisinas: (1) N-acetil–D-muramidases, que hidrolisam as ligações β-1,4 glicosídicas entre MurNAc e GlcNAc, e a (2) N-acetil–D-glicosidases, que hidrolisam as ligações β -1,4 glicosídicas entre GlcNAc e MurNAc (Khan *et al.*, 2023). As amidases, também conhecidas como amido hidrolases, clivam especificamente a ligação amida (ligação covalente entre um átomo de nitrogénio e um átomo de carbono) entre o resíduo de ácido lático do MurNAc e o primeiro aminoácido (L-ala1) da cadeia peptídica (Nelson *et al.*, 2012; Rahman *et al.*, 2021). Muitas amidases exigem um co-fator metálico para funcionar adequadamente (Abdelrahman *et al.*, 2021; Nelson *et al.*, 2012) e estas enzimas são frequentemente agrupadas com base no aminoácido essencial envolvido na catálise. Por último, podem existir diferentes endopeptídeos em função do local de clivagem do "stem peptide" ou da "Cross-link chains" (Gargis *et al.*, 2009; Khan *et al.*, 2023). A Figura 5 demonstra como acontece a infeção bacteriofágica.

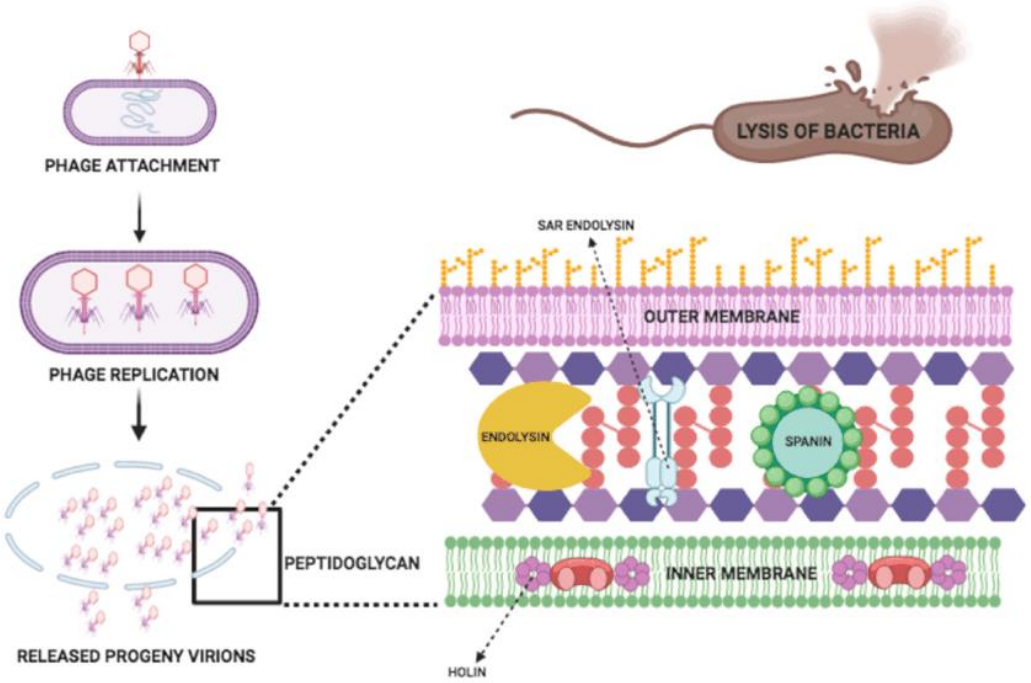


Figura 5. Local de atuação das endolisinas (substrato de peptidoglicano) (Abdelrahman *et al.*, 2021).

O CBD, que é frequentemente encontrado nas endolisinas (especialmente nas Gram positivas), é responsável por reconhecer e se ligar aos componentes específicos da parede celular bacteriana, trazendo o domínio catalítico para a proximidade com o peptidoglicano, o que permite a sua subsequente ação. Eles podem ser altamente específicos permitindo que a endolisina

identifique e atinja bactérias específicas, enquanto evitam a lise indesejada de células que estão fora da sua gama de atuação, prevenindo assim efeitos colaterais diversos. Algumas endolisinas podem até ter múltiplos CBDs, o que lhes permitem agir sobre uma gama mais ampla de bactérias (Abdelrahman *et al.*, 2021; Rahman *et al.*, 2021).

A eficácia de uma endolisina não só depende de fatores como mecanismos de ação específicos, presença de domínios de ligação à parede celular e da sua atividade enzimática, mas também de fatores como a concentração da endolisina, a sensibilidade da bactéria alvo e a presença de obstáculos de acesso ao peptidoglicano, como por exemplo a membrana externa que protege o peptidoglicano nesses organismos (Nelson *et al.*, 2012). Logo, as diferenças estruturais entre as paredes celulares das bactérias gram-positivas e gram-negativas fazem com que as endolisinas possuam diferentes mecanismos de ação, eficácia e gama de atuação (Briers & Lavigne, 2015; Nelson *et al.*, 2012; Rahman *et al.*, 2021). Em bactérias Gram-negativas, existe uma membrana que envolve a parede celular bloqueando o acesso direto ao peptidoglicano, implicando assim num desafio extra às endolisinas (Briers & Lavigne, 2015; Rahman *et al.*, 2021). Tais diferenças estruturais levam a uma maior eficiência de aplicação em bactérias Gram-positivas do que em Gram-negativas (Kanwar *et al.*, 2023). Para contornar esta limitação, algumas endolisinas possuem domínios específicos que permitem a sua translocação através da membrana externa (Nelson *et al.*, 2012). Outra forma de ultrapassar o problema baseia-se na sinergia entre endolisinas e compostos como o EDTA e alguns antibióticos, que perturbam a membrana externa e permitem o acesso ao peptidoglicano (Briers & Lavigne, 2015). Já as endolisinas que atuam contra bactérias gram-positivas não precisam atravessar uma membrana externa e podem chegar ao peptidoglicano diretamente sendo, portanto, mais eficientes a causar a lise bacteriana. Algumas endolisinas gram-positivas têm um espetro de ação bastante amplo, podendo lisar várias espécies diferentes dentro do mesmo género bacteriano, enquanto outras podem ser bastante específicas atingindo uma única espécie (Nelson *et al.*, 2012).

1.7 Peptidoglicano

O peptidoglicano, também conhecido como mureína, é um heteropolímero biológico que forma uma camada semelhante a uma rede em torno da membrana plasmática bacteriana, que tem como função manter a forma da célula e protegê-la contra a rutura e os danos celulares (Egan *et al.*, 2020; Garde *et al.*, 2021; Meng *et al.*, 2022; Pasquina-Lemonche *et al.*, 2020; Rohde, 2019; Rohs & Bernhardt, 2021). Além do seu papel estrutural, os peptidoglicanos também estão

envolvidos em vários processos celulares incluindo resposta ao stresse, virulência e adaptação ambiental (Egan *et al.*, 2020), o que demonstra que a parede de peptidoglicano não só fornece um ponto de ligação para várias proteínas, viabilizando a aderência das bactérias aos seus hospedeiros ou a outras superfícies, como também está relacionado com a entrada de substâncias nocivas na célula bacteriana, como por exemplo alguns antibióticos (Rohde, 2019).

A barreira peptidoglicana está presente em todas as bactérias exceto nos micoplasmas, os quais não possuem parede celular (Culp *et al.*, 2020; Mamou *et al.*, 2022; Meng *et al.*, 2022). As cadeias peptídicas variam consoante o hospedeiro, sendo diametralmente diferentes dependendo da coloração de Gram das bactérias *(Sekiya et al.*, 2021). Em Gram-positivas, a parede celular é caracterizada por uma camada espessa de peptidoglicano (cerca de 20 a 40 nm (Kim *et al.*, 2015)), em contraste com as Gram-negativas que possuem uma fina camada peptidoglicana (2-8 nm) (Reith & Mayer, 2011; Rohde, 2019). Além da diferente espessura, a camada peptidoglicana de bactérias Gram-positivas e negativas também se distinguem quanto ao número de camadas: nas Gram-positivas chegam a 40 camadas, enquanto que nas Gram-negativas são apenas 1-2 camadas. Compensatoriamente à fina camada peptidoglicana, as Gram-negativas possuem uma membrana externa que reveste e protege a camada peptidoglicana (Gutiérrez & Briers, 2021). A Figura 6 ilustra as diferenças estruturais entre as paredes celulares em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

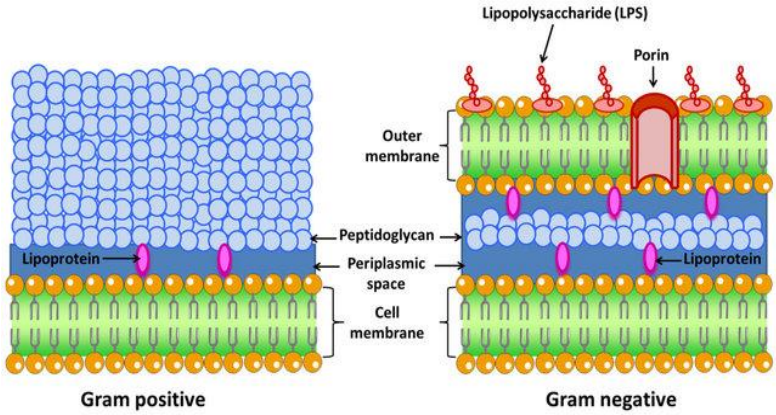


Figura 6. Estruturas da parede celular de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. (Imagem modificada retirada de Jiménez *et al.*, 2022)

Em decorrência da colonização bacteriana do hospedeiro, podem haver alterações na camada peptidoglicana, de maneira que os fragmentos de peptidoglicano libertados podem influenciar na modulação do sistema imunológico do hospedeiro e a manutenção da homeostase

microbiana *(Brott & Clarke, 2019; Meng et al.*, 2022). Não é por acas que alguns antibióticos, como as penicilinas, têm como alvo as enzimas envolvidas no processo de construção e modificação do peptidoglicano (Graham *et al.*, 2021). E em resposta ao stresse induzido por antibióticos, algumas bactérias modificam a estrutura de sua parede celular e o metabolismo (Evans & Bolz, 2019; Graham *et al.*, 2021). Estudos têm demonstrado que antibióticos que atuam na parede celular podem gerar respostas bacterianas heterogénicas, tais como: modificações na espessura da camada de peptidoglicano, no seu grau de reticulação e na composição dos seus componentes (Graham *et al.*, 2021); aumento da produção de toxinas bacterianas; indução da formação ou modificação de biofilmes (Evans & Bolz, 2019). Essas alterações permitem ao microrganismo evadir-se da ação antibiótica (Evans & Bolz, 2019; Garde *et al.*, 2021; Graham *et al.*, 2021). Tais proteínas que alteram a camada peptidoglicana e conferem resistências às enzimas de degradação podem ser compartilhadas com bactérias não resistentes a partir da transferência horizontal. A transferencia horizontal é um mecanismo no qual as bactérias transferem informações genéticas de maneira não reprodutiva, sendo este responsável pela rápida disseminação de genes de resistência bacteriana, permitindo que desenvolvam resistência a vários antibióticos quase que instantaneamente (Grishin *et al.*, 2020). Dado o crescente aumento de estirpes bacterianas resistentes, tê, vindo a ser desenvolvidas estratégias que visam combater a resistência antibiótica, tal como o uso de lisinas capazes de degradar a camada peptidoglicana. No entanto, ainda são necessários mais estudos para desenvolver e aperfeiçoar essas abordagens terapêuticas (Gutiérrez & Briers, 2021).

1.8 Produção de proteínas recombinantes

Um dos objetivos do presente projeto foi expressar heterologamente duas novas endolisinas de bacteriófagos em *E. coli*, de modo a obter níveis elevados de produção dessas proteínas de forma que tornar possível a sua subsequente purificação e caraterização. A expressão heteróloga trata-se de uma sobre-expressão controlada de uma proteína de interesse a partir de um material genético exógeno introduzido num sistema de expressão adequado à sua produção. Basicamente isso envolve o isolamento do gene (ou cADN) codificante da proteína desejada (podendo a sua função ser conhecida ou não), a sua inserção num sistema de expressão apropriado que contenha os elementos genéticos adequados (geralmente num vetor de expressão) e um sistema de produção do hospedeiro com vista a facilitar a produção controlada (de alto nível) da proteína. Esta abordagem ultrapassa as limitações relacionadas com a produção de proteínas por estirpes de tipo selvagem, tais como baixos níveis de produção, potencial toxicidade, controlo reduzido e a

escassez de recursos (Chumappumkal Joseph *et al.*, 2015; Mital *et al.*, 2021; Sandomenico *et al.*, 2020; W. Wang *et al.*, 2018).

Atualmente existem inúmeros sistemas de expressão diferentes que são compostos por uma variedade de hospedeiros produtores, vetores de expressão e elementos genéticos associados. Os hospedeiros de produção utilizados atualmente incluem bactérias, leveduras, fungos, células de insetos, células de mamíferos, sistema livre de células (Chumappumkal Joseph *et al.*, 2015) e até plantas (Nosaki *et al.*, 2021). Entre estes hospedeiros, a *E. coli* foi a primeira a ser usada (Baeshen *et al.*, 2015) e continua a ser o hospedeiro de expressão mais investigado, especialmente a nível laboratorial *(Baeshen et al.*, 2015; Chen, 2012; Ki & Pack, 2020) (corresponde a cerca de 30% dos sistemas de expressão (Baeshen *et al.*, 2015)). Esta bactéria pode crescer rapidamente, atingir densidades celulares elevadas e crescer em substratos baratos, existindo atualmente uma grande variedade de vectores de expressão e estirpes disponíveis no mercado (Huleani *et al.*, 2022). Mas por outro lado, esta bactéria é afetada pela produção de lipopolissacáridas na membrana externa, que são pirogénicas para os seres humanos e, por conseguinte, necessitam de etapas de purificação adicionais para garantir a sua remoção (Ki & Pack, 2020, 2020; Tanoeiro, 2021). Além disso, a *E. coli* não permite a produção de proteínas em meio extracelular (Huleani *et al.*, 2022; Ki & Pack, 2020), não efetua modificações pós-traducionais, como a glicosilação, fosforilação e processamento proteolítico (com exceção de algumas estirpes que ainda estão em desenvolvimento (Baeshen *et al.*, 2015; Ki & Pack, 2020; Tanoeiro, 2021)), e tem uma utilização específica de codões com um número de codões raros que pode limitar o sucesso.

Entre a variedade de estirpes de *E. coli* hospedeiras de expressão e vectores associados que foram desenvolvidos por vários fabricantes, o mais utilizado (em 66%) é o pET (em 31% dos sistemas e expressão de pET opta-se pelo pET 28, sendo este vector o mais utilizado) - sistema hospedeiro *E. coli* BL21(DE3) *(Mital et al.*, 2021). Este sistema baseia-se na utilização de uma polimerase de ARN T7, que efetua a transcrição cinco vezes mais rapidamente do que a polimerase de ARN de *E. coli* (W. Wang *et al.*, 2018), em conjunto com a utilização do operador/promotor lac para um controlo rígido e induzível da produção (Chumappumkal Joseph *et al.*, 2015; Huleani *et al.*, 2022; Mital *et al.*, 2021; Saïda, 2007; Sandomenico *et al.*, 2020; W. Wang *et al.*, 2018). Além da rápida expressão, o ARN T7 também apresenta outras vantagens como: ser uma enzima de uma só subunidade, contrastando com a RNAP bacteriana que possui várias subunidades; ser rapidamente processado; ter uma alta especificidade em relação ao promotor; ser capaz de produzir transcrições muito longas; possuir independência em relação a

fatores de transcrição auxiliares; e possuir uma terminação apenas por sinais de terminação de classe I e classe II, diferindo significativamente dos locais de terminação da transcrição bacteriana (W. Wang *et al.*, 2018). Um exemplo de um vetor pET, o pET28a, é mostrado na Figura 7.

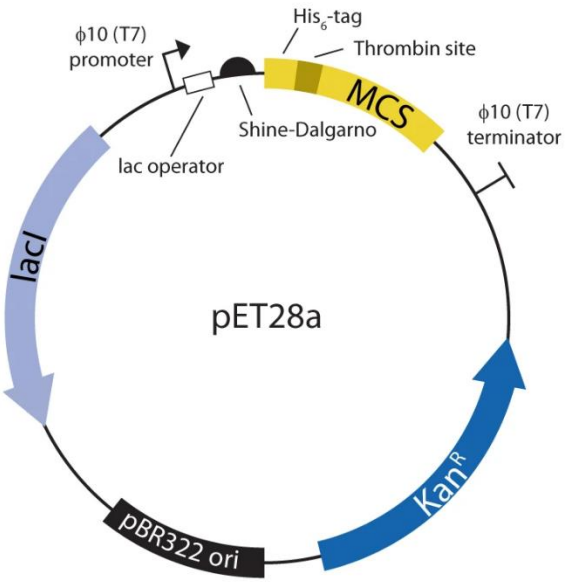


Figura 7. Principais componentes de um vetor de expressão pET28a. "MCS" (sítio de clonagem múltipla) representa o local onde o gene de interesse deve ser inserido. (figura modificada e retirada de Shilling *et al.*, 2020)

Além das técnicas já mencionadas, também é possível otimizar o sistema de expressão através da adição de "tags" agregadas à proteína desejada. As "tags" são sequências peptídicas curtas que podem ser adicionados no terminal N ou C da proteína de interesse (Costa *et al.*, 2014; Ki & Pack, 2020; Namdev Joshi & Rai, 2019; Vandemoortele *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2020). Tags diferentes pode executar diferentes papéis (Costa *et al.*, 2014): (1) solubilidade - são usadas para auxiliar na configuração adequada das proteínas, impedindo a sua precipitação, o que é especialmente relevante para proteínas recombinantes expressas em espécies com falta de uma maquinaria sofisticada para efetuar modificações pós-traducionais, como a *E. coli* por exemplo (Costa *et al.*, 2014; Ki & Pack, 2020); (2) aumentar ou assegurar a estabilidade da proteína (Vandemoortele *et al.*, 2019); (3) deteção (Vandemoortele *et al.*, 2019); (4) purificação- através da cromatografia de afinidade (Costa *et al.*, 2014; Ki & Pack, 2020); (5) localização sub-celular (Ki & Pack, 2020; Vandemoortele *et al.*, 2019); (6) aumentar a expressão da proteína (Ki & Pack, 2020). No entanto, a presença de tags na proteína pode potencialmente vir a prejudicar a sua função biológica e interferir com a análise estrutural adequada ou a imunogenicidade. Este potencial problema pode ser contornado através da adição de uma sequência de reconhecimento de

proteases entre a "fusion tag" e a proteína desejada, o que permite que, após a produção, a tag possa ser removida por uma protease (Ki & Pack, 2020). Entre as tags existentes, o marcador hexahistina (His-tag) é usado com vista à purificação da proteína, a qual é purificada através da cromatografia de afinidade de metais imobilizada (IMAC), dado que essa "tag" possui afinidade para o níquel e, portanto, pode ser separada dos restantes compostos através da sua afinidade a esse metal (Costa *et al.*, 2014).

