
Potencial da suplementação alimentar de caprinos com potássio, sódio e silício via pó de rocha na prevenção e controle da mastite subclínica: uma análise bioinformática

Potential of dietary supplementation of goats with potassium, sodium and silicon via rock dust in the prevention and control of subclinical mastitis: a bioinformatic analysis

Wagner Silva dos Santos

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-7379-7124>

Instituição: Instituto Federal do Norte de Minas Gerais

E-mail: wsds1@aluno.ifnmg.edu.br

Larissa Cordeiro Gandra

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-3209-6188>

Instituição: Instituto Federal do Norte de Minas Gerais

E-mail: lcg1@aluno.ifnmg.edu.br

Renata Gabriela Chaves Ferreira

Orcid: <https://orcid.org/0009-0008-1677-4920>

Instituição: Instituto Federal do Norte de Minas Gerais

E-mail: rgcf1@aluno.ifnmg.edu.br

Hércules Otacílio Santos

Orcid: <https://orcid.org/0000-0001-5399-9522>

Instituição: Instituto Federal do Norte de Minas Gerais

E-mail: hercules.santos@ifnmg.edu.br

Janainne Nunes Alves

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-3388-7053>

Instituição: Instituto Federal do Norte de Minas Gerais

E-mail: janainne.alves@ifnmg.edu.br

Tatiana Tozzi Martins Souza Rodrigues

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-0712-2946>

Instituição: Instituto Federal Farroupilha

E-mail: tatiana.rodrigues@iffarroupilha.edu.br

Anna Christina de Almeida

Orcid: <https://orcid.org/0000-0001-9836-4117>

Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais

E-mail: annachristinadealmeida@gmail.com

Jeancarlo Campos Leão

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-8181-7965>

Instituição: Instituto Federal do Norte de Minas Gerais

E-mail: jeancarlo.leao@ifnmg.edu.br

Eliane Macedo Sobrinho Santos

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-1576-4957>

Instituição: Instituto Federal do Norte de Minas Gerais

E-mail: eliane.santos@ifnmg.edu.br

RESUMO

A mastite caprina é um problema comum, mesmo em criações bem manejadas, e a implementação de medidas de controle é essencial para garantir a viabilidade desse tipo de produção. Nesse contexto, este estudo tem por objetivo avaliar as possíveis contribuições dos componentes minerais do pó de rocha, no controle e prevenção da mastite subclínica em caprinos. Foi realizada análise bioinformática, utilizando a base de dados *Search Tool for Interactions of Chemicals* STITCH. Para isso, os elementos potássio, sódio e silício, juntamente com as proteínas ica (A, B, C, D), foram inseridos na plataforma para a construção da rede de interação proteica. Os resultados indicaram que o potássio atua na enzima Guanilato quinase, relacionada à formação de biofilmes, e da proteína murB, associada ao crescimento e desenvolvimento do *Staphylococcus caprae*. No entanto, este mineral demonstrou potencial em desfavorecer o crescimento bacteriano, inibindo a proteína asd. O sódio mostrou-se como fator inibitório para a formação de biofilmes via proteína tmk. O silício, por sua vez, pode colaborar com atenuação do processo infeccioso por intermédio das moléculas de sódio e potássio, reduzindo níveis de glicose que desfavorece a formação de biofilmes e ainda atuando em proteínas como a pgi, que se inibida pode prejudicar o desenvolvimento do *S. caprae*.

Palavras-chave: *Staphylococcus caprae*; Redes de interação proteica; Nutrição animal; STITCH

ABSTRACT

Goat mastitis is a common problem, even in well-managed farms, and the implementation of control measures is essential to ensure the viability of this type of production. In this context, this study aims to evaluate the possible contributions of the mineral components of rock dust in the control and prevention of subclinical mastitis in goats. Bioinformatics analysis was performed using the Search Tool for Interactions of Chemicals STITCH database. For this, the elements potassium, sodium and silicon, together with the ica proteins (A, B, C, D), were inserted into the platform to build the protein interaction network. The results indicated that potassium acts on the enzyme Guanylate kinase, related to the formation of biofilms, and the protein murB, associated with the growth and development of *Staphylococcus caprae*. However, this mineral has demonstrated the potential to disfavor bacterial growth by inhibiting the asd protein. Sodium was shown to be an inhibitory factor for the formation of biofilms via tmk protein. Silicon, in turn, can help attenuate the infectious process through sodium and potassium molecules, reducing glucose levels, which are detrimental to the formation of biofilms, and also acting on proteins such as pgi, which, if inhibited, can harm the development of the disease. *S. caprae*.

Keywords: *Staphylococcus caprae*; Protein interaction networks; Animal nutrition; STITCH

INTRODUÇÃO

A mastite é uma infecção da glândula mamária, geralmente causada por bactérias, classificada como clínica, subclínica e crônica (SPURIA et al., 2017). Essa doença se apresenta como um desafio no manejo de cabras e, devido à sua alta incidência, acarreta complicações para a indústria leiteira. A doença resulta em impactos adversos na produção de leite, causando, consequentemente, perdas econômicas consideráveis (ALNAKIP et al., 2014). Os patógenos do gênero *Staphylococcus* são os mais frequentes nas infecções intramamárias em cabras, e as bactérias *Staphylococcus coagulase-negativas*, em particular, são os tipos prevalentes nos casos de mastite subclínica caprina (CONTRERAS et al., 2007; MAHLANGU et al., 2018). Dentre as espécies de estafilococos coagulase-negativa, *Staphylococcus caprae* é uma espécie frequentemente associada a casos de mastite em cabras, sendo descrita pela primeira vez no ano de 1983, estando associada a casos de mastite em pequenos ruminantes e infecções invasivas em seres humanos (DEVRIESE et al., 1983).

O controle desta doença depende de práticas preventivas, por isso é importante aumentar a capacidade de resposta do sistema imunitário do animal através de programas sanitários e nutricionais eficientes (BARKEMA et al., 1998; BARBOSA et al., 2002). É importante destacar que a utilização exclusiva de antimicrobianos convencionais pode ter efeitos indesejáveis na produção leiteira, entre eles a presença de resíduos no leite. Adicionalmente, a aplicação indiscriminada de agentes antimicrobianos pode restringir a eficácia da terapia devido ao surgimento de bactérias resistentes. No entanto, a diminuição da efetividade da ação antibiótica é influenciada por diversos fatores de virulência, que são moléculas bacterianas capazes de aumentar a resistência das bactérias frente às condições adversas dentro do hospedeiro, favorecendo a capacidade patogênica (MADIGAN et al., 2018).