1.9 Objetivos do projeto

Este projeto teve como principais objetivos testar a ação de fagos contra *E. faecalis* em culturas mistas com *S. aureus* e, com base nesses mesmos fagos, produzir novas endolisinas.

No que tange os testes com bactériofagos, pretendeu-se avaliar o efeito do fago MAX contra *E. faecalis* em cultura simples e mista: *E. faecalis* e *E. faecalis* com *S. aureus.* No tocante a produção das endolisinas objetivou-se fazer uma análise bioinformática da sequências das endolisinas; clonar os genes de interesse num vetor de expressão de *E. coli;* produzir as endolisinas e avaliar sua atividade contra a *E. faecalis*

2. Metodologia

2.1 Estirpes bacterianas

Neste trabalho usou-se *E. faecalis* I 900 (Melo et al., 2019) e *S. aureus*, ambas cedidas pelo doutor Luís Melo do Centro de Engenharia Biológica da Universidade do Minho. Ambas as bactérias foram armazenadas em meio de cultura Tryptic Soy Broth (TSB: 0,5 % (m/v) yeast extract, 1% (m/v) NaCl e 1% (m/v) tryptone peptone) com 20% de glicerol a -80 °C. Antes de serem usadas, foram reabilitadas por espalhamento em placa de Tryptic Soy Broth Agar (TSA: 0.615% (m/v) agar, 0,5 % (m/v) yeast extract, 0,5 % (m/v) NaCl e 1 % (m/v) tryptone peptone) e incubadas a 37 °C durante 24 horas. Para preparação do pré-inoculo, uma colónia dessa cultura fresca foi adicionada a 40 ml de TSB e incubada durante a noite a 37 °C, com agitação de 150 rpms.

2.1.1 Avaliação do crescimento

a) Cultura simples

Para avaliar o crescimento de cada bactéria em estudo, preparou-se um pré-inoculo conforme descrito em (2.1), o qual foi centrifugado a 5000 g por 10 minutos a uma temperatura de 4 °C (centrífuga Sigma 4-16K UK). O sobrenadante foi descartado, as células foram lavadas duas vezes e ressuspendidas em solução salina estéril (0,9 % (m/v) NaCl). Seguiu-se o ajuste da densidade ótica (DO) a 0,3 (600mn), a qual corresponde a aproximadamente $1x10^8$ UFCs/ml (unidades formadoras de colônias/ ml) para ambas as bactérias (de acordo com o que foi obtido em ensaios preliminares). 20 µL dessa suspensão foram adicionados a 40 ml de TSB e incubados a 37 °C com agitação a 150 rpms (Panasonic MR-154 com agitador orbital 8100). Amostras da cultura bacteriana foram recolhidas a cada hora, visando medir as DOs e, em simultâneo, construir o gráfico correspondente à curva de crescimento até se encontrar a fase de crescimento exponencial bacteriano.

No caso da *E. faecalis*, o crescimento foi também avaliado por UFCs. Para tal, usou-se o mesmo procedimento descrito no parágrafo anterior e em cada ponto de amostragem foram feitas diluições decimais em solução salina estéril, as quais foram plaqueadas em TSA e incubadas a 37 °C 24 horas. Em seguida, procedeu-se à contagem das UFCs.

b) Cultura mista

A avaliação do crescimento bacteriano em cultura mista foi efetuada de forma semelhante ao descrito para cultura simples, exceto que 10 µL de cada uma das culturas bacterianas (preparados tal como descrito em 2.1.1a) foram adicionados a 40 ml de TSB e incubados a 37 °C com 150 rpms de agitação (Panasonic MR-154 com agitador orbital 8100) durante 8 horas. Amostras da cultura foram recolhidas a cada hora, para quantificar bo crescimento conjunto de cada bactéria através da contagem de UFCs, a qual foi possível realizar-se com base nas diferenças morfológicas visuais existentes entre as colónias das duas espécies bacterianas em estudo (diferem-se em cor e tamanho).

2.2 Bacteriófagos

Neste trabalho usou-se o fago siphovirus vB_EfaS-Zip (Zip) e o fago e podovirus vB_EfaP-Max (Max), ambos cedidos pelo doutor Luís Melo do Centro de Engenharia Biológica da Universidade do Minho, que os isolou (a partir de águas residuais da ETAR de Frossos, Braga) e os caracterizou(Melo et al., 2019). Ambos os fagos foram mantidos a 4°C em SM Buffer SM buffer (0.606 % (m/v) Tris-base, 0.58% (m/v) NaCl, 0.2% (m/v) $MgSO_4$. 7H2O e 12.114% (m/v) Tris-Hcl).

2.2.1 Produção

O primeiro passo para produção de fagos consistiu na preparação de um "tapete"bacteriano. Para tal, preparou-se um pré-inoculo de *E. faecalis*, conforme descrito em (2.1), do qual foram retirados 100 µL e misturados com 1-5ml do Molten Top Agar (MTA: 1.23 % (m/v) agar, 0,5 % (m/v) yeast extract, 0,5 % (m/v) NaCl e 1 % (m/v) tryptone peptone), espalhando-os sobre uma placa de TSA. Após a secagem em temperatura ambiente, o fago a uma concentração de 1 x 10^5 UFPs/ ml (unidades formadoras de placas/ ml) foi espalhado sobre o "tapete" bacteriano e as placas foram incubadas a 37°C durante, no máximo, 24 horas. Para cada produção foram preparadas pelo menos 10 placas.

Para a recolha dos fagos, foram adicionados 2-4 ml de SM buffer sobre as placas onde se propagou o fago, as quais que foram de seguida incubadas a 4°C com agitação entre 50-90 rpms durante 18 horas (período em que ocorre a difusão dos fagos no SM buffer). O líquido e o MTA das placas foram recolhidos separadamente. O MTA foi centrifugado a 5000 g durante 20 minutos, a 4 °C, o seu sobrenadante foi recolhido e adicionado ao SM buffer anteriormente recolhido.

2.2.2 Purificação

Tendo em conta o volume total da suspensão do fago em 1-3 ml de SM Buffer, obtida como descrito no ponto anterior (2.2.1), foram adicionados 10% de clorofórmio a 100%. De imediato, centrifugou-se a 5000 g durante 20 minutos, a 4 °C, o sobrenadante foi recolhido e filtrado usando filtros estéreis PES 0,2 µm. Deste modo obteve-se o stock fágico, o qual foi armazenado a 4°C até posterior utilização.

2.2.3 Quantificação

Para determinar a concentração do stock fágico, preparou-se diluições decimais do mesmo usando SM buffer, as quais foram adicionadas sobre placas com "tapete" bacteriano (preparadas tal como descrito no ponto 2.2.1). Após incubação a 37°C durante aproximadamente 18 horas, procedeu-se à contagem das UFPs (unidades formadoras de placas).

2.3 Aplicação de fago para controlo de *E. faecalis*

Com o intuito de testar a eficácia do fago MAX, foram realizados vários ensaios com diferentes tipos de cultura (simples ou mista) e em diferentes fases de crescimento bacteriano (estacionária e exponencial).

2.3.1 Testes com culturas bacterianas em fase estacionária

a) Cultura simples

Para a obtenção da cultura simples de *E. faecalis* procedeu-se tal como descrito anteriormente (2.1.1a) até ao ajuste da DO. Em seguida, foram adicionados 20 µL da cultura a 40 ml de TSB e incubou-se durante aproximadamente 16 horas (durante a noite), de forma a garantir que a cultura se encontrava na fase estacionária. A cultura bacteriana foi dividida igualmente em quatro erlenmeyers (cada um contendo 10ml), sendo que em três foi adicionado fago Max a uma concentração final de 1 x 10^8 UFPs/ml, e o frasco restante foi usado como controlo negativo (em vez da adição do fago, adicionou-se igual volume de SM buffer). Para avaliar a ação lítica do fago prodeceu-se à medição da DO a cada hora, tendo-se também recolhido amostras para quantificação de UFCs nos pontos das 3, 6 e 24 h.

b) Cultura mista

Para a obtenção da cultura mista de *E. faecalis* e *S.aureus* procedeu-se tal como descrito anteriormente (2.1.1b), exceto que a suspensão com ambas as bactérias foi incubada até perfazer aproximadamente 16 horas (durante a noite), de forma a garantir que ambas as bactérias se encontravam na fase estacionária. A aplicação do fago, a monitorização da cultura bacteriana por medição da DO e a quantificação de UFCs. foram feitos tal como descrito anteriormente (2.3.1a).

2.3.2 Testes com culturas bacterianas em fase exponencial

a) Cultura Simples

A obtenção da cultura simples de *E. faecalis* foi feita como descrido em 2.3.1a, exceto que a incubação foi de apenas 5h de forma a garantir que a cultura se encontrava na fase exponencial (tal como testado no procedimento descrito em 2.1.1a). A cultura bacteriana foi dividida igualmente em quatro frascos (cada um contendo 10ml), sendo que em três foi adicionado fago Max a uma concentração final de 1 x 10^8 UFPs/ml, e o frasco restante foi usado como controlo negativo (em vez da adição do fago, adicionou-se igual volume de SM buffer). A ação lítica do fago foi avaliada através da quantificação de UFCs, tendo as amostras sendo recolhidas às 0, 3, 6 e 16 h.

b) Cultura mista

A obtenção da cultura mista de *E. faecalis e S. aeurus* foi feita como descrito em 2.3.1b, exceto que a incubação foi de apenas 5h de forma a garantir que a cultura se encontrava na fase exponencial (tal como testado no procedimento descrito em 2.1.1a). A aplicação do fago, bem como a quantificação de UFCs, foram feitos tal como descrito anteriormente (2.3.2a).

2.4 Clonagem do gene de endolisina

2.4.1 Bioinformática: Análise da sequência

Utilizou-se várias ferramentas bioinformáticas para analisar a sequência da endolisina, usando as configurações padrões de todas as aplicações para todos os casos. A sequência do gene da endolisina ZIP foi traduzida utilizando a ferramenta Expasy - Translate tool em https://web.expasy.org/translate/, e as propriedades como o número de aminoácidos, o peso molecular e o p/ teórico foram determinadas com a aplicação ProtParam (Expasy) em

https://web.expasy.org/protparam/. A sequência da proteína foi analisada com SignalP-6.0 (https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0/) e TargetP-2.0 (https://services.healthtech.dtu.dk/services/TargetP-2.0/) para identificar a localização subcelular da proteína produzida e a presença de sequências de sinalização. As sequências de domínio foram identificadas com PFAM (http://pfam-legacy.xfam.org/) e SMART (http://smart.embl-heidelberg.de/). As sequências protéicas foram analisadas com Domcut (embl) para identificar potenciais sequências 'linkers' e com PRED-TMR (http://athina.biol.uoa.gr/PRED-TMR/input.html) para identificar domínios de transmembranas. O uso de códons (CAI: "codon adaptation índex") das sequências de genes para expressão heteróloga em *E. coli* foi determinado com a ferramenta GeneSript Rare Codon Analysis Tool em https://www.genscript.com/tools/rare-codon-analysis. Sítios de restrições nas sequências de ADN foram identificadas com o SnapGene® (v3.2.1).

2.4. 2 Clonagem por Recombinação Homóloga

2.4. 2. 1 PCR

a) Desenho de primers

Os primers de sobreposição que englobam as sequências da endolisina e do vetor pET28a foram preparados usando o SnapGene® (v3.2.1) e a qualidade dos primers foi analisada com o OligoAnalyzer (https://www.idtdna.com/calc/analyzer). Os primers foram desenhados para incorporar regiões homólogas de 20-25 pb de ambas sequências, vetor e gene inserido. Os primers tiveram um tamanho máximo de 49 pb e sua preparação objetivou minimizar a estrutura secundária e a formação de dímeros de primers.

b) Reação de PCR

O PCR foi realizado usando 0,4 U de Phusion High Fidelity ADN polymerase (Thermo Fisher Scientific) com 0,5 µM de cada "primer", 1x Phusion HF Buffer e 200 µM dNTPS num volume final de 20 µL. Concentrações de 1 a 50 ng do vetor de expressão pET 28a (Merck Millipore) foram avaliadas, enquanto para o sifovírus vB_EfaS-ZIP (ZIP) foram examinadas concentrações finais de 1 x 10^4 a 10^6 UFPs. O ZIP foi preparado conforme descrito em 2.2.1. O fago foi usado diretamente para o PCR sem que haja sua extração de DNA; para expor seu ADN

no meio utilizou-se um elevado tempo de desnaturação inicial. O PCR foi efetuado com o termociclador DOPPIO (VWR) utilizando as condições de ciclagem indicadas na Tabela 2.

Tabela 2. Condições de PCR utilizadas para a amplificação de pET28a e do gene da endolisina ZIP.

Etapa	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	98 °C	pET28a: 3 min. ZIP: 15 min.	1
Desnaturação	98 °C	30 s	30
Emparelhamento	Dependente do primer utilizado 45-60 °C	30 s	
Extensão	72 °C	pET28a: 3 min ZIP: 45 s	
Extensão final	72 °C	10 min	1
Armazenamento	4 °C	∞	1

2.4.2.2 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%. Todos os géis foram preparados com tampão TAE (40 mM de base Tris, 20 mM de ácido acético, 1 mM de EDTA), e com 3 µL de corante GreenSafe Premium (NZYTech) para cada 100 mL de solução de gel de agarose. As amostras foram misturadas com 1 µL de tampão de carregamento (concentração final: 10 mM EDTA, 0,01% azul de bromofenol, 10% glicerol) para cada 5 µL da amostra, e 5 a 20 µL da mistura foram carregados nos poços. Os géis foram colocados a 120V durante 30-60 minutos e as bandas de ADN foram visualizadas com um transiluminador GenoSmart (VWR). Foram utilizados 5 µL de NZYDNA Ladder III (NZYTech) como marcador de peso molecular.

2.4.2.3 Extração do gel de eletroforese

A purificação dos produtos de PCR obtidos nos géis de agarose foi efetuada com o kit NZYGelpure (NZYTech), tal como recomendado pelo fabricante. Resumidamente, após a identificação das bandas de ADN de interesse por iluminação UV com um transiluminador GenoSmart, as bandas de agarose foram excisadas, removidas e recolhidas para um microtubo

previamente pesado. Adicionou-se tampão de ligação (kit NZYGelpure) numa proporção de 300 µL por 100 mg de agarose e aqueceu-se a 60 °C até à completa dissolução do gel (cerca de 10 min). Após o ajuste do pH com acetato de sódio 3M, pH 5, até a solução ficar amarela, transferiu-se a amostra para uma coluna de purificação (kit NZYGelpure) e centrifugou-a durante 1 minuto a 12000 x g. 600 µL de Wash Buffer (kit NZYGelpure) foram adicionados à coluna, que foi centrifugada a 12000 x g durante 1 minuto, sendo o eluente descartado e a colunai novamente centrifugada. Adicionou-se então 50 µL de tampão de eluição (Buffer AE, NZYGelpure kit) ao centro da coluna, incubou-se durante 1 minuto à temperatura ambiente e centrifugou-se a 12000 x g durante 1 minuto. Para concentrar ainda mais o produto final, o eluente foi recarregado na coluna, incubado durante 1 minuto e novamente centrifugado durante 1 minuto. O produto final foi armazenado a -20°C até ser utilizado.

2.4.2.4 Quantificação do ADN

A concentração de ADN das soluções purificadas foi medida com um espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (VWR). Foram utilizadas amostras de 2 µL e foram efetuadas medições de absorvância a 230, 260 e 280 nm para determinar a concentração de ADN (A_{260}), a contaminação por proteínas (proporção A_{260}/A_{280}), e fenólicos, hidratos de carbono e/ou outras contaminações (proporção A_{260}/A_{230}). Para o cálculo da concentração de ADN, foi utilizado um coeficiente de extinção de 50 (ng/µL)cm^{-1}. O tampão de eluição do kit de purificação utilizado na purificação da amostra analisada foi utilizado como branco.

2.4.2.5 *Digestão* da *DpnI*

O gene purificado da endolisina ZIP, amplificado por PCR, e o vetor pET28a foram submetidos a digestão com *Dpn*I para remover o ADN do template original que estava metilado. Foram misturados vários volumes do gene endolisina ZIP e pET28a, conforme descrito na Tabela 3, e digeridos com 10 unidades de *Dpn*I a 37 °C, durante 2 horas, num volume total de 13 µL.

Tabela 3. Várias condições utilizadas para a digestão *Dpn*I de pet28a e do inserto (gene da ZIP-endolisina).

Condição	**ZIP- gene da endolisina (produto de PCR purificado)**	**pET 28a (concentração do template de PCR)**	**10x NZY Buffer C**	***Dpn*I (10U/µL)**
1	462 ng = 806 fmols	5.1 ng = 1.5 fmols	1,5 µL	1 µL
2	413 ng = 721 fmols	10.2 ng = 3.0 fmols	1,5 µL	1 µL
3	316 ng = 551 fmols	20.4 ng = 6.1 fmols	1,5 µL	1 µL
4	219 ng = 382 fmols	30.6 ng = 9.1 fmols	1,5 µL	1 µL

2.4.2.6 Transformação para *E.coli* NZY5α

Os produtos da digestão de *Dpn*I preparados conforme descrito em 2.4.2.5 foram transformados em células competentes NZY5α (NZYTech) por choque térmico, conforme descrito pelo fabricante. 10 µL do produto digerido foram adicionados a 100 µL de células competentes, previamente descongeladas em temperatura ambiente, incubadas em gelo durante 30 minutos, submetidas a choque térmico a 42 °C durante 40 segundos e imediatamente colocadas de novo no gelo para mais 10 minutos de incubação. Foram adicionados 900 µL de meio SOC (2 % (m/v) de triptona, 0,5 % (m/v) de extrato de levedura, 2,5 mM KCl, 10 mM NaCl, 10 mM MgSO4, 10 mM MgCl2, 20 mM D-glucose) e incubou-se a solução durante 1 hora a 37 °C, 200 rpm. Em seguida, espalharam-se 200 µL da cultura em placas LB (10 g/l de triptona peptona, 5 g/L de extrato de levedura, 5g/L de NaCl, 20 g/L de ágar) suplementadas com 100 µg/mL de kanamicina. A solução restante foi então centrifugada (Centrífuga Eppendorf AG Mini Spin Plus 5453, 22331) a 12000 x g durante 1 minuto, o sobrenadante foi eliminado, 200 µL de SOC adicionados e misturados, e espalhou-se toda solução noutra placa de LB + 100 µg/mL de kanamicina. As placas foram incubadas durante a noite a 37 °C. Como controlo positivo da transformação, foram utilizados 10 µL de 5 ng/µL de pET28a circular.

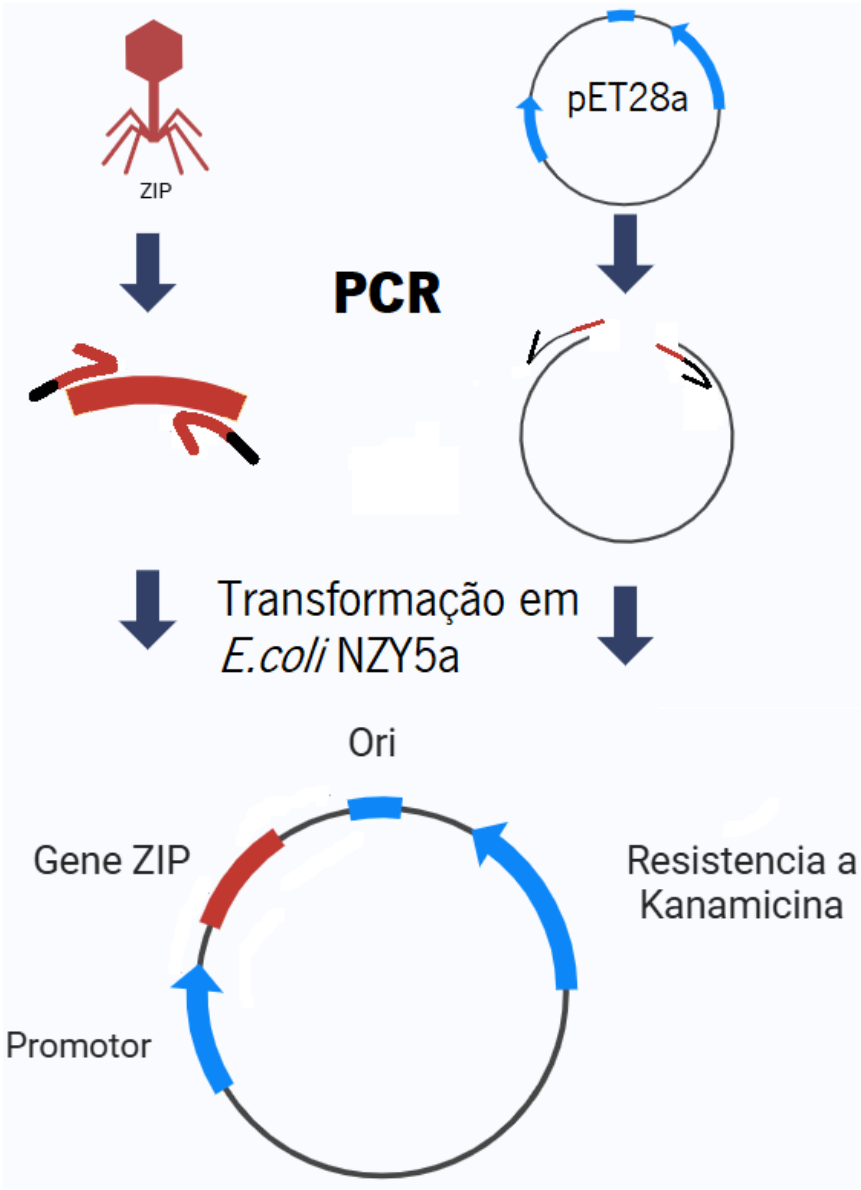


Figura 8. Estratégia usada para inserção do gene da endolisina ZIP em pET28a.

2.4.2.7 Isolamento do plasmídeo

O kit NZYMiniprep (NZYTech) foi utilizado para isolar o plasmídeo de células de *E. coli* transformadas. Todos os tampões, soluções e colunas faziam parte do kit e todas as centrifugações foram efetuadas a 12000 x g. Uma cultura de 5 mL contendo *E.coli* , LB e 100 µg/mL de kanamicina incubada de um dia para o outro foi centrifugada durante 1 minuto e o as células foram ressuspendidas com 250 µL de tampão A1. De seguida, foram adicionados 250 µL de tampão A2 e a suspensão foi misturada suavemente por inversão 8 vezes durante 4 minutos. Adicionaram-se 300 µL de tampão A3 e a suspensão foi novamente invertida 8 vezes antes da centrifugação durante 10 minutos e da transferência do sobrenadante para a coluna de sílica. A coluna foi centrifugada durante 1 minuto, lavada com 500 µL de Buffer AY, centrifugada

novamente durante 1 minuto, lavada com 600 µL de Buffer A4 e centrifugada duas vezes durante 1 minuto. O ADN purificado foi eluído por adição de 30 µL de tampão de eluição (Buffer AE), incubação à temperatura ambiente durante 1 minuto e centrifugação durante 1 minuto. Para concentrar ainda mais o produto final, o eluente foi recarregado na coluna, incubado durante 1 minuto e novamente centrifugado durante 1 minuto. O produto final foi armazenado a -20°C até ser utilizado.

2.4.2.8 Digestão de restrição

A inserção correta do gene da endolisina em pET28a foi examinada através da digestão com *Nde*I dos plasmídeos isolados. Aproximadamente 750 ng (5 µL de 150 ng/µL de solução) de plasmídeo construído foram misturados com 1 µL de FastDigest *Nde*I (Thermo Fisher Scientific), 1x tampão (1 µL de 10x FastDigestbuffer) e 3 µL de água ultrapura. As amostras foram incubadas durante 2 horas a 37°C e analisadas por eletroforese em gel de agarose a 1%, tal como descrito no ponto 2.4.2.2.

2.4.2.9 Sequenciação do ADN

A confirmação da inserção correta do gene da endolisina no pET28a e a ausência de mutações foram confirmadas por sequenciação da inserção com a utilização dos "primers" de sequenciação do promotor T7 e do terminador T7. A sequenciação foi efectuada pela Eurofins Genomics (Colónia, Alemanha) através do serviço de sequenciação LightRun Tube, utilizando 5 µL de 100 ng/µL de construção plasmídica purificada e 5 µL de "primer" (5 pmol/µL).

2.4.2.10. Armazenamento de constructos bacterianos

As reservas de glicerol das construções genéticas de *E.coli* BL21(DE3) -pET28a-Endolisina foram preparadas ressuspendendo uma colónia isolada em 800 µL de LB, adicionando 200 µL de glicerol estéril a 100%, misturando e armazenando a -80 °C.

2.5 Produção de proteínas recombinantes

2.5.1 Transformação de *E.coli* BL21 (DE3)

Para a produção de endolisina recombinante com o "construct" do gene da endolisina-pET28a, as células foram transformadas em *E. coli* BL21(DE3) (preparadas previamente) utilizando o mesmo protocolo descrito anteriormente para a NZY5α (2.4.2.6). Foi utilizado 1 µL de construção plasmídica purificada (150 ng/µL) com 100 µL de células competentes preparadas internamente. Como controlo positivo da transformação e para utilização como controlo negativo da produção, 2 µL (6 ng) do vetor circular pET28a foram também transformados em *E. coli* BL21 (DE3).

2.5.2 Produção da endolisina

A produção de endolisina foi realizada em meios ricos com indução por isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG). Preparou-se uma pré-cultura de um dia para o outro através da inoculação de uma única colónia em 25 mL de LB+ 100 µg/mL de kanamicina em um erlenmeyer de 250 mL, e incubou-se durante a noite a 37 °C e 200 rpm. Após a medição da densidade ótica, a pré-cultura foi utilizada para inocular culturas de produção até uma DO_{600nm} inicial de 0,1. Neste estudo, foram testados diferentes meios de cultura, temperaturas de incubação pós-indução, e indução em diferentes estágios do crescimento bacteriano, conforme indicado na Tabela 4. Em todos os casos, utilizou-se 50 mL de culturas de produção em erlenmeyers de 500 mL, com agitação a 200 rpm.

Tabela 4. Condições de incubação e indução usadas para produção da endolisina com o sistema de expressão endolysin-pET28a-*E. coli* BL21(DE3).

Condição	Meio	Temperatura de pré-indução	Temperatura de pós-indução	Indução a DO600nm
1	LB (10 g/l tryptone peptone, 5 g/L yeast extract, 5g/L NaCl, pH 7.2)	37	37	0.5
2	LB	37	16	0.5
3	TB (12 g/L tryptone, 24 g/L yeast extract, 5.04 g/L glycerol, 72 mM K2HPO4, 17 mM KH2PO4, pH 7.5)	37	37	~5.5
4	TB	37	16	~5.5

Na produção de proteínas recombinantes, induziram-se as culturas de LB a DO_{600nm}=0,5 e as culturas de TB a DO_{600nm}=5,5. Recolheu-se amostras de 1 mL em duplicado às 0, 2, 4, 18 e 24 horas após a indução. As amostras foram centrifugadas a 12000 x g durante 5 minutos, e o sobrenadante e as células foram separados e armazenados a -20°C até posterior utilização. Como controlos negativos utilizou-se o constructo pET28a-*E. coli* BL21(DE3) com o gene da endolisina sem indução de IPTG e o constructopET28a-*E. coli* BL21(DE3) sem o gene da endolisina e com indução de IPTG.

2.6 Pré-processamento: sonicação

Após 24 horas de incubação pós-indução, as culturas de produção de LB e TB foram centrifugadas a 5000 x g por 20 minutos, tendo o sobrenadante e as células sido separados e congelados a -20 °C. As células foram descongeladas e suspensas em 5ml de tampão de fosfato 20 mM (pH 7,4), e rompidas no gelo por sonicação com um sonicador Vibra-cell 75043. Utilizou-se uma sonda CV334 a 40% de amplitude para uma sonicação de 10 minutos em gelo com ciclos de 3 segundos ligado e 9 segundos desligado (40 minutos de tempo total). Estas suspensões foram de seguida centrifugadas a 5000 x g, durante 40 minutos, a 4 °C, e o sobrenadante (fração solúvel intracelular) e o "pellet" (fração insolúvel intracelular) armazenados a -20 °C até à sua utilização.

2.7 Análise por SDS-PAGE

2.7.1 SDS-PAGE

Os géis de SDS_PAGE 10% foram preparados conforme descrito na Tabela 5. Todos os géis correram a 100 V durante cerca de 2 horas.

Tabela 5. Composição dos géis de SDS-PAGE.

SDS-PAGE 10%	**1 Gel**	
	Separador	Concentrador
Acrilamida\ Bisacrilamida 40% (29,1:0,9)	1,7	0,3
0,25 M Tris-HCl 0,2% SDS pH 6,8	-	1,3
0,75 M Tris-HCl 0,2% SDS pH 8,8	3,4	-
Água ultrapura	1,6	1,080
APS 10%	0,040	0,020
TEMED	0,010	0,008

2.7.2 Preparação das amostras para analise em SDS-PAGE

As amostras de células foram descongeladas e ressuspendidas em 100 μL de tampão TE (5 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8) e 25 μL de tampão de carga 5x SDS-PAGE (10% SDS, 40% (v/v) glicerol, 0,2 M Tris-HCl, 50 mM β-mercaptoetanol, 0,05% azul de bromofenol). As amostras foram agitadas em vortex, aquecidas durante 5 minutos a 98 °C e novamente agitadas em vortex antes da centrifugação a 14000 x g durante 25 minutos. 10-20 μL de sobrenadante foram colocados nos géis.

Para a análise das frações intracelulares insolúveis, foram adicionados 25 μL de tampão de carregamento 5x SDS-PAGE, a suspensão foi misturada por vortex, aquecida a 98 °C durante 5 minutos, novamente misturada por vortex, centrifugada a 14000 x g durante 25 minutos, e 10-20 μL do sobrenadante foram carregados para os géis.

Para os sobrenadantes das culturas e as fracções intracelulares solúveis, 10-20 µL das amostras foram misturados com o tampão de carregamento e adicionadas ao gel SDS-PAGE ou as amostras foram concentradas por precipitação com ácido tricloroacético (TCA). Adicionou-se TCA a 100% à concentração final de 10% e as amostras foram incubadas com agitação ocasional durante 30 minutos antes de serem centrifugadas a 14000 x g durante 15 minutos. O precipitado foi ressuspenso em 20 µL de tampão de carregamento 5x SDS-PAGE e o pH foi ajustado para neutro por adição de solução saturada de Tris pH 8 até o indicador azul de bromofenol ficar azul. A amostra foi aquecida durante 5 minutos a 98 °C, agitada em vortex, centrifugada a 14000 x g durante 25 minutos e 10-20 µL de sobrenadante foram carregados nos géis.

2.7.3 Coloração do gel SDS-PAGE

Os géis foram corados com a solução de azul de coomassie (0,2% de Coomassie Brilliant Blue G250; 10% de ácido acético; 40% de etanol absoluto; e 49,8% de água destilada) durante cerca de 1 hora antes da incubação durante a noite em solução de descoloração (7,5% de ácido acético; 20% de etanol absoluto; e 72,5% de água destilada).

2.8 Ensaio de atividade da endolisina

Adicionou-se 10 µL do sobrenadante da amostra obtida em 2.5.2 sobre a placas com o "tapete" bacteriano feito como descrito em 2.2.1, e incubou-se a 37 °C durante a noite. A atividade foi identificada por halos no local do "tapete" bacteriano onde foi aplicada a amostra contendo a endolisina. As amostras da produção com a construção pET28a-*E.coli* BL21(DE3), sem o gene da endolisina, foram utilizadas como controlo negativo.

3. Resultados e discussão

Dado que o tema geral deste trabalho se foca no controlo de *E. faecalis* num contexto de cultura bacteriana mista, mais concretamente na presença de *S. aureus*, foi necessário começar por avaliar se/como o crescimento da primeira bactéria poderia ser afetado pela presença da segunda. Para tal, avaliou-se e comparou-se o crescimento de *E. faecalis* em cultura simples e em cultura mista.

3.1 Avaliação do crescimento bacteriano – cultura simples e cultura mista

Na Figura 9 observa-se que, nas condições testadas neste trabalho, a *E. faecalis* apresentou um período de latência de cerca de 3 horas, seguindo-se a fase exponencial até às 6 horas. Foi também possível verificar que pelas 7 h a cultura entrou em fase estacionária. Estes resultados estão de acordo com outras curvas de crescimento de *E. faecalis* em meio rico, previamente reportadas (Haseeb et al., 2016; Ramasamy et al., 2015), e permitiram identificar os pontos temporais que delimitam as principais fases de crescimento da bactéria em estudo.

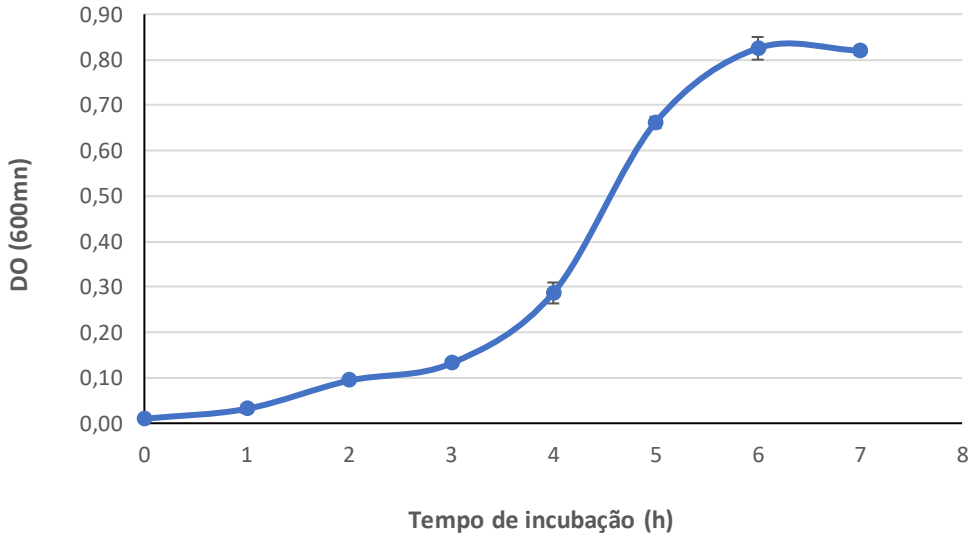


Fig 9. Curva de crescimento de cultura simples de *E. faecalis* I900 em TSB, 37°C e agitação a 150 rpm.