Os biofilmes são considerados como um fator de virulência importante sendo observados em bactérias do tipo *Staphylococcus* spp. (DEVRIESE et al., 1983, JAIN; AGARWAL, 2009). Os biofilmes são conjuntos de células bacterianas e substâncias poliméricas extracelulares (EPS) (Donlan, 2002), conhecidos por causar resistência bacteriana a produtos saneantes (CHAIEB et. al., 2011) e diminuir a eficácia dos antibióticos (SINGH et. al., 2010). A produção de biofilme protege as bactérias de diferentes formas, sendo o favorecimento da adesão bacteriana a diferentes superfícies o primeiro mecanismo no estabelecimento de uma infecção (HEILMANN, 2011).

Um dos componentes genéticos mais empregados para discernir *Staphylococcus* produtores de biofilme é o locus ica. Esse locus consiste em quatro genes organizados em um operon (icaADBC) e é responsável pela expressão da adesina intercelular polissacarídica (PIA) ou da N-acetilglicosamina polimérica (PNAG). A coexpressão dos genes icaA e icaD revela-se fundamental para a síntese completa do muco (O'GARA, 2007). Sabe-se que o sistema imunológico do animal possui a capacidade de enfrentar a invasão microbiana e impedir o surgimento da mastite (LIBERA et al., 2021), mesmo na presença da bactéria. Qualquer insuficiência nutricional pode resultar em uma resposta imunológica comprometida, tornando-se assim um fator predisponente para a inflamação na glândula mamária.

Considerando a suplementação alimentar, os minerais desempenham um papel fundamental no funcionamento adequado das células imunológicas. Assim, deficiências minerais podem resultar em imunossupressão, comprometendo a saúde dos animais. Como exemplo, o sódio contribui para a homeostase do organismo. Em 1972, Baranowski observou que a falta de sódio na dieta causou perda de apetite e peso, redução do volume de urina e interrupção da lactação em cabras. Logo, a suplementação mineral de animais produtores de leite emerge como instrumento para a manutenção da imunidade inata da glândula mamária, contribuindo para a diminuição dos riscos associados à inflamação do úbere (BARKEMA et al., 2006).

Seja para a melhoria da qualidade da alimentação ou redução dos custos de produção animal, a busca por fontes alternativas de minerais para caprinos é objeto de estudos. Neste contexto, o pó de rocha vem ganhando atenção no meio agrônomo, uma vez que é rico em macro e micronutrientes essenciais (MANNING & THEODORO, 2020; SWOBODA et al., 2021). No entanto, as pesquisas sobre as aplicações do pó de rocha como fonte alimentar animal ainda são limitadas. Cabe destacar, que os constituintes minerais do pó de rocha variam em função do tipo de rocha, das condições edafoclimáticas regionais, entre outros. Recentemente, um estudo avaliou o pó de rocha produzido por uma mineradora do Vale do Jequitinhonha e encontrou teores significativos de SiO_2 , Al_2O_3 , Na_2O e K_2O na composição (SILVA et al., 2022). Na nutrição animal, o sódio e o potássio são avaliados associados, uma vez que estão inter-relacionados, sendo imprescindíveis à vida. Atuam principalmente na regulação do balanço osmótico celular, o equilíbrio ácido-base e agem em diferentes processos enzimáticos e balanço hídrico do organismo (MCDOWELL, 1992, 1999).

Considerando o exposto, este estudo tem por objetivo avaliar as possíveis contribuições dos componentes minerais do pó de rocha, especialmente o potássio, o sódio e o silício, no controle e prevenção da mastite subclínica em caprinos utilizando uma ferramenta de busca para interações entre substâncias químicas e proteínas (*Search Tool for Interactions of Chemicals* - STITCH).

MATERIAL E MÉTODOS

A análise bioinformática foi realizada por meio da base de dados *Search Tool for Interactions of Chemicals* STITCH (<http://stitch.embl.de/>), em oito etapas, utilizando-se os seguintes elementos de entrada na plataforma, para iniciar a elaboração da rede de interação químico-proteína:

Etapa 1: Potássio.

Etapa 2: Potássio e as proteínas icaA, icaB, icaC e icaD.

Etapa 3: Sódio.

Etapa 4: Sódio e as proteínas icaA, icaB, icaC e icaD.

Etapa 5: Silício.

Etapa 6: Silício e as proteínas icaA, icaB, icaC e icaD.

Etapa 7: Potássio, Sódio e as proteínas icaA, icaB, icaC e icaD.

Etapa 8: Potássio, Sódio, Silício e as proteínas icaA, icaB, icaC e icaD.

Os elementos químicos K, Na, e Si foram selecionados como itens de entrada na plataforma STITCH, pois além de serem importantes minerais na dieta de caprinos e ovinos, estão presentes no pó de rocha proveniente de mineradora do Vale do Jequitinhonha (SILVA et al., 2022). Este pó de rocha corresponde aos rejeitos mais finos provenientes da transformação do pegmatito litinífero em concentrado de espodumênio, sendo composto majoritariamente por quartzo (43,66%), albita (38,10%), microclina (15,30%) e muscovita (1,80%). As proteínas icaA, icaB, icaC e icaD, por sua vez, foram selecionadas por constituírem componentes genéticos envolvidos na síntese de biofilmes de *Staphylococcus* spp. o qual está presente em muitos casos de mastite evidenciados pela literatura (O' GARA, 2007).

Em todas as etapas foram verificadas as interações proteína-produto e o organismo selecionado para pesquisa na plataforma STITCH foi o *S. caprae*. Depois de identificados o produto químico, as proteínas e o organismo, a rede STITCH resultante teve o produto químico no centro rodeado por proteínas com as quais interage. Da rede,

foram extraídas as informações necessárias para o presente estudo. A rede elaborada foi configurada na aba “Settings” da ferramenta STITCH, ajustando-se quais fontes foram usadas para extrair informações de interação e como a figura exhibe os dados. Em todas as etapas utilizou-se as seguintes configurações:

- Configurações para interações proteína-químicas: mostrar estereoisômeros como compostos separados.
- Significado das arestas da rede: ação molecular (o formato da linha indica o modo de ação previsto).
- Fontes de interação ativa: Mineração de texto, Experimentos, Bancos de dados, Co-expressão, Vizinhança, Fusão genética, Coocorrência, Previsões.

As demais configurações utilizadas nas etapas de 1 a 8 das análises estão apresentadas no quadro 1.

Quadro 1 – Configurações utilizadas para elaborar as redes de interação químico-proteína na plataforma STITCH.

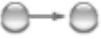
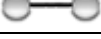
Etapas	Pontuação mínima de interação exigida	Número máximo de interagentes a serem exibidos
1	0,90	1º nível: não mais que 50 interatores 2º nível: não mais que 10 interatores
2	0,40	1º nível: não mais que 10 interatores 2º nível: nenhum
3	0,90	1º nível: não mais que 50 interatores 2º nível: nenhum
4	0,70	1º nível: não mais que 20 interatores 2º nível: não mais que 10 interatores
5	0,90	1º nível: não mais que 20 interatores 2º nível: não mais que 10 interatores
6	0.15	1º nível: não mais que 10 interatores 2º nível: não mais que 20 interatores
7	0,40	1º nível: não mais que 10 interatores 2º nível: nenhum
8	0,40	1º nível: não mais que 10 interatores 2º nível: nenhum

Fonte: Autores (2024)

Depois de extraídos os dados, realizou-se a análise estatística e topológica das redes, por meio da plataforma STITCH para melhor interpretação dos resultados, analisando-se informações sobre vias metabólicas e domínios proteicos associados à pesquisa. Para um melhor entendimento das redes definiu-se que as substâncias químicas

são representadas como nós em formato de cilindro com hemisférios, enquanto as proteínas são mostradas como esferas. Nós pequenos indicam proteína de estrutura topológica desconhecida. Nós grandes indicam alguma estrutura topológica conhecida ou prevista. Nós coloridos indicam proteínas de consulta e primeiro nível de interatores. Nós brancos indicam segundo nível de interatores. Nós que estão associados entre si são conectados por uma aresta, contribuindo conjuntamente para uma função partilhada. Os tipos de ação entre as moléculas são estabelecidos pelas cores das arestas e os efeitos das ações são representados pelo formato das arestas (Quadro 2 - STITCH_db).

Quadro 2 – Representação visual dos tipos de ação das redes.

Cor da Aresta	Ação	Formato da Aresta	Efeito
	ativação		positivo
	inibição		negativo
	vinculativo		não especificado
	catálise	-	-
	fenótipo	-	-
	modificação pós-tradução	-	-
	reação	-	-
	regulação transcricional	-	-

Fonte: Autores (2024)

As análises dos resultados obtidos nas redes de interação químico-proteína foram conduzidas com base em uma revisão da literatura científica relacionada ao tema de interesse deste estudo. A partir dessa revisão, foram identificadas e discutidas as interações entre os componentes químicos e proteicos, considerando os contextos biológicos, as vias metabólicas e os processos celulares relevantes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os nutrientes minerais são essenciais na sobrevivência dos animais, correspondendo a aproximadamente 5% do peso total do corpo dos animais (BERCHIELLI, 2006), sendo, portanto, imprescindível que a dieta dos ruminantes seja

equilibrada com esses elementos. Neste sentido, o pó de rocha torna-se uma opção interessante de fonte de minerais. No pó de rocha, rejeito da mineração no município de Araçuaí, foram encontrados, entre os minerais, níveis de potássio, sódio e silício que podem atender as demandas desses elementos na dieta de caprinos e ovinos e até mesmo auxiliarem no tratamento de doenças que acometem esses animais, principalmente em regiões em que a nutrição dos animais é dificultada por questões econômicas, sociais e edafoclimáticas. De modo geral, as exigências diárias de minerais pelos caprinos e ovinos, com base na matéria seca, varia de 0,5 a 0,8% e 0,04 a 0,1% para potássio e sódio, respectivamente (CONRAD, 1985). Esses requerimentos são afetados por fatores intrínsecos e extrínsecos aos animais. As exigências diárias de silício pelos animais não foram encontradas na literatura consultada.

Ainda que os benefícios do sódio, do potássio e do silício para os animais ruminantes estejam claros na literatura, o mecanismo molecular de atuação desses elementos ainda carece de estudos. As análises bioinformática realizadas no presente estudo revelaram possibilidades importantes de atuação desses elementos no tratamento da mastite caprina, uma vez que a quantidade requerida de cada mineral pode variar em função do estado de saúde do animal.

Os resultados das etapas de 1 a 8 foram inseridos na tabela 1, a qual detalha algumas das principais características topológicas das redes de interação proteína-proteína (PPI). Isso inclui seu tamanho, representado pelo número de proteínas e elementos químicos, e a sua ordem, expressa pelo quantitativo de ligações presentes nas redes (LEÃO, et al., 2019).

Tabela 1 - Estatísticas e características topológicas da rede de interação proteína-proteína utilizando o potássio, sódio, silício e as proteínas ica como entrada.

Etapas	Número de nós	Número de arestas	Grau médio do nó	Coefficiente de agrupamento	Número esperado de arestas	Valor p de enriquecimento PPI*
1	15	26	3,47	0,94	16	0,0121
2	12	12	2	0,806	12	0,492
3	24	0	0	1	25	1
4	32	25	1,56	0,953	32	0,909
5	32	19	1,19	0,948	30	0,988
6	30	172	11,5	0,611	130	0,000245
7	4	6	3	1	1	0,000566
8	12	7	1,17	1	10	0,89