Aquando do crescimento de *E. faecalis* em cultura mista observou-se que a presença da *S. aureus* não afetou de forma significativa o seu crescimento (Figura 10). Este resultado está de acordo com o que foi previamente reportado por LaPlante *et al.* (2006), cujo estudo também foi realizado com culturas planctónicas. Contudo, este mesmo autor verificou que o crescimento de *S. aureus* foi inibido pela presença de *E. faecalis* quando em cultura mista planctónica, enquanto que no presente trabalho não se verificou esse efeito. Na verdade, o crescimento de ambas as bactérias em cultura mista foi semelhante durante as primeiras 10 horas, mas na fase estacionária (às 16h e 24 h) a concentração de *S. aureus* foi cerca de 1 Log_{10} superior à da *E. faecalis* (Figura 10). Note-se que existem muito poucos estudos sobre o crescimento conjunto destas duas bactérias em suspensão e, em comparação com LaPlante *et al.* (2016), diferentes estirpes, meio

de cultura e condições de crescimento foram usadas no presente trabalho, o que poderá justificar as diferenças encontradas. Assim, para uma melhor compreensão deste assunto, é necessário que se realizem mais estudos.

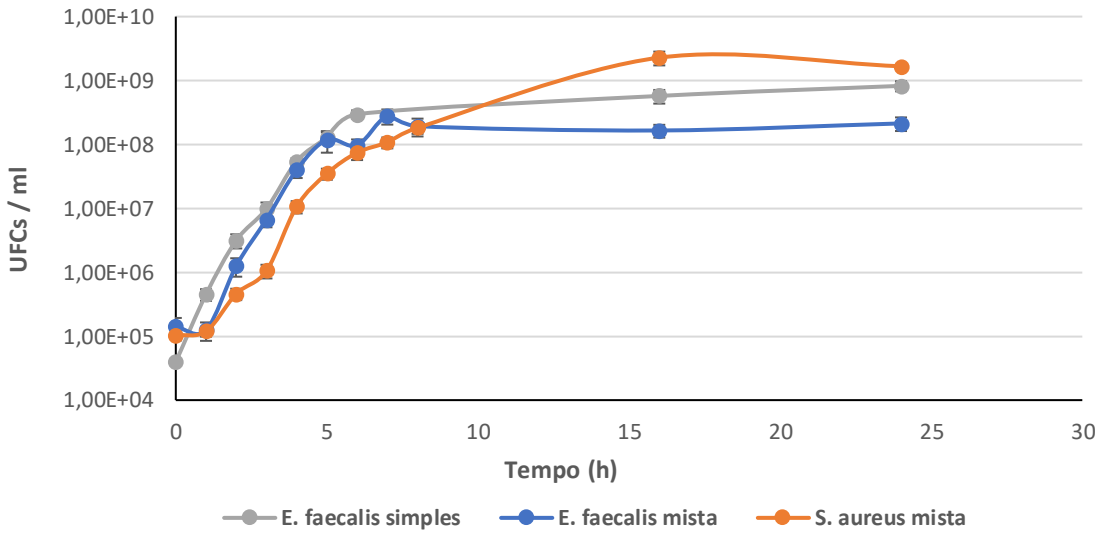


Figura 10. Concentração bacteriana ao longo do tempo aquando do crescimento de *E. faecalis* em cultura simples e em cultura mista com *S. aureus*.

3.2 Avaliação do efeito do fago Max – cultura simples e cultura mista

Uma vez avaliado o crescimento de *E. faecalis* em cultura simples e cultura mista com *S. aureus*, seguiu-se a avaliação da ação do fago Max em ambos os tipos de cultura mencionados, tendo também sido avaliado o efeito do fago em diferentes fases de crescimento bacteriano – fase estacionária e fase exponencial.

3.2.1 Culturas em fase estacionária

Os resultados relativos à aplicação do fago Max em cultura simples de *E. faecalis* e mista com *S. aureus,* quando em fase estacionária, mostraram que em nenhum dos casos ocorreu uma diminuição significativa da concentração bacteriana, isso está demonstrado na figura 11. Este resultado deverá estar relacionado com o facto de os fagos em geral terem baixo efeito lítico quando em presença de culturas bacterianas em fase estacionária. De facto, é sabido que o estado fisiológico da célula hospedeira tem grande influência na replicação dos fagos, dado que as células

em crescimento exponencial são mais rapidamente lisadas do que as células em estado estacionário (Storms & Sauvageau, 2015). Este fenómeno foi também previamente reportado em relação a diferentes fagos que infetam outras bactérias, tais como *Pseudomonas fluorescens* (Sillankorva et al., 2004), *Klebsiella pneumoniae* (Jamal, 2015) e *Staphylococcus epidermidis* (Cerca et al., 2007). Estes dois últimos autores demonstraram também que a taxa de morte das células bacterianas por ação do fago foi semelhante quando comparando células de biofilme e células planctónicas em fase estacionária, taxa essa que se revelou ser mais baixa do que a verificada na eliminação das células em fase de crescimento exponencial. Embora esta realidade seja conhecida, não deixa de ser importante estudar a infeção fágica em células em fase estacionária, dado que na natureza os fagos encontram, em grande parte, células que não estão em crescimento. Quando as bactérias entram em fase estacionária geralmente ativam mecanismos de defesa ao stress bem estudados, os quais drasticamente alteram a célula, facilitando a sua sobrevivência a longo-termo. Compreender as interações fago-hospedeiro nestas condições é da maior relevância quer do ponto de vista ecológico como também do ponto de vista terapêutico (Bryan et al., 2016).

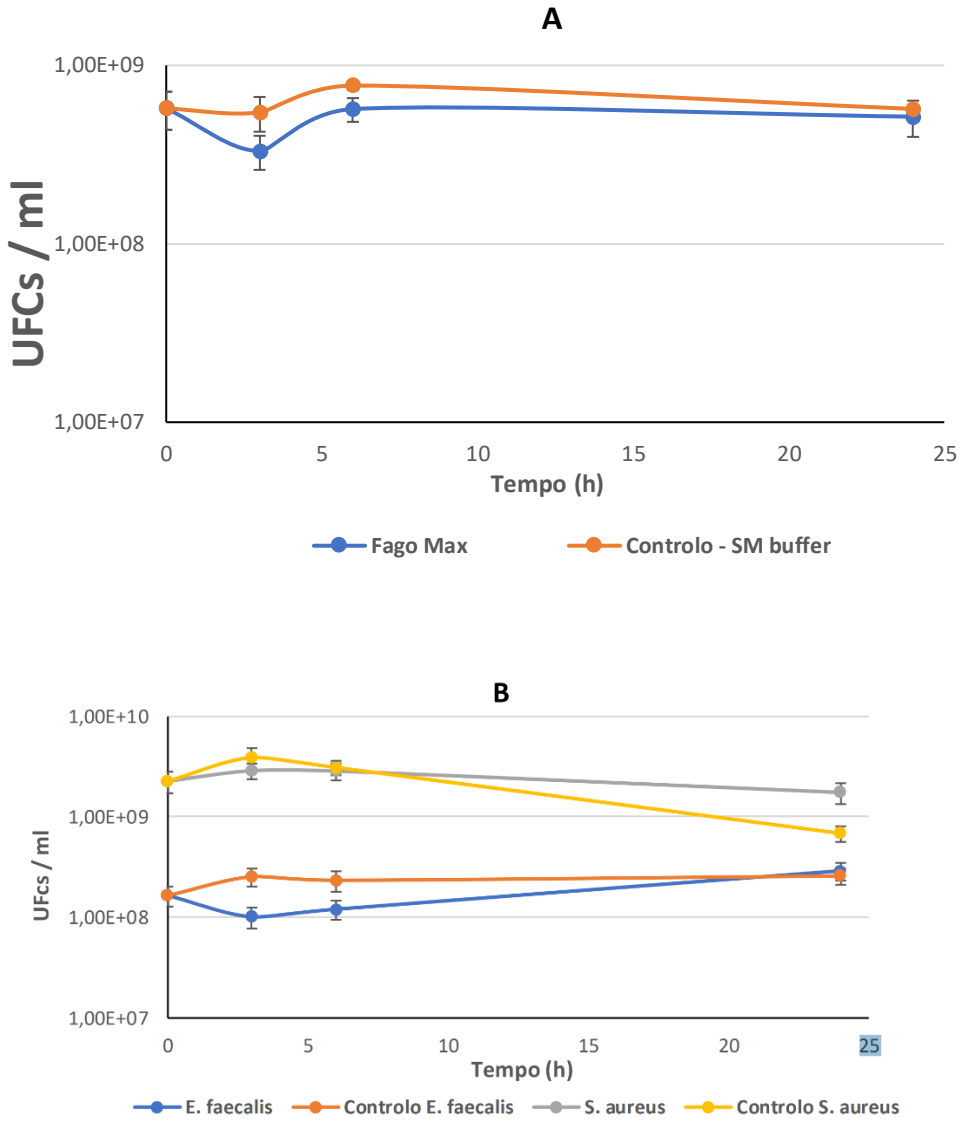


Figura 11. Concentração bacteriana ao longo do tempo após aplicação do fago Max (tempo zero) numa cultura simples de *E. faecalis* (A) e numa cultura mista de *E. faecalis* e *S. aureus* (B) em fase estacionária.

3.2.2 Culturas em fase exponencial

Por sua vez, os resultados relativos à aplicação do fago Max em cultura simples de *E. faecalis* e mista com *S. aureus* quando em fase exponencial mostraram que, enquanto em cultura simples ocorreu uma redução de 1 Log_{10} da concentração de *E. faecalis* (em comparação com o controlo, sem fago; Figura 12A), na cultura mista ocorreu uma redução muito significativa da concentração desta bactéria nas primeiras horas após adição do fago, não tendo sido detetada a presença da bactéria aquando da amostragem às 3 horas (Figura 12B). Ainda assim, não se pode afirmar que ocorreu uma total erradicação desta bactéria, dado que às 16 horas após adição do fago voltou a

detetar-se a presença de *E. faecalis* em concentração semelhante à inicial (ponto zero). Note-se que a linha a ponteado apresentada na Figura 12B serve para fins meramente ilustrativos, apenas para simular a descida acentuada na concentração de *E. faecalis* que levou à não-deteção desta bactéria no ponto das 3 horas e o seu reaparecimento detetado no ponto das 16 horas. Verificou-se também, em todos os ensaios, que nenhuma das amostras controlo (em que o fago foi substituído pela solução de SM-Buffer) sofreu alteração significativa da concentração bacteriana, e que a concentração de *S. aureus* nunca foi afetada pela presença do fago Max.

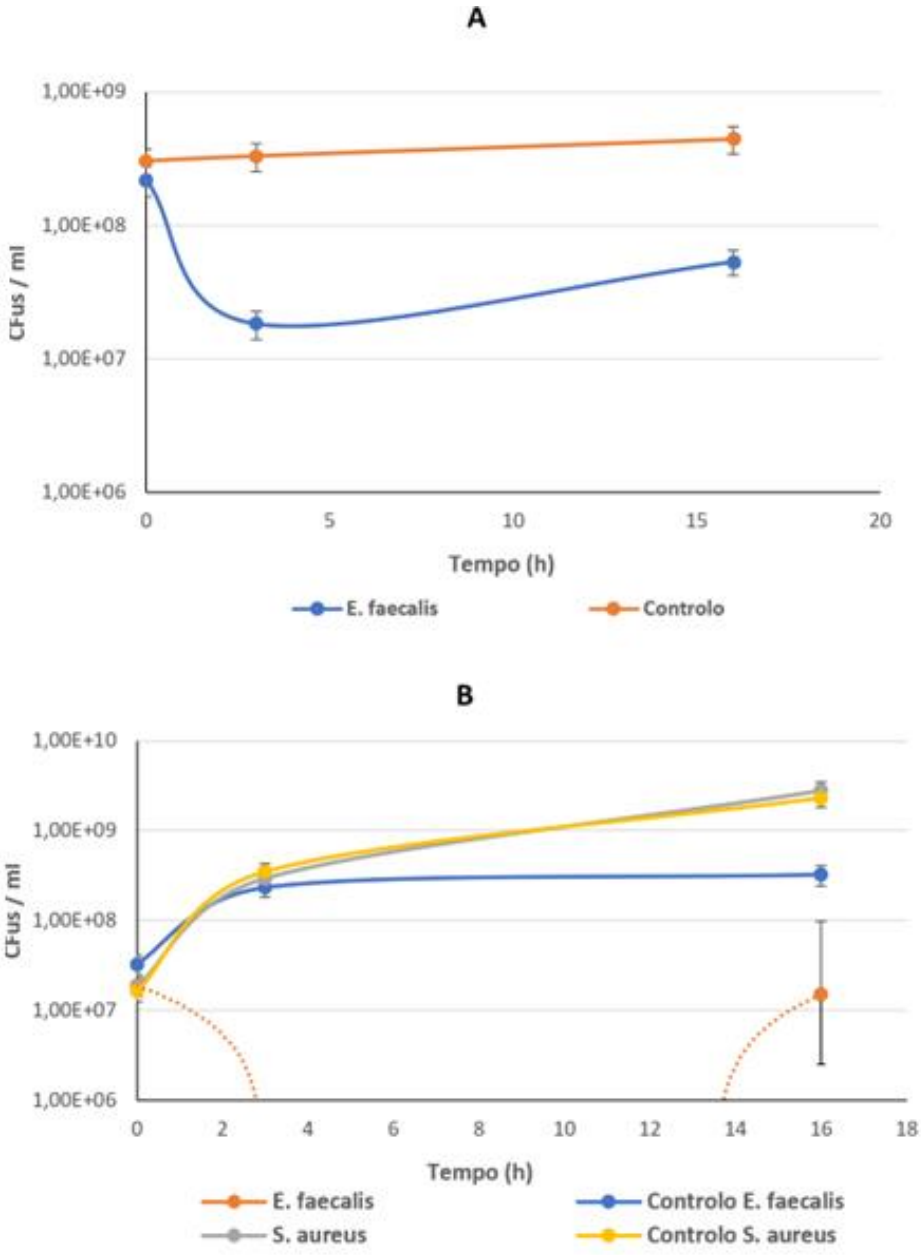


Figura 12. Concentração bacteriana ao longo do tempo após aplicação do fago Max (tempo zero) numa cultura simples de E. faecalis (A) e numa cultura mista de E. faecalis e S. aureus (B) em fase exponencial.

Os resultados aqui obtidos com culturas em fase exponencial, quando comparados com os resultados obtidos com culturas em fase estacionária (Figura 12), estão de acordo com o que foi dito anteriormente sobre uma melhor ação dos fagos quando na presença de células em fase exponencial de crescimento. Por sua vez, considerando apenas as culturas em fase exponencial, apenas se observou uma ação lítica significativa do fago Max quando em contacto com a cultura mista (Figura 12B). Isto poderá dever-se ao facto de haver fagos que são mais eficazes contra uma bactéria quando esta se encontra em cultura mista do que quando se encontra em cultura simples Este fenómeno já foi anteriormente reportado por outros autores, quer em populações planctónicas como em biofilmes, justificando-se pela possibilidade de a competição entre as espécies bacterianas poder levar a uma atividade fágica mais eficaz, dado que a resistência bacteriana aos fagos poderá diminuir a capacidade competitiva das bactérias (Gutiérrez et al., 2015; Harcombe & Bull, 2005). Ademais, sabe-se que a presença de fagos de *E. faecalis* ativa o mecanismo T7SS que, por sua vez, altera a expressão de genes bacterianos associados a interações intra e inter-bacterianas (Chatterjee et al., 2020). Nas bactérias Gram-positivas, essa interação causa o antagonismo bacteriano no meio de cultura (Chatterjee et al., 2021). Em vários estudos já foi observado que a *S. aureus* também é dotada do mecanismo T7SS e que o pode usá-lo na sua auto-preservação (Chatterjee et al., 2021; Spencer & Doran, 2022). Com base em todas estas informações, infere-se que estas possam ter sido as razões pelas quais se observou, no presente trabalho, uma redução da bactéria *E. faecalis* superior a 3 Log_{10} aquando da adição do fago Max à cultura mista em fase exponencial. Por outro lado, o reaparecimento desta bactéria no ponto de amostragem às 16 h explica-se com base num fenómeno já largamente estudado e reportado: em resposta à presença do fago, é selecionada uma população de células bacterianas resistentes que consegue superar a infeção fágica e restabelece o crescimento do hospedeiro (Obradović et al., 2023; Vukotic et al., 2020). Embora seja também conhecido que esta população insensível ao fago surge relativamente rápido, a eficiência bactericida inicial não deve ser desprezada, principalmente tendo em conta os ótimos resultados obtidos aquando do uso de fagos em combinação com antibióticos, tal como reportado por vários autores (Eskenazi et al., 2022; Verma et al., 2009).

De uma forma geral, e tendo em conta os objetivos do trabalho, os ensaios microbiológicos mostraram que o fago Max tem potencial para promover o controlo de *E. faecalis* em cultura mista. Contudo, estudos adicionais envolvendo a aplicação combinada de fago e antibióticos, assim como

a sua ação em populações de biofilme, serão necessários para uma melhor avaliação deste potencial.

3.3 Clonagem genética da endolisina

O objetivo desta parte do trabalho foi produzir as endolisinas dos bacteriófagos ZIP e Max no hospedeiro de expressão comumente usado, *E. coli*, com o sistema de vetor de expressão pET. Tal como em estudos anteriores (Melo et al 2018), pretendeu-se produzir as endolisinas recombinantes com uma sequência N-terminal His tag para facilitar a posterior purificação das proteínas produzidas.