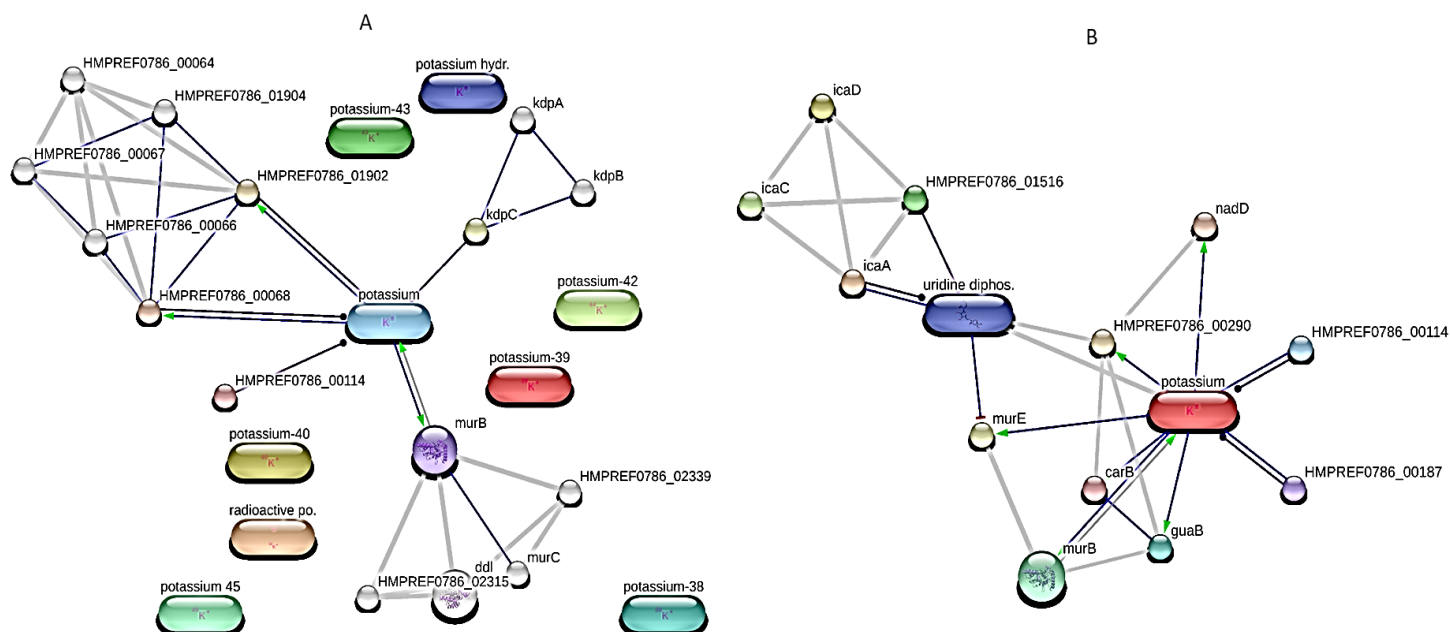
*O valor de p indica o quanto as proteínas interagem entre si de maneira significativa em um contexto biológico. Fonte: Autores (2024)

As proteínas estão ao menos parcialmente ligadas biologicamente, como um grupo ($p = 0.000245$ a 1), com exceção para o sódio (Figura 2A). O potássio se liga diretamente à proteína murB (UDP-N-acetylmuramate dehydrogenase) e eles interagem entre si, por meio de uma ativação recíproca, indicada pela seta verde (Figura 1A) em direção a ambas as moléculas (escore combinado = $0,987$). A enzima murB pertence à família das proteínas contendo domínios de ligação ao FAD e compartilha uma dobra de ligação ao FAD característica, participando, como catalisadora, de uma das principais etapas na biossíntese de peptidoglicano (ENIYAN, 2018). Esta enzima é essencial para o crescimento de células bacterianas (MIYAKAWA, 1972), além disso, pode ser encontrada em organismos gram-positivos e gram-negativos, o que indica que seu inibidor pode apresentar atividade antibacteriana de amplo espectro (BRONSON, 2003), sendo, portanto, um alvo atraente para o desenvolvimento de medicamentos antimicrobianos.

É bem fundamentado na literatura que o potássio potencializa a atividade da proteína murB (CHEN, 2013; DHALLA, 1995), exacerbando os danos que as bactérias podem provocar no hospedeiro. Foi observada a atuação do potássio sobre o complexo kdp (ATPase translocadora de potássio), com uma ação relacionada ao aumento da viabilidade das células bacterianas. O turgor celular bacteriano diminui em baixas concentrações externas de K^+ devido à limitação de K^+ no meio. Nestas condições de prejuízo celular a Kdp de alta afinidade é expressa e isso permite que a célula procure K^+ no meio para restaurar o turgor celular (LAIMINS et al., 1981; WALDERHAUG et al., 1987). O operon kdpABC, que foi clonado e sequenciado, codifica as três proteínas da membrana citoplasmática KdpA, KdpB e KdpC (HESSE et al., 1984).

Essas constatações sugerem que a suplementação de caprinos e ovinos com aumento dos níveis de potássio na dieta não é benéfica do ponto de vista do combate da bactéria *S. caprae*, quando a mastite já está estabelecida. Entretanto, pode-se perceber os benefícios desse e de outros minerais quando utilizados na dieta de forma preventiva, (ABEBE et al., 2016), uma vez que está bem estabelecido que as deficiências nutricionais levam a uma resposta imunitária enfraquecida, que é um fator predisponente para a invasão microbiana do úbere (BRUNO, 2010). Ademais, os minerais participam da formação de componentes estruturais do organismo, além de permitirem o bom funcionamento de enzimas, hormônios, vitaminas e células (LEIRA et al., 2018).

Figura 1 – Rede de interação químico-proteína formada a partir do elemento potássio (A) e do potássio e das proteínas ica (A, B, C, D) (B) no organismo *Staphylococcus caprae*.



Fonte: Autores (2024)

Outro aspecto avaliado foi a capacidade de interferência dos minerais na formação de biofilmes. Em muitas bactérias a disponibilidade de nutrientes é um fator essencial na produção de biofilme. Por exemplo, a presença de metais como o ferro pode afetar o desenvolvimento do biofilme, bem como a produção de EPS (OLIVEIRA et. al., 2017). Embora tenha sido comprovado que vários elementos e compostos diferentes aumentam ou diminuem a síntese de biofilme, os efeitos do potássio nunca foram testados.

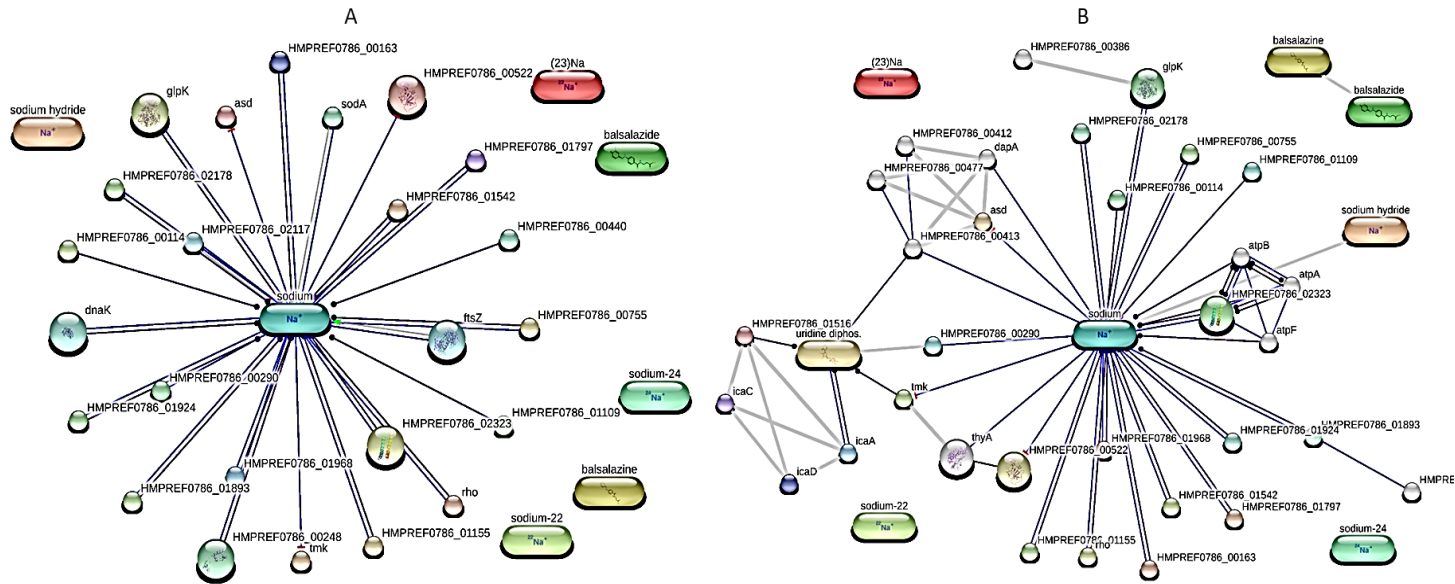
A análise de bioinformática demonstrou interação do potássio com proteínas importantes envolvidas na formação de biofilme. Na figura 1B estão apresentados os componentes da rede de interação proteica elaborada nesta etapa do estudo. Observa-se que o potássio interage de forma indireta com as proteínas ica (A, B, C e D) no organismo *S. caprae*. Pilon (2016) identificou que essas proteínas estão relacionadas com a formação de biofilme, encontrados na desmama de ovelhas com mastite subclínica. Com esse resultado, fica evidente a relação entre o potássio e as proteínas ica (A, B, C e D), sendo que uma das vias de interação é por meio da Guanilato quinase (HMPREF0786_00290), que é essencial para reciclar GMP e indiretamente cGMP, tornando-a fundamental para a viabilidade e proliferação celular em humanos (KHAN et al., 2019). Na rede de interação proteica (Figura 1B) é possível observar que o potássio ativa esta enzima. Uma vez

ativada pelo potássio, a guanilato quinase pode favorecer a formação de biofilmes por interagir com as proteínas ica (A, B, C e D), por intermédio do difosfato de uridina. Este é um precursor essencial para reações de glicosilação em todas as formas de vida, atuando como blocos de construção essenciais no peptidoglicano das células bacterianas (CHENOWETH, 2020).

Esses resultados reiteram a suplementação preventiva de potássio na dieta dos ruminantes, visto que não há evidências da efetividade no tratamento da mastite. De fato, alguns estudos mostraram que o potássio tem um papel significativo na sinalização elétrica durante a formação dos biofilmes (TIWARI et al., 2023; PRINDLE et al., 2015; HUMPHRIES et al., 2017).

Na tabela 1, ao observar os dados obtidos na etapa 3 é possível verificar a ausência de conexões entre diferentes proteínas. Contudo, a plataforma STITCH possui um conjunto limitado de proteínas em seu banco atual, o que não significa que não exista uma seleção de proteínas biologicamente importantes. Assim, pode denotar que estas proteínas e suas interações não sejam conhecidas pelo STITCH. A descrição da rede de interação pode ser verificada na figura 2A.

Figura 2 – Rede de interação químico-proteína formada a partir do elemento sódio (A) e do sódio e das proteínas ica (A, B, C, D) (B) no organismo *Staphylococcus caprae*.



Fonte: Autores (2024)

Embora na rede de interação proteica (Figura 2A) não tenham sido identificadas interconexões entre as proteínas, destaca-se a inibição das proteínas Asd. (Aspartate-beta-

semialdehyde dehydrogenase), HMPREF0786_00522 (Dihydrofolate reductase) e tmk (dTMP kinase), ocasionada pelo sódio. Tais proteínas são enzimas envolvidas no desenvolvimento de células bacterianas. A asd, por exemplo, codifica uma enzima essencial na biossíntese de aminoácidos em bactérias (HARB e ABU, 1998) e uma enzima em a cadeia de transporte de elétrons (NADH: cadeia D da ubiquinona oxidoredutase; nuoD), a ATPase dnaA que ativa o início da replicação do DNA e o componente diidrolipoamida desidrogenase E3 (DLD) que forma uma subunidade de vários complexos enzimáticos que estão amplamente envolvidos na produção de energia via quebra de biomoléculas (WANGWIWATSIN et al., 2023). Esta observação corrobora com as anteriores sobre a suplementação de minerais na dieta.

A proteína dnaK está ligada ao sódio (Figura 2A) e está relacionada com a patogenicidade com *S. aureus* e a formação de biofilmezimaro (SINGH et al., 2012; FERREIRA, 2022; ZIMARO, 2013). A relação do sódio com a proteína dnaK pode ser promissora, dada a relação entre ela e os agentes causadores da mastite. A relação encontrada na literatura entre o sódio e a mastite subclínica em cabras, mostrou que o leite de cabras acometidas pela doença têm maiores teores de sódio e cloreto e em cabras não acometidas apresentam maiores concentrações de cálcio, fósforo, magnésio e potássio (SANCHEZ, 2015; COSTA et al., 2013), isso pode estar relacionado com o uso de antibiótico utilizado para tratar mastite, já que os antibióticos podem ocasionar mudanças no leite, como diminuição nos níveis de cálcio, fósforo, proteína e gordura, e elevação nos níveis de sódio e cloro (ISLAM et al., 2012).