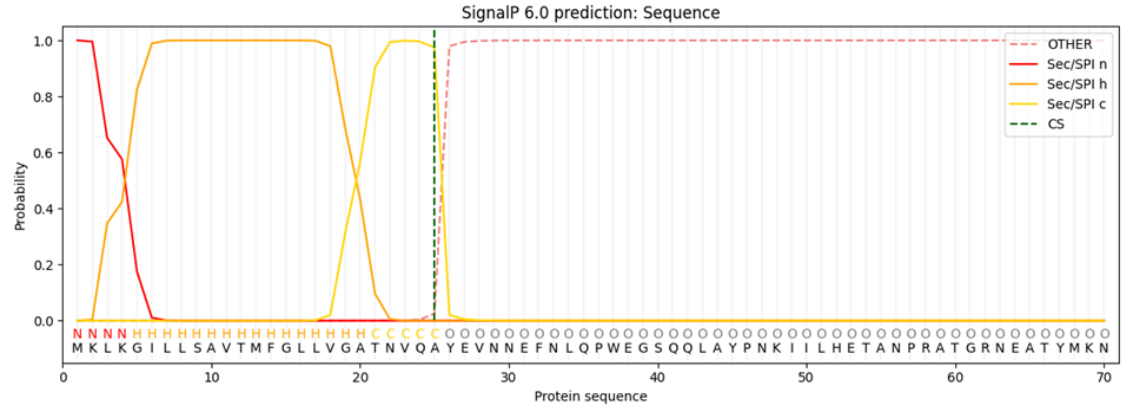
3.3.1 Bioinformatica: análise da sequência

A sequência completa de aminoácidos da endolisina Max (identificação GenBank QAX97259.1) é composta por 328 aminoácidos, tem um peso molecular de 36685,22 Da e um p/(ponto isoeletrico) teórico de 6,07. Do mesmo modo, a sequência completa de aminoácidos da endolisina ZIP (identificação Genebank QAX97329.1) é composta por 304 aminoácidos, tem um peso molecular de 29665 Da e um p/teórico de 5,07. A análise da sequência da endolisina Max com SignalP e TargetP-2.0 (ver Tabela 6 e Figura 13) indica uma elevada probabilidade (Probabilidades - sinal P: 0,99912; TargetP-2.0: 0,9991) para a presença de um peptídeo de sinalização que direciona a endolisina Max para a via secretora (Sec) com clivagem pela Peptidase de sinal (SPI) entre os aminoácidos A25-Y26 na sequência VQA-YE. (Probabilidade TargetP-2.0: 0,7288). Por outro lado, não foi identificada qualquer sequência de sinal para a endolisina ZIP com nenhuma das ferramentas.

Tabela 6. Identificação de potenciais peptídeos de sinalização na endolisina Max.

ID Prediction	Sec/SPI	LIPO-Sec/SPII	TAT-Tat/SPI	TATLIPO-Sec/SPII	PILIN(Sec/SPIII)
Likelihood	0.999125	0.000171	0.000168	0.000147	0.000134

(A)



(B)

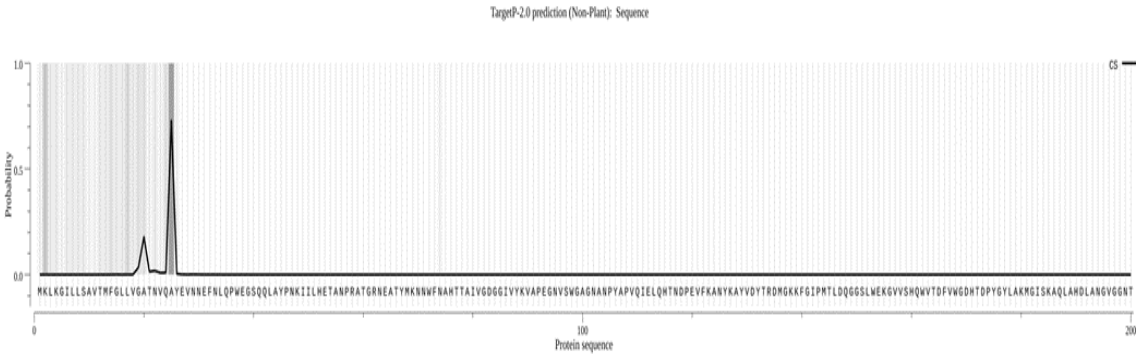


Figura 13. Identificação do local de clivagem sugerido (CS), das regiões N-terminal (N, n), hidrofóbica (H, h) e C-terminal (C, c) do péptido sinal da endolisina Max, tal como previsto pelo SignalP 6.0 (A) e TargetP-2.0 (B).

A análise PFAM e SMART da endolisina Max indicou uma elevada probabilidade da presença de um domínio catalítico do tipo amidase 2 (PFAM: 9,7e-13; SMART: 5,66e-26) e um domínio C-terminal ZoocinA TRD (PFAM: 9,2e-33, SMART: 7,9e-33). Além disso, foi identificada uma região repetitiva de baixa complexidade (NTATPTPKPNNPKPTQPAKP) entre estes dois domínios, que foi reconhecida pelo Domcut como sendo potencialmente uma sequência de ligação.

(A)



Family	Description	Entry type	Clan	Envelope Start	Envelope End	Alignment Start	Alignment End	HMM From	HMM To	HMM length	Bit score	E-value	Predicted active sites	Show/hide alignment
ZoocinA_TRD	Target recognition domain of lytic exoenzyme (shorten)	Domain	n/a	221	327	223	327	2	106	106	112.7	9.2e-33	n/a	Hide
Amidase_2	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	Domain	n/a	42	176	45	175	4	126	127	48.8	9.7e-13	n/a	Hide

(B)

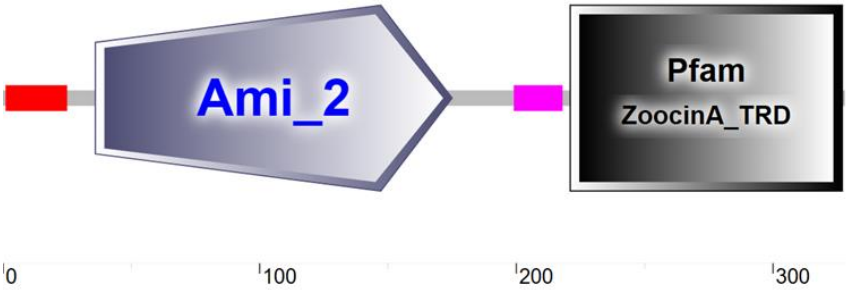
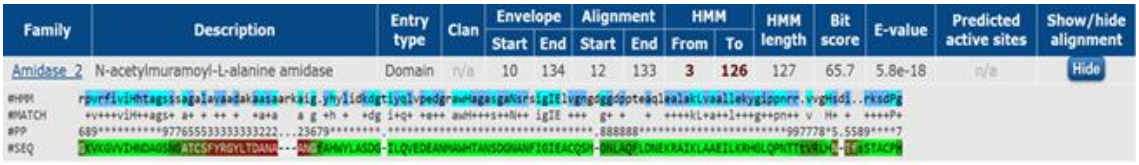


Figura 14. Análise PFAM (A) e SMART (B) da sequência de aminoácidos da endolisina Max.

No caso da endolisina ZIP, apenas um domínio foi identificado com o PFAM e o SMART, o de um domínio catalítico do tipo amidase 2 (PFAM:5.8e-18; SMART: 9.56e-24), enquanto o Domcut também identificou uma potencial sequência de ligação à volta dos aminoácidos ~161-176. Curiosamente, as sequências identificadas correspondem apenas aos aminoácidos ~10-176, enquanto a endolisina ZIP é uma proteína de 304 aminoácidos. As pesquisas de homologia da sequência de aminoácidos da restante sequência (ou seja, os aminoácidos 177-304) com BlastP identificaram resultados, até 90% de identidade, com outras amidases, mas também com muramidases e lisozimas da família 25 de glicosidase hidrolase (68% e inferior) e proteínas de reconhecimento de peptidoglicanos (46% e inferior).

(A)



Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment		HMM		HMM length	Bit score	E-value	Predicted active sites	Show/hide alignment
				Start	End	Start	End	From	To					
Amidase_2	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	Domain	n/a	10	134	12	133	3	126	127	65.7	5.8e-18	n/a	Hide

(B)

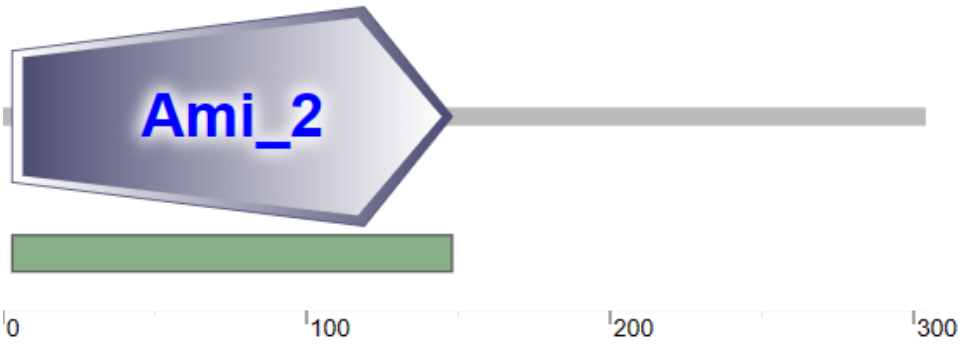


Figura 15. Análise PFAM (A) e SMART (B) da sequência de aminoácidos da endolisina ZIP.

Assim, para concluir a análise bioinformática da endolisina Max, e tal como destacado e codificado por cores na figura 15 a Max é composta por uma sequência de sinalização N-terminal (~1-25, amarelo), um domínio catalítico (N-acetilmuramoil-L-alanina amidase, verde) (42-176, 36-175), um sequência de ligação (~199-218, vermelho), e um domínio ZoocinA Target Recognition Domain (TRD) no C-terminal (~221-327, azul). A proteína madura, sem o péptido sinalizador, é composta por 303 aminoácidos, tem um peso molecular de 34127,04 Da e um p/teórico de 5,76. Esta organização modular, que combina um domínio amidase 2 com um TRD, não é invulgar nas endolisinas de bacteriófagos *enterococcus*, representando quase 13% das sequências conhecidas (Viglasky et al 2023). A N-acetilmuramoil-L-alanina amidase, ou domínio amidase 2, é o domínio catalítico mais comum encontrado nas endolisinas de bacteriófagos *enterococcus* (Viglasky et al 2023). Este domínio catalítico catalisa a clivagem da ligação amida entre o grupo lactílico do N-acetilmuramoil da cadeia de glicano e a L-alanina dos "stem peptides". A Zoocina A é também uma exoenzima lítica, produzida por *Streptococcus equi* subespécie *zooepidemicus* 4881, e hidrolisa a camada de peptidoglicano de bactérias gram-positivas específicas, nomeadamente várias espécies de *Streptococcus* (Chen et al., 2012). Tal como a endolisina Max, também é secretada e é composta por um domínio catalítico no N-terminal e uma sequência de ligação que o separa de um TRD C-terminal. O TRD da Zoocina A atua como um domínio específico de ligação

celular, possivelmente interagindo com a porção peptídica ou, mais especificamente, com os dois resíduos de alanina das "crossbridges" peptídicas, do peptidoglicano em estirpes microbianas sensíveis, e assim direcciona a enzima para o seu substrato (Chen et al, 2013). Provavelmente tem a mesma função na endolisina Max, ativa contra bactérias Gram-positivas. Por outro lado, não se sabe se esta também se ligaria ao peptidoglicano de *E. coli*, o hospedeiro Gram-negativo utilizado para a produção da endolisina Max recombinante no presente estudo, devido a diferenças estruturais na região peptídica do peptidoglicano. No entanto, em qualquer caso, é de esperar que o domínio da amidase 2 mantenha a sua atividade de hidrólise do peptidoglicano neste hospedeiro.

MKLKGILLSAVTMFGLLVGATNVQAYEVNNEFNLQPWEGSQQLAYPNKIILHETANPRATGRNEATYMKN
NWFNAHTTAIVGDGGIVYKVAPEGNVSWGAGNANPYAPVQIELQHTNDPEVFKANYKAYVDYTRDMGKKF
GIPMTLDQGGSLWEKGVVSHQWVTDFVWGDHTDPYGYLAKMGISKAQLAHDLANGVGGNTATPTPKPN
NPKPTQPAKPSNKRRFNYRVDGLEYVNGMWQIYNEHLGKIDFNWTENGIPVEVVDKVNPATGQPTKDQV
LKVGDYFNFQENSTGVVQEQTPYMGYTLSHVQLPNEFIWLFTDSKQSLMYQ

Figura 16. Sequência de aminoácidos da endolisina Max com identificação dos domínios sugeridos de acordo com o código de cores referido no texto.

No caso da endolisina ZIP (figura 16, ao contrário da endolisina Max, não tem um sinal de secreção, mas tal como a endolisina Max, ela contem um domínio catalítico N-terminal de N-acetilmuramoil-L-alanina amidase (10-134, 3-148, verde). Além disso, embora o DomCut também tenha sugerido uma região de ligação em aminoácidos ~161-176 (vermelho), tal não foi confirmado com as outras ferramentas utilizadas no presente documento. Além disso, não é atualmente certo se a região C-terminal desta proteína faz parte do domínio da endolisina ou, mais provavelmente, é outro domínio separado de função atualmente desconhecida. De facto, pode sugerir-se que se trata potencialmente de um domínio de ligação celular, de acordo com o que é geralmente observado para as endolisinas específicas de Gram positivas e como foi recentemente sugerido (Viglasky et al 2023).

MITKGIAGRRQGKVKGVVIHNDAGSNGATCSFYRGYLTDANAANGFAHWYLASDGILQVEDEANMAWHTA
NSDGNANFIGIEACQSMGNLAQFLDNEKRAIKLAAEILKRHGLQPNTTTVRLHNTFSSTACPHRSQEQHG
AGSKTQAYFIAEIKKHMNGSTPAPAKPSTPKGHDEAVAASKPKHQGNAWGKLDKYREEPAGQIRVAGWL
VPDKPQGPIGKYAYVLFMQHGTGKELTRVQSQGIKRPDVKKAYGYQGGQELGFDVTVKKAQFKGKKVDVI
LRRANKSNGEGSVNDVRIDSIYLTL

Figura 17. Sequência de aminoácidos da endolisina ZIP com identificação dos domínios sugeridos de acordo com o código de cores descrito no texto.

3.3.2 Clonagem por recombinação homologa

Num estudo anterior, realizado por Melo *et al.* (2018), foi utilizado o vetor de expressão pET28a com os locais de digestão de restrição *Nde*I e *Xho*I para a inserção do gene da endolisina. No entanto, no nosso estudo, as análises do mapa de digestão de restrição das sequências de ADN indicaram a presença de três sítios *Nde*I na sequência do gene da endolisina Max e um na sequência do gene da endolisina ZIP. Obviamente, a presença de tais sítios de digestão de restrição nas sequências a serem inseridas impede a clonagem de genes utilizando a estratégia de clonagem por digestão e ligação, a estratégia mais comumente utilizada. Para ultrapassar esta limitação, decidiu-se utilizar outra estratégia de clonagem, que evita a necessidade de digestão de restrição, mas que ainda permite a clonagem posicional da sequência de interesse no vetor pET28a. Esta estratégia baseia-se na preparação de sequências de vetor e de gene de interesse com extremidades homólogas sobrepostas e que, após transformação em *E. coli*, são recombinadas in vivo para produzir construções circulares. Esta capacidade da *E. coli* para recombinar eficazmente sequências de ADN é relativamente desconhecida mas, dado que já tinha sido previamente desenvolvido e otimizado um protocolo para esta estratégia de clonagem, este foi utilizado no presente trabalho para a inserção dos genes da endolisina nos sítios *Nde*I/*Xho*I sem necessidade de digestão. A clonagem do gene da endolisina ZIP em pET28a é aqui descrita, mas foram utilizados procedimentos semelhantes por outros para a preparação de um constructo de expressão da endolisina em pET28a-Max.

Na Tablea 8 estão representadas as sequências de primers desenhadas para a amplificação por PCR do gene da endolisina ZIP e do vetor pET28a com sequências homólogas para permitir a inserção do gene em pET28a por recombinação homóloga in vivo em *E. coli*. A utilização destes primers permite a produção de produtos de PCR lineares em que o 5' do produto de PCR da endolisina ZIP (primer ZIP Endolysin Forward) tem uma homologia de sobreposição de

53 pb com o 3' do produto de PCR do pET28a (primer pET28a Reverse) e o 3' do produto de PCR da endolisina (primer ZIP Endolysin Reverse) tem uma sobreposição de 46 pb com o 5' do produto de PCR do pET28a (primer pET28a Forward).

Tabela 7. Sequências e composição dos "primers". As sequências do vetor estão em letras maiúsculas, as sequências da endolisina ZIP estão em letras minúsculas, as sequências da cauda adicionadas estão sublinhadas e as regiões de sobreposição dos "primers" estão em itálico

Primers	**Sequencia do primer (5'-3')**	**tamanho (nt)**	**Homologia com o template**
Endolisina ZIP "Forward" (com incorporação de 21 bp da sequência do pET28a)	CTCAGT*GGTGGTGGTGGTGGTGCTCGA Gttatagcgttaaatagatac*	48	18 bp
Endolisina ZIP "Reverse" (com incorporação de 28 bp da sequência do pET28a)	CTG*GTGCCGCGCGGCAGCCATatgattaca aaaggaattg*	40	20 bp
pEt 28a "Forward" (com incorporação de 25 bp da sequência da endolisina ZIP)	gtccag*caattccttttgtaatcatATGGCTGCCG CGCGGCAC*	43	18 bp
pEt 28a "Reverse" (com incorporação de 25 bp da sequência da endolisina ZIP)	cgata*gtatctatttaacgctataaCTCGAGCACC ACCACCACCACC*	47	22 bp

O PCR do pET28a foi testado com quantidades de 0,5, 5 e 50 ng por reação e uma temperatura de emparelhamento de primers de 55 °C. Na análise do gel de agarose foram vistos tres bandas com o tamanho esperado aproximado de 5419 pb (tamanho do pET28a + primers contendo

homologia). Dentre as tres bandas visualizadas no gel duas possuiam boa visualização e a que possuia 0,5 ng do vetor pET28a foi mais fraca.