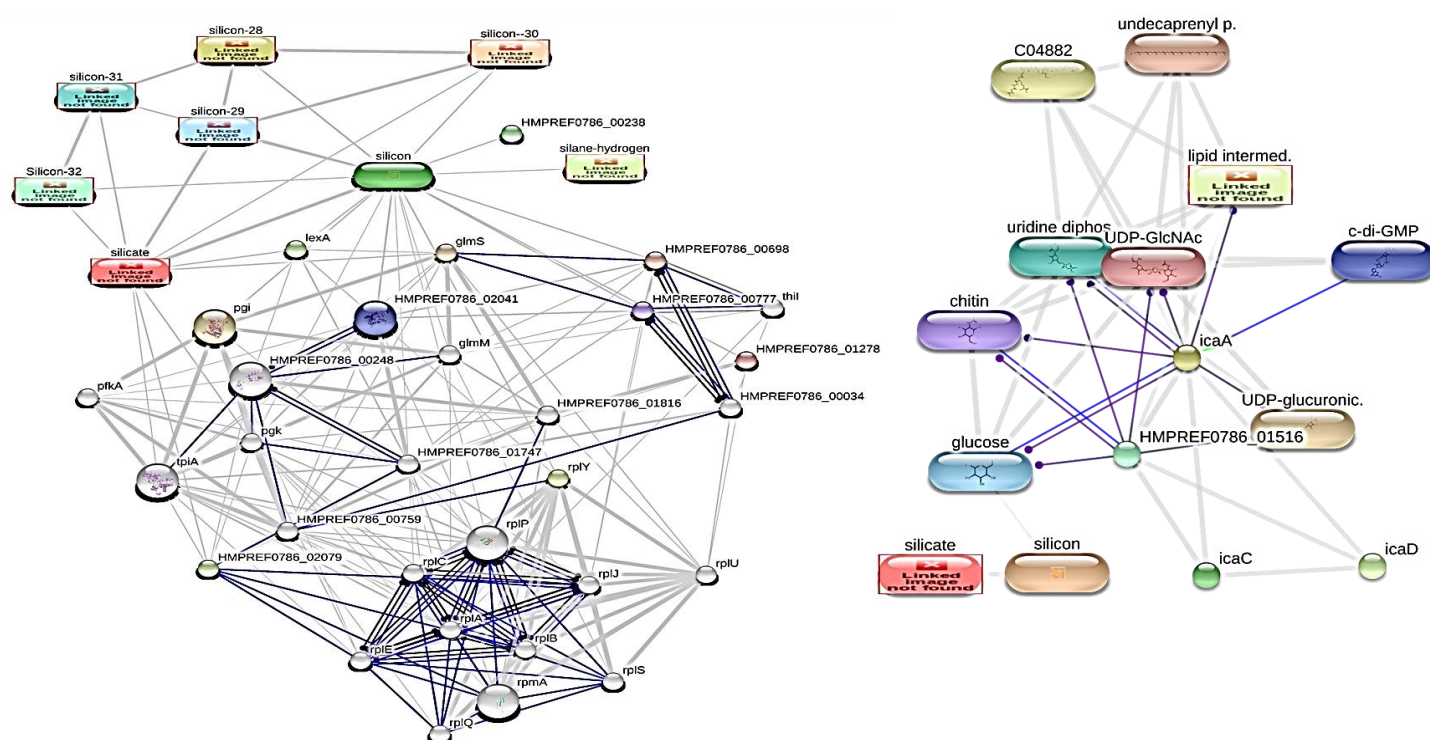
A proporção de sódio para potássio se eleva durante infecções intramamárias. Um notável aumento na condutividade elétrica é percebido, especialmente quando a inflamação impacta a glândula mamária de ambos os lados, resultando em aumentos substanciais tanto no conteúdo de cloreto quanto na proporção de sódio para potássio (NOVAC; ANDREI, 2020).

A conexão entre o sódio e as proteínas envolvidas na formação de biofilmes (Figura 2B) se dá por meio da enzima tmk. Esta enzima, pertencente às vias dos ácidos nucleicos, está envolvida na formação de dTDP usando timidina e é um alvo bem conhecido para células hospedeiras infectadas com o vírus do herpes (AHN et al., 2014). Estudos mostram interferência positiva face a *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Haemophilus influenzae* e outras bactérias (HARE et al., 2001). Como demonstrado na rede de interação proteica, o sódio atua nesta enzima inibindo-a e ela interage com as

proteínas do complexo ica por meio do difosfato de uridina. Dessa forma, o sódio pode desfavorecer a formação de biofilmes bacterianos de *S. caprae* por inibição da tmk.

Não foi detectada na literatura consultada estudos que abordassem a atuação do silício sobre bactérias do gênero *Staphylococcus*. No entanto, o dióxido de silício mostrou-se eficaz no processo de inativação das bactérias *E. coli* e *Micrococcus luteus* (WILLIAMS et al., 2018), não sendo, entretanto, estabelecido o mecanismo molecular envolvido.

Figura 3 – Rede de interação químico-proteína formada a partir do elemento silício (A) e do silício e das proteínas ica (A, B, C, D) (B) no organismo *Staphylococcus caprae*.



Fonte: Autores (2024)

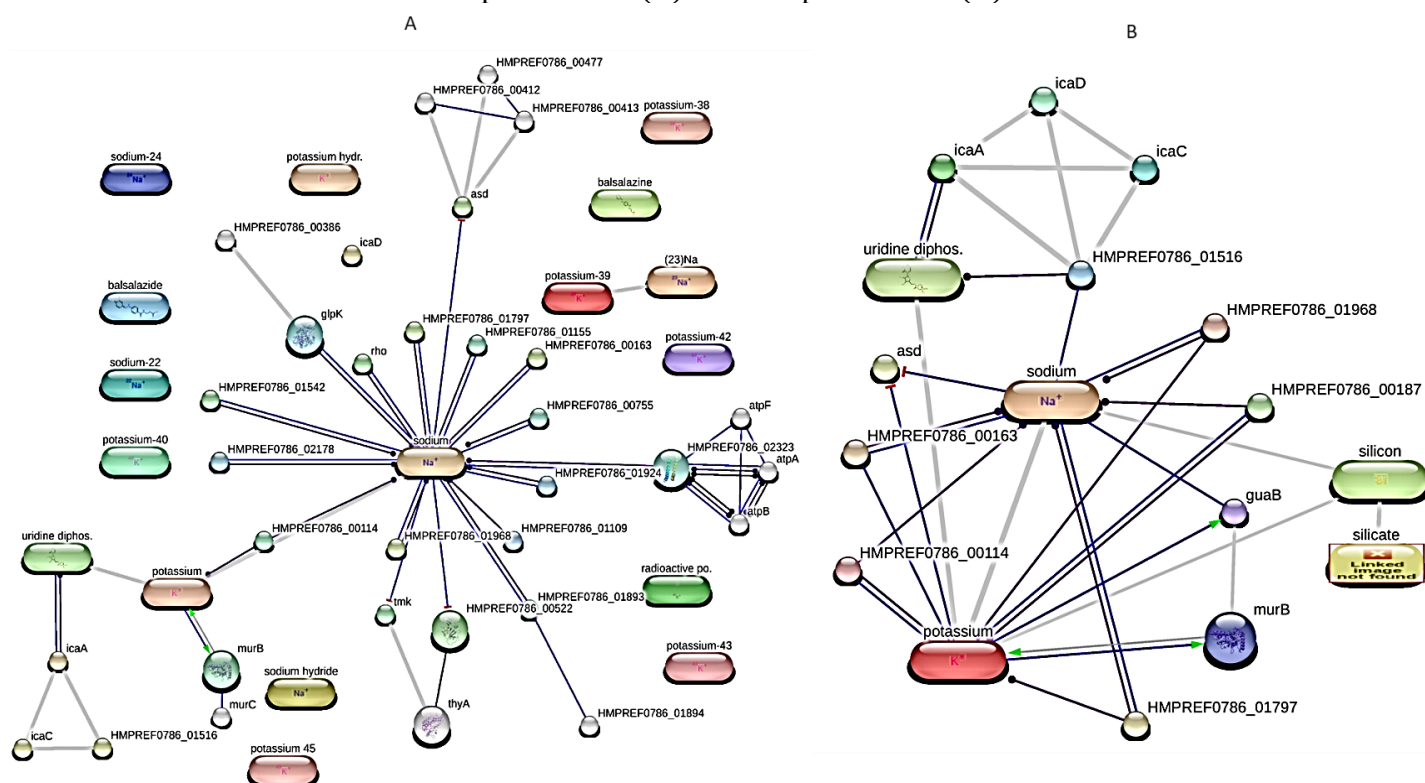
A proteína pgi (*Phosphohexose isomerase*) aparece associada ao silício com um escore de interação de 0,308 (Figura 3A). Esta enzima catalisa a segunda etapa da glicólise e atua como fator de motilidade autócrina, agente de neuroleucina, inibidor de serina proteinase e mediador de diferenciação e maturação (CAO et al., 2000; CHAPUT et al., 1988; FAIK et al., 1988; WATANABE et al., 1991). Portanto, a via molecular que envolve a pgi seria interessante de ser estudada para investigar uma possibilidade de atuação do silício no combate da mastite infecciosa caprina. Em plantas, já foi relatado que

o silício aumenta a resistência a doenças causadas por fungos, bactérias e pragas (FAUTEUX et al., 2005; MARSCHNER, 2012), através de ações físicas, bioquímicas e moleculares (WANG et al., 2017). Em animais o silício fornecido na alimentação ativa enzimas no trato gastrointestinal, aumenta a absorção de nutrientes, regula os eletrólitos os quais desempenham papéis essenciais na regulação do equilíbrio hídrico, na função muscular, na condução nervosa e em outras funções vitais, e ainda elimina toxinas e metais pesados (FEOKTISTOVA et al., 2022).

O estudo indica a associação do silício à proteína icaA via molécula de glicose (Escore = 0,912) (Figura 3B). Foi relatado que a alteração da pressão osmótica no meio de cultura afeta a capacidade do *S. aureus* de formar biofilmes. Este fenômeno está associado a mudanças na expressão de genes que contribuem para a modulação da formação de biofilme, incluindo icaA (CERCA et al., 2008; LIU, ZHANG, JI, 2020). Verificou-se que a presença de glicose no meio de cultura promove a formação de biofilme de forma proporcional à dose (VAZQUEZ-SANCHEZ D, HABIMANA O, HOLCK, 2013; LEE et al., 2015; KHALIL, SONBOL, 2014). Compostos de silício, por sua vez, são capazes de reduzir concentrações de glicose (HU et al., 2019; MARINHEIRO et al., 2023), o que sugere uma atuação indireta na redução de biofilmes formados por bactérias estafilocócicas.

A rede apresentada na figura 4A é um compilado das redes elaboradas nas etapas de 1 a 4. Com relação às proteínas envolvidas na formação dos biofilmes de *S. caprae*, a atuação do potássio parece prevalecer sobre a atuação do sódio (Figura 4A), sendo que a via de atuação do sódio por intermédio do tmk não mais se conecta com as proteínas do complexo ica, com a quantidade de interatores apresentados na rede.

Figura 4 – Rede de interação químico-proteína formada a partir de um compilado das etapas de 1 a 4 (B) e das etapas de 1 a 6 (B).



Fonte: Autores (2024)

Destaca-se a atuação do composto difosfato de uridina na intermediação da formação dos biofilmes de *S. caprae*. As análises realizadas indicam que esta molécula pode ser ativada pelo potássio favorecendo a formação de biofilmes ou inibido pelo sódio (via tmk) prejudicando a formação dos biofilmes. A análise metabolômica realizada por Zhang et al (2023) indicou que compostos de difosfato de uridina foram os principais metabólitos durante a formação do biofilme de *Bifidobacterium pseudocatenulatum*. O difosfato de uridina galactose (UDP-galactose) faz parte do processo de produção de polissacarídeos, com destaque no metabolismo dos açúcares nucleotídeos (VERT et al., 2012).

O silício atua na rede de interação por meio das moléculas de potássio e sódio (Figura 4B). Além dos mecanismos apresentados anteriormente que envolvem as atuações do potássio e do sódio sobre o *S. caprae*, é evidenciado que o potássio também pode atuar inibindo a proteína asd (Figura 4), impedindo, por esta via, o desenvolvimento bacteriano.

É imprescindível a realização de estudos funcionais para aprofundar e comprovar os resultados obtidos no presente estudo, de forma que as análises possam auxiliar no descobrimento da relação entre os agentes causadores da mastite e dos elementos do pó de rocha.

CONCLUSÕES

Embora as análises bioinformáticas permitam apenas a formulação de hipóteses, sem confirmação direta, os resultados deste estudo sugerem que o pó de rocha pode desempenhar um papel significativo como suplemento dietético na prevenção de doenças infecciosas, como a mastite caprina. Isso se deve à presença de minerais essenciais que desempenham um papel fundamental na estimulação do sistema imunológico dos animais, contribuindo assim para a saúde do úbere.