Para a amplificação do gene da endolisina, o fago ZIP de *enterococcus* foi utilizado diretamente como "template" com a incorporação de um passo de desnaturação inicial prolongado, aumentado de 3 para 15 minutos, de modo a assegurar a inativação do vírus e a libertação do ADN. Foram testadas concentrações de molde ("template") de 1 x 10^4 e 10^6 UFP por reação de PCR, tendo sido observada amplificação apenas para a concentração de "template" mais elevada. Também foram examinadas várias temperaturas de emparelhamento do PCR para a amplificação da endolisina e, como se pode ver na Figura 18, a amplificação de uma banda com o tamanho esperado (961 pb) foi observada a 50 °C e acima, com uma amplificação muito reduzida a 45 °C.

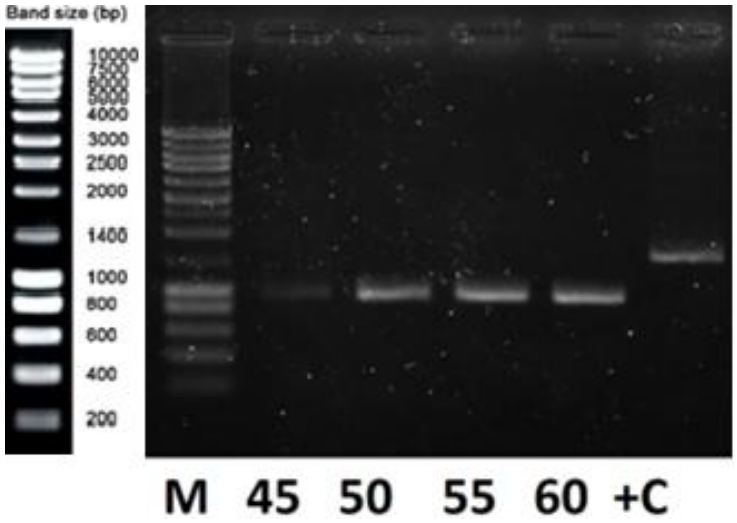


Figura 18. PCR da endolisina ZIP a diferentes temperaturas de emparelhamento. O marcador de peso molecular (M) utilizado é o DNA ladder III (NZYTech). O controlo positivo (+C) é um gene de xilanase em pET25 com amplificação com os primers T7 forward e T7 reverse.

O produto da amplificação da endolisina ZIP foi purificado a partir do gel de agarose com um rendimento de 49 ng/μL e, em seguida, misturado com o produto de PCR pET28a e submetido a digestão *Dpn*I. Esta enzima de digestão de restrição digere especificamente na sua sequência de reconhecimento GATC apenas quando o resíduo de adenina nesta sequência está metilado, ou seja, quando está na forma N6-metiladenina. É importante notar que o ADN "template" utilizado nas reações de PCR foi isolado de estirpes dam+ e, por conseguinte, está metilado, enquanto os produtos de PCR não estão metilados. Assim, a enzima apenas degradará o ADN "template",

deixando intactos os produtos da PCR. Sabe-se que a sequência de reconhecimento GATC é bastante comum nas sequências de ADN e que estão presentes 21 sítios na sequência pET28a enquanto, curiosamente, apenas 25 sítios estão presentes no genoma ZIP e, o que é pouco comum, apenas um sítio restrição foi observado na sequência do genoma Max. No entanto, a utilização desta etapa de digestão *Dpn*I, em conjunto com a purificação em gel de agarose dos produtos de PCR efectuada antes da mesma, garante que nenhum ADN "template" viral ou plasmídeo "template" interfere com as etapas de clonagem subsequentes. Foram utilizadas diferentes concentrações do vetor e do inserido para a digestão *Dpn*I, conforme descrito na Tabela 8 e, após incubação, foram utilizados 10 μL da reação para transformar diretamente a *E. coli* NZY5α.

Tabela 8. Condições testadas para a digestão de DpnI e número resultante de transformantes. Note-se que para cada reação foram usadas 10 unidades de DpnI e tampão de digestão 1x.

Condição	**Gene de ZIP endolisina (concentração de producto de PCR purificado)**	**pET28a PCR (concentração de template usado para PCR)**	**Número de células *E. coli* NZY5α transformadas (unidades formadoras de colonias/800 ul)**
1	462 ng = 806 fmols	5.1 ng = 1.5 fmols	6 UFC
2	413 ng = 721 fmols	10.2 ng = 3.0 fmols	16 UFC
3	316 ng = 551 fmols	20.4 ng = 6.1 fmols	23 UFC
4	219 ng = 382 fmols	30.6 ng = 9.1 fmols	40 UFC

A partir da Tabela 8 pode ver-se que uma maior quantidade de transformantes correlacionou-se com um aumento do produto de PCR do pET28a, um decréscimo do produto PCR do gene da endolisina e um decréscimo da taxa de inserção no vetor. Acredita-se que o número mais elevado de transformantes seja consequência das concentrações mais elevadas de

pET28a que contém o marcador de seleção, exercendo assim uma pressão de seleção para esta construção, com ou sem a inserção do gene. Para examinar melhor esta questão, foram selecionados 2 a 3 transformantes de cada uma das condições examinadas, os plasmídeos foram isolados e digeridos com *Nde*I e analisados por eletroforese em gel de agarose. Era esperado que as construções com a inserção desejada do gene da endolisina ZIP apresentassem duas bandas, uma a 754 pb e outra a 5454 pb. Como pode se ver na Figura 19, tais resultados foram observados apenas em 2 condições: condições 3 (2 transformantes de 2 analisados) e 1 (1 transformante de 3 analisados).

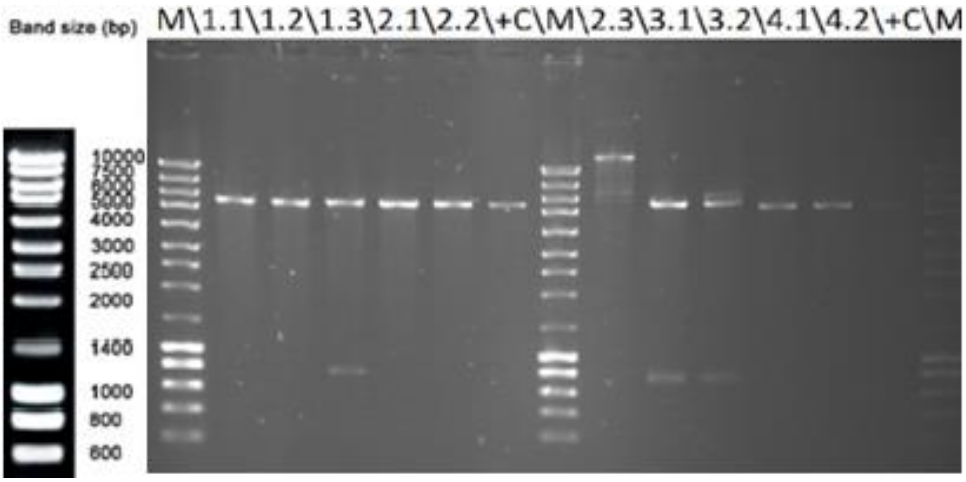


Figura 19. Eletroforese de plasmídeos digeridos com *Nde*I, comparando transformantes obtidos nas 4 condições de digestão com *Dpn*I. Marcador: DNA ladder III (M); controle positivo: xilanase em pET25. Foram obtidos 3 transformantes (1.3; 3.1 e 3.2)

Os três transformantes positivos foram selecionados e plaqueados em placas LB+ 100 $\mu g/mL$ de kanamicina, e os plasmídeos construídos foram sequenciados utilizando o promotor T7 e o terminador T7. Verificou-se que todas as construções continham a sequência correta do gene ZIP inserida na posição desejada em pET28a. O construto 3.1 foi selecionado para estudo posterior, tendo sido preparado num stock com glicerol e mantido a -80 °C.

No caso da endolisina Max, um número reduzido de transformantes foi continuamente observado e, quando as inserções foram sequenciados, a maioria delas encontrava-se mutada, tendo até sido uma vez observada uma inserção genética (sequência de um transposon) . Além disso, quando transferidos novamente para meio seletivo, os transformantes muitas vezes não cresceram. No entanto, após numerosas tentativas, um transformante com a sequência de inserção Max correta foi identificado e armazenado para análise posterior.

3.4 Produção da endolisina

O plasmídeo construído ZIP endolysin-pET28a foi transformado no hospedeiro de expressão *E. coli* BL21(DE3), e analisou-se a sua produção da proteína recombinante em meios ricos com indução da produção por IPTG. Após crescimento do pré-inoculo durante a noite, foram examinadas e comparadas 4 condições de produção diferentes. Na Figura 20 pode ver-se que, como esperado, a utilização do meio TB, mais rico e tamponado, permitiu obter densidades celulares mais elevadas; contudo, inesperadamente, não foi possível detetar claramente a sobre-expressão de uma proteína com o tamanho esperado da endolisina. Por outro lado, a utilização de LB como meio de produção permitiu a produção de endolisina, tanto a 16°C e 37 °C (Figura 20) com níveis de produção aparentemente semelhantes de 2 a 24 horas após a indução. Entretanto, numa comparação direta da produção de endolisina, (Figura 21) verificou-se que uma temperatura de 37 °C pós-indução resultou em níveis de produção mais elevados, com a produção mais elevada a ser observada após 24 horas de indução. Estudos futuros deverão centrar-se em determinar se a endolisina ZIP produzida se encontra na forma ativa.

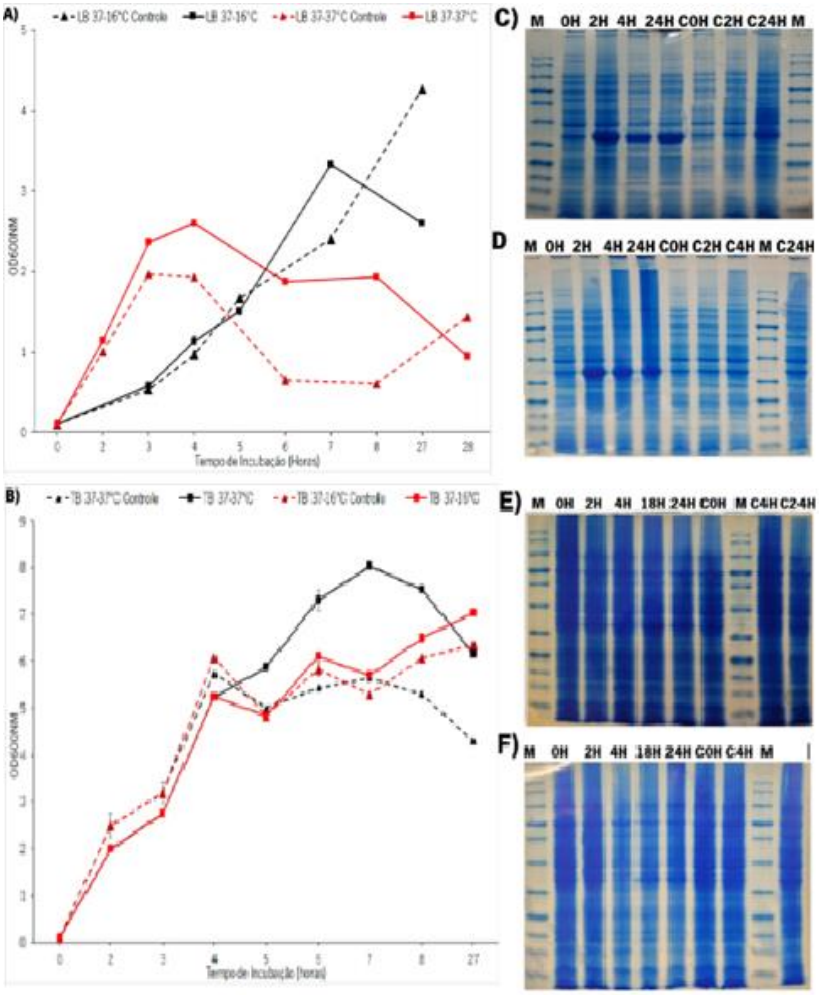


Figura 20. Curvas de crescimento para ZIP Endolysin-pET28a-E. coli BL21 (DE3) em LB (A) e TB (B) com uma temperatura de pré-indução de 37 °C, temperaturas de pós-indução de 16 ou 37 ^{0}C e análise por SDS-PAGE (C-F) de frações celulares totais retiradas no período de pós-indução a temperaturas de incubação de 16 °C (C e E) e 37 °C (D e F) para LB (C e D) e TB (E e F). O controle (C) é o sistema de expressão pET28a-E. coli BL21(DE3), sem qualquer gene inserido.

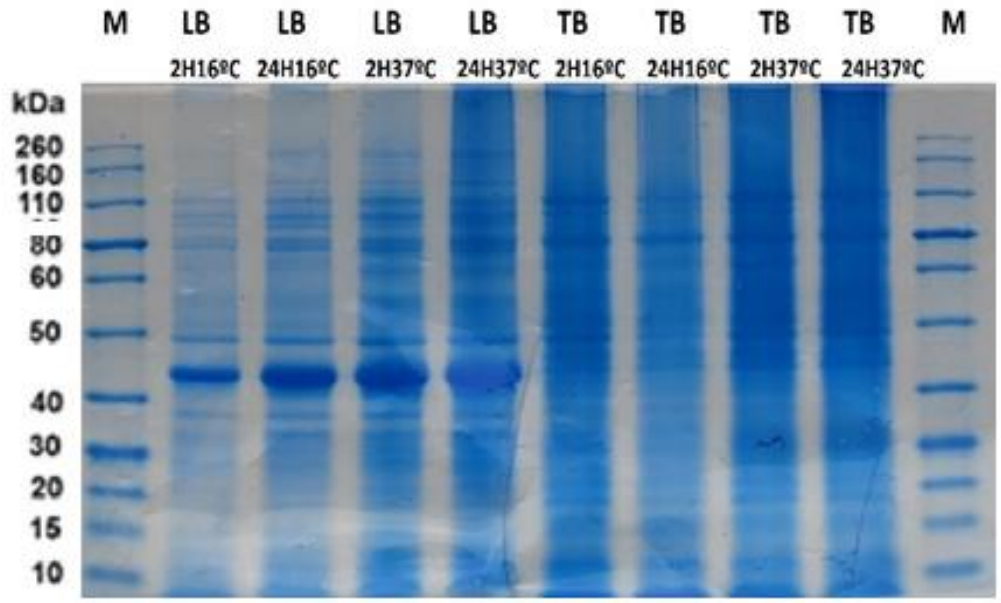


Figura 21. Análise SDS-PAGE das frações celulares totais após 2 e 24 horas de indução com IPTG nas 4 diferentes condições de produção

Em contraste com os resultados positivos obtidos com a sobre-expressão da endolisina ZIP, não foi observada qualquer evidência de produção da endolisina Max, quer analisada por SDS-PAGE quer por análise da atividade, mesmo após numerosas tentativas. Curiosamente, observou-se que, após a indução da produção, foi observada uma paragem e mesmo uma redução do crescimento celular, sendo esta acompanhada por uma libertação de proteínas para o ambiente extracelular, sugestiva de rutura celular. Esta observação, para além das dificuldades observadas com a clonagem deste gene em *E. coli*, sugere que esta endolisina pode ser tóxica para *E. coli*, sendo esta toxicidade auxiliada pela presença de um sinal de secreção nesta proteína, e com a presença do domínio TRD também potencialmente a desempenhar um papel. É importante notar que Max é conhecido por ser um bacteriófago específico de Gram-positivos e, por conseguinte, seria inesperado que a endolisina produzida por este vírus fosse ativa contra o hospedeiro Gram-negativo *E. coli*. No entanto, poder-se-ia colocar a hipótese de que o sinal de secreção identificado no Max permite a sua exportação em *E. coli* através da membrana interna para o periplasma através da via de secreção Sec, onde atua então na camada de peptidoglicano, potencialmente auxiliada pelo domínio TRD, resultando na lise celular. Isso seria bastante incomum (Melo 2019) e estudos futuros devem investigar isso ainda mais, talvez pela expressão de variantes sem o sinal de secreção e/ou o domínio de reconhecimento de alvo (TRD).

5. Conclusão

Um dos objetivos deste estudo consistiu na avaliação da atividade de fagos de *E. faecalis* quando aplicados em diferentes tipos de culturas (simples ou mistas) e em diferentes fases de crescimento bacteriano (fase estacionária e fase exponencial. Outro objetivo foi a produção e caracterização de endolisinas desses mesmos fagos de *E. faecalis*. Observou-se que na fase estacionária, o fago não apresentou efeito relevante na redução da população de *E. faecalis,* enquanto que nos testes em fase exponencial verificou-se uma redução significativa da população bacteriana, de tal forma que quando aplicados em cultura mista não foi possível detetar a presença de *E. faecalis* (0 UFCs). É possível atribuir que esta acentuada redução bacteriana ao efeito competitivo entre a *S. aureus* e a *E. faecalis* no qual a *E. faecalis* foi negativamente afetada pelo antagonismo com a *S. aureus* aliada ao ataque do fago MAX. Embora incomum, esse efeito de sinergia de ação entre fagos e bactérias já foi anteriormente observado (Gutiérrez et al., 2015; Harcombe & Bull, 2005). Uma possível explicação para os resultados obtidos no presente trabalho, é o facto de os fagos de *enterococcus* ativarem o sistema T7S, o qual está presente em *S. aureus* e leva a que bactérias que compartilham o mesmo espaço hajam como antagonistas (Chatterjee et al., 2021; Spencer & Doran, 2022). Apesar de alguns artigos reportarem uma ação conjunta de fagos e bactérias, até ao presente ainda não há nenhuma evidência na literatura de que a *S. aur*eus tenha agido em conjunto com fagos contra outra bactéria. Portanto, no futuro, serão precisos mais estudos para confirmar a eventual existência de sinergia entre a *S. aureus* e bacteriófagos.

A análise bioinformática indicou que ambos os "inserts" possuem a presença de um domínio catalítico amidase-2, no N-terminal. Portanto clivam a ligação amida entre a porção glicana (MurNAc) e a porção peptídica (L-alanina) (Abdelrahman *et al.*, 2021; Pennone *et al.*, 2019; Rahman *et al.*, 2021). Verificou-se também que no C-terminal, a endolisina MAX possui um domínio de reconhecimento ZoocinA (TRD), uma região "linker" entre o EAD e CBD e uma área sinalizadora para o periplasma do hospedeiro. Estudos futuros poderiam tentar produzir a endolisina em um hospedeiro não procariota como uma levedura, e\ ou tentar expressar a endolisina MAX apenas com o EAD. Quanto à endolisina ZIP, possui uma área desconhecida no C-terminal (Viglasky et al., 2023). Estudos futuros poderiam elucidar o que há nessa área, acreditamos ser um CBD

Na transformação de *E. coli* NZY5α observou-se um melhor rendimento quando a concentração do ADN "template" foi 90 vezes maior do que a concentração do vetor pET 28a. Por

outro lado, na transformação da *E. coli* com o ADN "template" MAX observou-se algumas dificuldades inerente à inserção do gene de fagos, pois a bactéria utilizou mecanismos de defesa para evitar a inserção.

No que desrespeito à produção da proteína, o SDS-PAGE das amostras da produção do ZIP apontou um melhor rendimento às 24 horas depois da indução sob a temperatura de 37°C pós indução por IPTG. Estudos futuros devem ser realizados visando quantificar a extração e testar o efeito da endolisina ZIP e MAX em *E. faecalis* e outras bactérias que lhes possam ser suscetíveis.

Atualmente os antibióticos são usados na endodontia para capeamento pulpar (tetraciclina), medicação intracanal (tetraciclina, clindamicina e neomicina), irrigação intracanal (doxiclina), desinfecção do canal para revascularização pulpar (metronidazol, minoxiclina e ciproflixacina) e em material obturador final (tetraciclina e metronidazol) (Bansal & Jain, 2014). Tendo em vista que o principal incoveniente do uso de antibióticos na odontologia é a resistência antibiótica, a qual futuramente poderiam contar com o uso de bacteriófagos ou endolisinas na composição para defenestração de patologias odontológicas.

6. Bibliografia

.Abdelrahman, F., Easwaran, M., Daramola, O. I., Ragab, S., Lynch, S., Oduselu, T. J., Khan, F. M., Ayobami, A., Adnan, F., Torrents, E., Sanmukh, S., & El-Shibiny, A. (2021). Phage-Encoded Endolysins. *Antibiotics*, *10*(2), Article 2. https://doi.org/10.3390/antibiotics10020124

Abedon, S. T. (2019). Use of phage therapy to treat long-standing, persistent, or chronic bacterial infections. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *145*, 18–39. https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.06.018

Afami, M. E., El Karim, I., About, I., Krasnodembskaya, A. D., Laverty, G., & Lundy, F. T. (2021). Multicomponent Peptide Hydrogels as an Innovative Platform for Cell-Based Tissue Engineering in the Dental Pulp. *Pharmaceutics*, *13*(10), Article 10. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13101575

Almelan, M. F., Abbas, U. K., & M, A.-Z. (2023). Isolation and characterization of bacteriophage targeting Enterococcus faecalis isolated from root canal infection (in vitro study). *Biomedicine*, *43*(3), 977–982. https://doi.org/10.51248/.v43i3.2827

Alzahrani, O. M., Fayez, M., Alswat, A. S., Alkafafy, M., Mahmoud, S. F., Al-Marri, T., Almuslem, A., Ashfaq, H., & Yusuf, S. (2022). Antimicrobial Resistance, Biofilm Formation, and Virulence Genes in Enterococcus Species from Small Backyard Chicken Flocks. *Antibiotics, 11*(3), 380. https://doi.org/10.3390/antibiotics11030380

Baeshen, M. N., Al-Hejin, A. M., Bora, R. S., Ahmed, M. M. M., Ramadan, H. A. I., Saini, K. S., Baeshen, N. A., & Redwan, E. M. (2015). Production of Biopharmaceuticals in E. coli: Current Scenario and Future Perspectives. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *25*(7), 953–962. https://doi.org/10.4014/jmb.1412.12079

Bansal, R., & Jain, A. (2014). Overview on the Current Antibiotic Containing Agents Used in Endodontics. *North American Journal of Medical Sciences*, *6*(8), 351–358. https://doi.org/10.4103/1947-2714.139277

Batinovic, S., Wassef, F., Knowler, S. A., Rice, D. T. F., Stanton, C. R., Rose, J., Tucci, J., Nittami, T., Vinh, A., Drummond, G. R., Sobey, C. G., Chan, H. T., Seviour, R. J., Petrovski, S., & Franks, A. E. (2019). Bacteriophages in Natural and Artificial Environments. *Pathogens*, *8*(3), Article 3. https://doi.org/10.3390/pathogens8030100

Bolocan, Upadrasta, Bettio, Clooney, Draper, Ross, & Hill. (2019). Evaluation of Phage Therapy in the Context of Enterococcus faecalis and Its Associated Diseases. *Viruses*, *11*(4), 366. https://doi.org/10.3390/v11040366

Brady, A., Felipe-Ruiz, A., Gallego del Sol, F., Marina, A., Quiles-Puchalt, N., & Penadés, J. R. (2021). Molecular Basis of Lysis–Lysogeny Decisions in Gram-Positive Phages. *Annual Review of Microbiology*, *75*(1), 563–581. https://doi.org/10.1146/annurev-micro-033121-020757

Briers, Y., & Lavigne, R. (2015). Breaking barriers: Expansion of the use of endolysins as novel antibacterials against Gram-negative bacteria. *Future Microbiology*, *10*(3), 377–390. https://doi.org/10.2217/fmb.15.8

Brooks, L., Narvekar, U., McDonald, A., & Mullany, P. (2022). Prevalence of antibiotic resistance genes in the oral cavity and mobile genetic elements that disseminate antimicrobial resistance: A systematic review. *Molecular Oral Microbiology*, *37*(4), 133–153. https://doi.org/10.1111/omi.12375

Brott, A. S., & Clarke, A. J. (2019). Peptidoglycan O-Acetylation as a Virulence Factor: Its Effect on Lysozyme in the Innate Immune System. *Antibiotics*, *8*(3), Article 3. https://doi.org/10.3390/antibiotics8030094

Bryan, D., El-Shibiny, A., Hobbs, Z., Porter, J., & Kutter, E. M. (2016). Bacteriophage T4 Infection of Stationary Phase E. coli: Life after Log from a Phage Perspective. *Frontiers in Microbiology*, *7*. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.01391

Canato Martinho, F. (2011). *Estudo microbiológico e de endotoxinas de canais radiculares com infecções endodônticas primárias e avaliação da antigenicidade do conteúdo infeccioso contra macrófagos na produção de citocinas pró-inflamatórias* [Doutor em Clínica Odontológica, Universidade Estadual de Campinas]. https://doi.org/10.47749/T/UNICAMP.2011.798850

Canfield, G. S., & Duerkop, B. A. (2020). Molecular mechanisms of enterococcal-bacteriophage interactions and implications for human health. *Current Opinion in Microbiology*, *56*, 38–44. https://doi.org/10.1016/j.mib.2020.06.003

Cerca, N., Oliveira, R., & Azeredo, J. (2007). Susceptibility of Staphylococcus epidermidis planktonic cells and biofilms to the lytic action of staphylococcus bacteriophage K. *Letters in Applied Microbiology*, *45*(3), 313–317. https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02190.x

Chatterjee, A., Willett, J. L. E., Dunny, G. M., & Duerkop, B. A. (2021). Phage infection and sub-lethal antibiotic exposure mediate Enterococcus faecalis type VII secretion system dependent inhibition of bystander bacteria. *PLoS Genetics*, *17*(1), e1009204. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009204

Chatterjee, A., Willett, J. L. E., Nguyen, U. T., Monogue, B., Palmer, K. L., Dunny, G. M., & Duerkop, B. A. (2020). Parallel Genomics Uncover Novel Enterococcal-Bacteriophage Interactions. *mBio*, *11*(2), 10.1128/mbio.03120-19. https://doi.org/10.1128/mbio.03120-19

Chen, R. (2012). Bacterial expression systems for recombinant protein production: E. coli and beyond. *Biotechnology Advances*, *30*(5), 1102–1107. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.013

Ch'ng, J.-H., Muthu, M., Chong, K. K. L., Wong, J. J., Tan, C. A. Z., Koh, Z. J. S., Lopez, D., Matysik, A., Nair, Z. J., Barkham, T., Wang, Y., & Kline, K. A. (2022). Heme cross-feeding can augment Staphylococcus aureus and Enterococcus faecalis dual species biofilms. *The ISME Journal*, *16*(8), Article 8. https://doi.org/10.1038/s41396-022-01248-1

Chumappumkal Joseph, B., Pichaimuthu, S., & Srimeenakshi, S. (2015). An Overview of the Parameters for Recombinant Protein Expression in Escherichia coli. *Journal of Cell Science & Therapy*, *06*. https://doi.org/10.4172/2157-7013.1000221

Clokie, M. R., Millard, A. D., Letarov, A. V., & Heaphy, S. (2011). Phages in nature. *Bacteriophage*, *1*(1), 31–45. https://doi.org/10.4161/bact.1.1.14942

Costa, S., Almeida, A., Castro, A., & Domingues, L. (2014). Fusion tags for protein solubility, purification and immunogenicity in Escherichia coli: The novel Fh8 system. *Frontiers in Microbiology*, *5*. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2014.00063

Culp, E. J., Waglechner, N., Wang, W., Fiebig-Comyn, A. A., Hsu, Y.-P., Koteva, K., Sychantha, D., Coombes, B. K., Van Nieuwenhze, M. S., Brun, Y. V., & Wright, G. D. (2020). Evolution-guided discovery of antibiotics that inhibit peptidoglycan remodelling. *Nature*, *578*(7796), Article 7796. https://doi.org/10.1038/s41586-020-1990-9

de Vries, L. E., Christensen, H., Skov, R. L., Aarestrup, F. M., & Agersø, Y. (2009). Diversity of the tetracycline resistance gene tet(M) and identification of Tn916- and Tn5801-like (Tn6014) transposons in Staphylococcus aureus from humans and animals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *64*(3), 490–500. https://doi.org/10.1093/jac/dkp214

Egan, A. J. F., Errington, J., & Vollmer, W. (2020). Regulation of peptidoglycan synthesis and remodelling. *Nature Reviews Microbiology*, *18*(8), Article 8. https://doi.org/10.1038/s41579-020-0366-3

El-Telbany, M., El-Didamony, G., Askora, A., Ariny, E., Abdallah, D., Connerton, I. F., & El-Shibiny, A. (2021). Bacteriophages to Control Multi-Drug Resistant Enterococcus faecalis Infection of Dental Root Canals. *Microorganisms*, *9*(3), 517. https://doi.org/10.3390/microorganisms9030517

Eskenazi, A., Lood, C., Wubbolts, J., Hites, M., Balarjishvili, N., Leshkasheli, L., Askilashvili, L., Kvachadze, L., van Noort, V., Wagemans, J., Jayankura, M., Chanishvili, N., de Boer, M., Nibbering, P., Kutateladze, M., Lavigne, R., Merabishvili, M., & Pirnay, J.-P. (2022). Combination of pre-adapted bacteriophage therapy and antibiotics for treatment of fracture-related

infection due to pandrug-resistant Klebsiella pneumoniae. *Nature Communications*, *13*(1), 302. https://doi.org/10.1038/s41467-021-27656-z

Evans, J. J., & Bolz, D. D. (2019). Regulation of virulence and antibiotic resistance in Gram-positive microbes in response to cell wall-active antibiotics. *Current Opinion in Infectious Diseases*, *32*(3), 217–222. https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000542

Federici, S., Nobs, S. P., & Elinav, E. (2021). Phages and their potential to modulate the microbiome and immunity. *Cellular & Molecular Immunology*, *18*(4), Article 4. https://doi.org/10.1038/s41423-020-00532-4

Ford, S. A., Drew, G. C., & King, K. C. (2022). Immune-mediated competition benefits protective microbes over pathogens in a novel host species. *Heredity*, *129*(6), 327–335. https://doi.org/10.1038/s41437-022-00569-3

Garde, S., Chodisetti, P. K., & Reddy, M. (2021). Peptidoglycan: Structure, Synthesis, and Regulation. *EcoSal Plus*, *9*(2). https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0010-2020

Gargis, S. R., Heath, H. E., Heath, L. S., Leblanc, P. A., Simmonds, R. S., Abbott, B. D., Timkovich, R., & Sloan, G. L. (2009). Use of 4-sulfophenyl isothiocyanate labeling and mass spectrometry to determine the site of action of the streptococcolytic peptidoglycan hydrolase zoocin A. *Applied and Environmental Microbiology*, *75*(1), 72–77. https://doi.org/10.1128/AEM.01647-08

Gibson, J. F., Pidwill, G. R., Carnell, O. T., Surewaard, B. G. J., Shamarina, D., Sutton, J. A. F., Jeffery, C., Derré-Bobillot, A., Archambaud, C., Siggins, M. K., Pollitt, E. J. G., Johnston, S. A., Serror, P., Sriskandan, S., Renshaw, S. A., & Foster, S. J. (2021). Commensal bacteria augment Staphylococcus aureus infection by inactivation of phagocyte-derived reactive oxygen species. *PLoS Pathogens*, *17*(9), e1009880. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009880

Glonti, T., & Pirnay, J.-P. (2022). In Vitro Techniques and Measurements of Phage Characteristics That Are Important for Phage Therapy Success. *Viruses*, *14*(7), Article 7. https://doi.org/10.3390/v14071490

Grabowski, Ł., Pierzynowska, K., Gaffke, L., Cyske, Z., Mincewicz, G., & Węgrzyn, G. (2023). The use of phage display systems to combat infectious diseases in poultry: Diagnostic, vaccine, and therapeutic approaches. *Journal of Applied Microbiology*, *134*(1), lxac012. https://doi.org/10.1093/jambio/lxac012

Graham, C. L. B., Newman, H., Gillett, F. N., Smart, K., Briggs, N., Banzhaf, M., & Roper, D. I. (2021). A Dynamic Network of Proteins Facilitate Cell Envelope Biogenesis in Gram-Negative Bacteria. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(23), Article 23. https://doi.org/10.3390/ijms222312831

Grishin, A. V., Karyagina, A. S., Vasina, D. V., Vasina, I. V., Gushchin, V. A., & Lunin, V. G. (2020). Resistance to peptidoglycan-degrading enzymes. *Critical Reviews in Microbiology*, *46*(6), 703–726. https://doi.org/10.1080/1040841X.2020.1825333

Gutiérrez, D., & Briers, Y. (2021). Lysins breaking down the walls of Gram-negative bacteria, no longer a no-go. *Current Opinion in Biotechnology*, *68*, 15–22. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.08.014

Gutiérrez, D., Vandenheuvel, D., Martínez, B., Rodríguez, A., Lavigne, R., & García, P. (2015). Two Phages, phiIPLA-RODI and phiIPLA-C1C, Lyse Mono- and Dual-Species Staphylococcal Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*(10), 3336–3348. https://doi.org/10.1128/AEM.03560-14

Harcombe, W. R., & Bull, J. J. (2005). Impact of Phages on Two-Species Bacterial Communities. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(9), 5254–5259. https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.5254-5259.2005

Haseeb, R., Lau, M., Sheah, M., Montagner, F., Quiram, G., Palmer, K., Stefan, M., & Rodrigues, D. (2016). Synthesis and Characterization of New Chlorhexidine-Containing Nanoparticles for Root Canal Disinfection. *Materials*, *9*(6), 452. https://doi.org/10.3390/ma9060452

Hatfull, G. F., Dedrick, R. M., & Schooley, R. T. (2022). Phage Therapy for Antibiotic-Resistant Bacterial Infections. *Annual Review of Medicine*, *73*(1), 197–211. https://doi.org/10.1146/annurev-med-080219-122208

Huleani, S., Roberts, M. R., Beales, L., & Papaioannou, E. H. (2022). Escherichia coli as an antibody expression host for the production of diagnostic proteins: Significance and expression. *Critical Reviews in Biotechnology*, *42*(5), 756–773. https://doi.org/10.1080/07388551.2021.1967871

Ioannou, P., Baliou, S., & Samonis, G. (2023). Bacteriophages in Infectious Diseases and Beyond—A Narrative Review. *Antibiotics*, *12*(6), Article 6. https://doi.org/10.3390/antibiotics12061012

Jabbari Shiadeh, S. M., Pormohammad, A., Hashemi, A., & Lak, P. (2019). Global prevalence of antibiotic resistance in blood-isolated Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium: A systematic review and meta-analysis. *Infection and Drug Resistance*, *12*, 2713–2725. https://doi.org/10.2147/IDR.S206084

Jain, H., Mulay, S., & Mullany, P. (2016). Persistence of endodontic infection and Enterococcus faecalis: Role of horizontal gene transfer. *Gene Reports*, *5*, 112–116. https://doi.org/10.1016/j.genrep.2016.09.010

Jamal, M. (2015). *Inhibition of clinical multi-drug resistant Klebsiella pneumoniae biofilm by Siphoviridae bacteriophage Z*. *3*(2).

Jiménez, J., Lázaro, B., Sarrias, A., Tadeo, F. J., Pérez-Montero, M., Clotet, J., & Bru, S. (2022). Protocol to quantify polyphosphate in human cell lines using a tagged PPBD peptide. *STAR Protocols*, *3*(2), 101363. https://doi.org/10.1016/j.xpro.2022.101363

Jungermann, G. B., Burns, K., Nandakumar, R., Tolba, M., Venezia, R. A., & Fouad, A. F. (2011). Antibiotic Resistance in Primary and Persistent Endodontic Infections. *Journal of Endodontics*, *37*(10), 1337–1344. https://doi.org/10.1016/j.joen.2011.06.028

Kanwar, R., Aslam, M. A., Zulqurnain, H., Qadeer, A., Ali, S., Nayab, S., & Mustafa, S. (2023). Bacteriophages and Their Endolysin: An Alternative Therapeutic Approach for Bovine Mastitis. *Biology Bulletin Reviews*, *13*(4), 326–335. https://doi.org/10.1134/S2079086423040059

Kao, P. H.-N., Ch'ng, J.-H., Chong, K. K. L., Stocks, C. J., Wong, S. L., & Kline, K. A. (2023). Enterococcus faecalis suppresses Staphylococcus aureus-induced NETosis and promotes

bacterial survival in polymicrobial infections. *FEMS Microbes*, *4*, xtad019. https://doi.org/10.1093/femsmc/xtad019

Khalifa, L., Brosh, Y., Gelman, D., Coppenhagen-Glazer, S., Beyth, S., Poradosu-Cohen, R., Que, Y.-A., Beyth, N., & Hazan, R. (2015). Targeting Enterococcus faecalis Biofilms with Phage Therapy. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*(8), 2696–2705. https://doi.org/10.1128/AEM.00096-15

Khalifa, L., Shlezinger, M., Beyth, S., Houri-Haddad, Y., Coppenhagen-Glazer, S., Beyth, N., & Hazan, R. (2016). Phage therapy against *Enterococcus faecalis* in dental root canals. *Journal of Oral Microbiology*, *8*(1), 32157. https://doi.org/10.3402/jom.v8.32157

Khan, F. M., Chen, J.-H., Zhang, R., & Liu, B. (2023). A comprehensive review of the applications of bacteriophage-derived endolysins for foodborne bacterial pathogens and food safety: Recent advances, challenges, and future perspective. *Frontiers in Microbiology*, *14*. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2023.1259210

Ki, M.-R., & Pack, S. P. (2020). Fusion tags to enhance heterologous protein expression. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *104*(6), 2411–2425. https://doi.org/10.1007/s00253-020-10402-8

LaPlante, K. L., Rybak, M. J., Leuthner, K. D., & Chin, J. N. (2006). Impact of Enterococcus faecalis on the Bactericidal Activities of Arbekacin, Daptomycin, Linezolid, and Tigecycline against Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus in a Mixed-Pathogen Pharmacodynamic Model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *50*(4), 1298–1303. https://doi.org/10.1128/AAC.50.4.1298-1303.2006

Lee, D., Im, J., Na, H., Ryu, S., Yun, C.-H., & Han, S. H. (2019). The Novel Enterococcus Phage vB_EfaS_HEf13 Has Broad Lytic Activity Against Clinical Isolates of Enterococcus faecalis. *Frontiers in Microbiology*, *10*. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.02877

Li, G., Walker, M. J., & De Oliveira, D. M. P. (2022). Vancomycin Resistance in Enterococcus and Staphylococcus aureus. *Microorganisms*, *11*(1), 24. https://doi.org/10.3390/microorganisms11010024

Lopes, A., Tavares, P., Petit, M.-A., Guérois, R., & Zinn-Justin, S. (2014). Automated classification of tailed bacteriophages according to their neck organization. *BMC Genomics*, *15*(1), 1027. https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-1027

Luo, A., Wang, F., Sun, D., Liu, X., & Xin, B. (2022). Formation, Development, and Cross-Species Interactions in Biofilms. *Frontiers in Microbiology*, *12*. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.757327

Mamou, G., Corona, F., Cohen-Khait, R., Housden, N. G., Yeung, V., Sun, D., Sridhar, P., Pazos, M., Knowles, T. J., Kleanthous, C., & Vollmer, W. (2022). Peptidoglycan maturation controls outer membrane protein assembly. *Nature*, *606*(7916), Article 7916. https://doi.org/10.1038/s41586-022-04834-7

Melo, L. D. R., Ferreira, R., Costa, A. R., Oliveira, H., & Azeredo, J. (2019). Efficacy and safety assessment of two enterococci phages in an in vitro biofilm wound model. *Scientific Reports*, *9*(1), 6643. https://doi.org/10.1038/s41598-019-43115-8

Meng, Y., Chen, L., Chen, Y., Shi, J., Zhang, Z., Wang, Y., Wu, F., Jiang, X., Yang, W., Zhang, L., Wang, C., Meng, X., Wu, Y., & Bu, W. (2022). Reactive metal boride nanoparticles trap lipopolysaccharide and peptidoglycan for bacteria-infected wound healing. *Nature Communications*, *13*(1), Article 1. https://doi.org/10.1038/s41467-022-35050-6

Mital, S., Christie, G., & Dikicioglu, D. (2021). Recombinant expression of insoluble enzymes in Escherichia coli: A systematic review of experimental design and its manufacturing implications. *Microbial Cell Factories*, *20*(1), 208. https://doi.org/10.1186/s12934-021-01698-w

Moryl, M., Palatyńska-Ulatowska, A., Maszewska, A., Grzejdziak, I., Dias de Oliveira, S., Pradebon, M. C., Steier, L., Różalski, A., & Poli de Figueiredo, J. A. (2022). Benefits and Challenges of the Use of Two Novel vB_Efa29212_2e and vB_Efa29212_3e Bacteriophages in Biocontrol of the Root Canal Enterococcus faecalis Infections. *Journal of Clinical Medicine*, *11*(21), Article 21. https://doi.org/10.3390/jcm11216494

Namdev Joshi, P., & Rai, V. (2019). Single-site labeling of histidine in proteins, on-demand reversibility, and traceless metal-free protein purification. *Chemical Communications*, *55*(8), 1100–1103. https://doi.org/10.1039/C8CC08733D

Nelson, D. C., Schmelcher, M., Rodriguez-Rubio, L., Klumpp, J., Pritchard, D. G., Dong, S., & Donovan, D. M. (2012). Chapter 7—Endolysins as Antimicrobials. In M. Łobocka & W. Szybalski (Eds.), *Advances in Virus Research* (Vol. 83, pp. 299–365). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394438-2.00007-4

Nishio Ayre, W., Melling, G., Cuveillier, C., Natarajan, M., Roberts, J. L., Marsh, L. L., Lynch, C. D., Maillard, J.-Y., Denyer, S. P., & Sloan, A. J. (2018). Enterococcus faecalis Demonstrates Pathogenicity through Increased Attachment in an Ex Vivo Polymicrobial Pulpal Infection. *Infection and Immunity*, *86*(5), e00871-17. https://doi.org/10.1128/IAI.00871-17

Nosaki, S., Hoshikawa, K., Ezura, H., & Miura, K. (2021). Transient protein expression systems in plants and their applications. *Plant Biotechnology*, *38*(3), 297–304. https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.21.0610a

Obradović, M., Malešević, M., Di Luca, M., Kekić, D., Gajić, I., McAuliffe, O., Neve, H., Stanisavljević, N., Vukotić, G., & Kojić, M. (2023). Isolation, Characterization, Genome Analysis and Host Resistance Development of Two Novel Lastavirus Phages Active against Pandrug-Resistant Klebsiella pneumoniae. *Viruses*, *15*(3), 628. https://doi.org/10.3390/v15030628

Oechslin, F., Zhu, X., Dion, M. B., Shi, R., & Moineau, S. (2022). Phage endolysins are adapted to specific hosts and are evolutionarily dynamic. *PLOS Biology*, *20*(8), e3001740. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001740

Ofir, G., & Sorek, R. (2018). Contemporary Phage Biology: From Classic Models to New Insights. *Cell*, *172*(6), 1260–1270. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.10.045

Pasquina-Lemonche, L., Burns, J., Turner, R. D., Kumar, S., Tank, R., Mullin, N., Wilson, J. S., Chakrabarti, B., Bullough, P. A., Foster, S. J., & Hobbs, J. K. (2020). The architecture of the Gram-positive bacterial cell wall. *Nature*, *582*(7811), Article 7811. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2236-6

Pennone, V., Sanz-Gaitero, M., O'Connor, P., Coffey, A., Jordan, K., van Raaij, M. J., & McAuliffe, O. (2019). Inhibition of L. monocytogenes Biofilm Formation by the Amidase

Domain of the Phage vB_LmoS_293 Endolysin. *Viruses*, *11*(8), Article 8. https://doi.org/10.3390/v11080722

Rahman, M. ur, Wang, W., Sun, Q., Shah, J. A., Li, C., Sun, Y., Li, Y., Zhang, B., Chen, W., & Wang, S. (2021). Endolysin, a Promising Solution against Antimicrobial Resistance. *Antibiotics*, *10*(11), Article 11. https://doi.org/10.3390/antibiotics10111277

Ramasamy, M., Yi, D. K., & An, S. S. A. (2015). Enhanced detection sensitivity of Escherichia coli O157:H7 using surface-modified gold nanorods. *International Journal of Nanomedicine*, *10*(Special on diverse applications in Nano-Theranostics), 179–190. https://doi.org/10.2147/IJN.S88379

Rodrigues Lima, A. (2017). *Análise do conteúdo bacteriano de infecções endodônticas primárias sintomáticas e assintomáticas e suscetibilidade de bactérias específicas a agentes antimicrobianos:* [Mestre em Clínica Odontológica, Universidade Estadual de Campinas]. https://doi.org/10.47749/T/UNICAMP.2017.988180

Rohde, M. (2019). The Gram-Positive Bacterial Cell Wall. *Microbiology Spectrum*, *7*(3), 10.1128/microbiolspec.gpp3-0044–2018. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0044-2018

Rohs, P. D. A., & Bernhardt, T. G. (2021). Growth and Division of the Peptidoglycan Matrix. *Annual Review of Microbiology*, *75*(1), 315–336. https://doi.org/10.1146/annurev-micro-020518-120056

Rubio-Cosials, A., Schulz, E. C., Lambertsen, L., Smyshlyaev, G., Rojas-Cordova, C., Forslund, K., Karaca, E., Bebel, A., Bork, P., & Barabas, O. (2018). Transposase-DNA Complex Structures Reveal Mechanisms for Conjugative Transposition of Antibiotic Resistance. *Cell*, *173*(1), 208-220.e20. https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.032

Ryan, E. M., Alkawareek, M. Y., Donnelly, R. F., & Gilmore, B. F. (2012). Synergistic phage-antibiotic combinations for the control of *Escherichia coli* biofilms *in vitro*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, *65*(2), 395–398. https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2012.00977.x

Saïda, F. (2007). Overview on the Expression of Toxic Gene Products in Escherichia coli. *Current Protocols in Protein Science*, *50*(1), 5.19.1-5.19.13. https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0519s50

Sandomenico, A., Sivaccumar, J. P., & Ruvo, M. (2020). Evolution of Escherichia coli Expression System in Producing Antibody Recombinant Fragments. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(17), Article 17. https://doi.org/10.3390/ijms21176324

Santos, A. L., Siqueira, J. F., Rôças, I. N., Jesus, E. C., Rosado, A. S., & Tiedje, J. M. (2011). Comparing the Bacterial Diversity of Acute and Chronic Dental Root Canal Infections. *PLoS ONE*, *6*(11), e28088. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028088

Schilcher, K., & Horswill, A. R. (2020). Staphylococcal Biofilm Development: Structure, Regulation, and Treatment Strategies. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *84*(3), 10.1128/mmbr.00026-19. https://doi.org/10.1128/mmbr.00026-19

Sekiya, H., Kamitori, S., Nariya, H., Matsunami, R., & Tamai, E. (2021). Structural and biochemical characterization of the Clostridium perfringens-specific Zn2+-dependent amidase

endolysin, Psa, catalytic domain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *576*, 66–72. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.08.085

Shilling, P. J., Mirzadeh, K., Cumming, A. J., Widesheim, M., Köck, Z., & Daley, D. O. (2020). Improved designs for pET expression plasmids increase protein production yield in Escherichia coli. *Communications Biology*, *3*(1), Article 1. https://doi.org/10.1038/s42003-020-0939-8

Shlezinger, M., Friedman, M., Houri-Haddad, Y., Hazan, R., & Beyth, N. (2019). Phages in a thermoreversible sustained-release formulation targeting E. faecalis in vitro and in vivo. *PLoS ONE*, *14*(7), e0219599. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219599

Sillankorva, S., Oliveira, R., Vieira, M. J., Sutherland, I., & Azeredo, J. (2004). Pseudomonas fluorescens infection by bacteriophage ΦS1: The influence of temperature, host growth phase and media. *FEMS Microbiology Letters*, *241*(1), 13–20. https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.06.058

Singh, K. V., & Murray, B. E. (2019). Loss of a Major Enterococcal Polysaccharide Antigen (Epa) by Enterococcus faecalis Is Associated with Increased Resistance to Ceftriaxone and Carbapenems. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *63*(5), e00481-19. https://doi.org/10.1128/AAC.00481-19

Sørensen, A. N., Woudstra, C., Sørensen, M. C. H., & Brøndsted, L. (2021). Subtypes of tail spike proteins predicts the host range of Ackermannviridae phages. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, *19*, 4854–4867. https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.08.030

Spencer, B. L., & Doran, K. S. (2022). Evolving understanding of the type VII secretion system in Gram-positive bacteria. *PLOS Pathogens*, *18*(7), e1010680. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010680

Ssekatawa, K., Byarugaba, D. K., Kato, C. D., Wampande, E. M., Ejobi, F., Tweyongyere, R., & Nakavuma, J. L. (2021). A review of phage mediated antibacterial applications. *Alexandria Journal of Medicine*, *57*(1), Article 1. https://doi.org/10.4314/bafm.v57i1

Storms, Z. J., & Sauvageau, D. (2015). Modeling tailed bacteriophage adsorption: Insight into mechanisms. *Virology*, *485*, 355–362. https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.08.007

Strathdee, S. A., Hatfull, G. F., Mutalik, V. K., & Schooley, R. T. (2023). Phage therapy: From biological mechanisms to future directions. *Cell*, *186*(1), 17–31. https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.11.017

Taati Moghadam, M., Amirmozafari, N., Shariati, A., Hallajzadeh, M., Mirkalantari, S., Khoshbayan, A., & Masjedian Jazi, F. (2020). How Phages Overcome the Challenges of Drug Resistant Bacteria in Clinical Infections. *Infection and Drug Resistance*, *13*, 45–61. https://doi.org/10.2147/IDR.S234353

Tagliaferri, T. L., Jansen, M., & Horz, H.-P. (2019). Fighting Pathogenic Bacteria on Two Fronts: Phages and Antibiotics as Combined Strategy. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *9*, 22. https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00022

Tanoeiro, L. V. de A. G. P. (2021). *Campylobacter (pro)phages: Comparative genomics and development of phage enzybiotics* [masterThesis]. https://repositorio.ul.pt/handle/10451/47738

Tigabu, A., & Getaneh, A. (2021). Staphylococcus aureus, ESKAPE Bacteria Challenging Current Health Care and Community Settings: A Literature Review. *Clinical Laboratory*, *67*(7). https://doi.org/10.7754/Clin.Lab.2020.200930

Torres, C., Alonso, C. A., Ruiz-Ripa, L., León-Sampedro, R., del Campo, R., & Coque, T. M. (2018). Antimicrobial Resistance in Enterococcus spp. Of animal origin. In *Antimicrobial Resistance in Bacteria from Livestock and Companion Animals* (pp. 185–227). John Wiley & Sons, Ltd. https://doi.org/10.1128/9781555819804.ch9

Vandemoortele, G., Eyckerman, S., & Gevaert, K. (2019). Pick a Tag and Explore the Functions of Your Pet Protein. *Trends in Biotechnology*, *37*(10), 1078–1090. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.03.016

Verma, V., Harjai, K., & Chhibber, S. (2009). Restricting ciprofloxacin-induced resistant variant formation in biofilm of Klebsiella pneumoniae B5055 by complementary bacteriophage treatment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *64*(6), 1212–1218. https://doi.org/10.1093/jac/dkp360

Viglasky, J., Piknova, M., & Pristas, P. (2023). Gene and domain shuffling in lytic cassettes of Enterococcus spp. Bacteriophages. *3 Biotech*, *13*(12), 388. https://doi.org/10.1007/s13205-023-03775-w

Vukotic, G., Obradovic, M., Novovic, K., Di Luca, M., Jovcic, B., Fira, D., Neve, H., Kojic, M., & McAuliffe, O. (2020). Characterization, Antibiofilm, and Depolymerizing Activity of Two Phages Active on Carbapenem-Resistant Acinetobacter baumannii. *Frontiers in Medicine*, *7*, 426. https://doi.org/10.3389/fmed.2020.00426

Wang, I.-N., Smith, D. L., & Young, R. (2000). Holins: The Protein Clocks of Bacteriophage Infections. *Annual Review of Microbiology*, *54*(1), 799–825. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.799

Wang, W., Li, Y., Wang, Y., Shi, C., Li, C., Li, Q., & Linhardt, R. J. (2018). Bacteriophage T7 transcription system: An enabling tool in synthetic biology. *Biotechnology Advances*, *36*(8), 2129–2137. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.10.001

Wu, T., Yoon, H., Xiong, Y., Dixon-Clarke, S. E., Nowak, R. P., & Fischer, E. S. (2020). Targeted protein degradation as a powerful research tool in basic biology and drug target discovery. *Nature Structural & Molecular Biology*, *27*(7), Article 7. https://doi.org/10.1038/s41594-020-0438-0

Xiang, Y., Li, W., Song, F., Yang, X., Zhou, J., Yu, H., Ji, X., & Wei, Y. (2020). Biological characteristics and whole-genome analysis of the Enterococcus faecalis phage PEf771. *Canadian Journal of Microbiology*, *66*(9), 505–520. https://doi.org/10.1139/cjm-2019-0336

Xiang, Y., Ma, C., Yin, S., Song, F., Qin, K., Ding, Y., Yang, X., Song, P., Ji, X., & Wei, Y. (2022). Phage therapy for refractory periapical periodontitis caused by Enterococcus faecalis in vitro and in vivo. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *106*(5), 2121–2131. https://doi.org/10.1007/s00253-022-11810-8

Zhang, Y., Li, C.-X., & Zhang, X.-Z. (2021). Bacteriophage-mediated modulation of microbiota for diseases treatment. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *176*, 113856. https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.113856

Zuppi, M., Hendrickson, H. L., O'Sullivan, J. M., & Vatanen, T. (2022). Phages in the Gut Ecosystem. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *11*. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2021.822562