Os resultados apontaram também para o potássio como um fator predisponente para a formação de biofilmes e desenvolvimento de *S. caprae* por intermédio da enzima Guanilato quinase e da proteína murB, respectivamente. No entanto, este mineral demonstrou potencial em desfavorecer o crescimento bacteriano, inibindo a proteína asd. O sódio mostrou-se como fator inibitório para a formação de biofilmes via proteína tmk e contrário ao desenvolvimento bacteriano por inibir proteínas como asd, HMPREF0786_00522 e tmk. O silício, por sua vez, pode colaborar com atenuação do processo infeccioso por intermédio das moléculas de sódio e potássio, reduzindo níveis de glicose que desfavorece a formação de biofilmes e ainda atuando em proteínas como a pgi, que se inibida pode prejudicar o desenvolvimento do *S. caprae*.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Pró-reitoria de Pesquisa, Pós-graduação e Inovação (PROPPi) do IFNMG, à Companhia Brasileira de Lítio (CBL) e ao CNPq pelo apoio na condução deste estudo.

REFERÊNCIAS

- ABEBE, R et al. Bovine mastitis: prevalence, risk factors and isolation of *Staphylococcus aureus* in dairy herds at Hawassa milk shed, South Ethiopia. **BMC veterinary research**, v. 12, n. 1, p. 1-11, 2016.
- AHN, Yong-Yeol et al. Identificação baseada em análise de redes metabólicas de alvos de medicamentos antimicrobianos em agentes de bioterrorismo categoria A. **PLoS Um**, v. 1, pág. e85195, 2014.
- ALNAKIP, M.. E et al. The immunology of mammary gland of dairy ruminants between healthy and inflammatory conditions. **Journal of veterinary medicine**, v. 2014, 2014.
- BARANOWSKI, S. Wpływ niedoboru sodu w pokarmie na czynność nerek i gruczołu mlekowego. **Szczecin Wyzsza Szk Roln Rozpr**, 1972.
- BARBOSA, C. P et al. Relação entre contagem de células somáticas (CCS) e os resultados do “California Mastitis Test”(CMT), no diagnóstico de mastite bovina. **Bioscience Journal**, v. 18, n. 1, p. 93-102, 2002.
- BARKEMA, H. W.; SCHUKKEN, Y. H.; ZADOKS, R. N. Invited review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. **Journal of dairy science**, v. 89, n. 6, p. 1877-1895, 2006.
- BARKEMA, HW et al. Práticas de manejo associadas a contagens baixas, médias e altas de células somáticas no leite a granel. **Revista de ciência láctea**, v. 81, n. 7, pág. 1917-1927, 1998..
- BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. Nutrição de Ruminantes. Jaboticabal: **Funep**, 2006.
- BRONSON, J. J et al. Discovery of the first antibacterial small molecule inhibitors of MurB. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 13, n. 5, p. 873-875, 2003.
- BRUNO, D. R. Mastitis, mammary gland immunity, and nutrition. In: **Mid-South Ruminant Nutrition Conference**. 2010.
- CAO, Min-Jie et al. Purification of a novel serine proteinase inhibitor from the skeletal muscle of white croaker (*Argyrosomus argentatus*). **Biochemical and biophysical research communications**, v. 272, n. 2, p. 485-489, 2000.
- CERCA, N.; BROOKS, J. L.; JEFFERSON, K. K. Regulation of the intercellular adhesin locus regulator (icaR) by SarA, σ B, and IcaR in *Staphylococcus aureus*. **Journal of bacteriology**, v. 190, n. 19, p. 6530-6533, 2008.
- CHAIIEB, K. et al. XTT assay for evaluating the effect of alcohols, hydrogen peroxide and benzalkonium chloride on biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. **Microbial Pathogenesis**, v. 50, n. 1, p. 1-5, 2011.

- CHAPUT, M. et al. The neurotrophic factor neuroleukin is 90% homologous with phosphohexose isomerase. **Nature**, v. 332, n. 6163, p. 454-455, 1988.
- CHEN, M. W. et al. Substrate channel flexibility in *Pseudomonas aeruginosa* MurB accommodates two distinct substrates. **Plos one**, v. 8, n. 6, p. e66936, 2013.
- CHENOWETH, D. M. Chemical Tools for Imaging, Manipulating, and Tracking Biological Systems: Diverse Methods for Prokaryotic and Eukaryotic Systems. **Academic Press**, 2020.
- CONRAD, J. H. et al. Minerais para ruminantes em pastejo em regiões tropicais. 1985.
- CONTRERAS, A. et al. Mastitis in small ruminants. **Small Ruminant Research**, v. 68, n. 1-2, p. 145-153, 2007.
- COSTA, C. R. de M. et al. Mastite caprina: etiologia e epidemiologia: revisão de literatura. **Pubvet**, v. 7, p. 619-706, 2013.
- DEVRIESE, L. A. et al. *Staphylococcus gallinarum* and *Staphylococcus caprae*, two new species from animals. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 33, n. 3, p. 480-486, 1983.
- DHALLA, A. M. et al. Steady-state kinetic mechanism of *Escherichia coli* UDP-N-acetylenolpyruvylglucosamine reductase. **Biochemistry**, v. 34, n. 16, p. 5390-5402, 1995.
- DONLAN, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerging infectious diseases**, v. 8, n. 9, p. 881, 2002.
- ENIYAN, K. et al. Crystal structure of UDP-N-acetylglucosamine-enolpyruvate reductase (MurB) from *Mycobacterium tuberculosis*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, v. 1866, n. 3, p. 397-406, 2018.
- FAIK, P. et al. Mouse glucose-6-phosphate isomerase and neuroleukin have identical 3' sequences. **Nature**, v. 332, n. 6163, p. 455-456, 1988.
- FAUTEUX, F. et al. Silicon and plant disease resistance against pathogenic fungi. **FEMS Microbiology letters**, v. 249, n. 1, p. 1-6, 2005.
- FEOKTISTOVA, Natalya et al. Silicon-containing minerals as additives for farm animals. In: **BIO Web of Conferences**. EDP Sciences, 2022. p. 01003.
- FERREIRA, J. C. Proteínas moonlighting e sua relação com a patogenicidade da bactéria *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, causadora do cancro cítrico. 2022.
- HARB, O. S.; KWAIK, Yousef Abu. Identification of the aspartate- β -semialdehyde dehydrogenase gene of *Legionella pneumophila* and characterization of a null mutant. **Infection and immunity**, v. 66, n. 5, p. 1898-1903, 1998.

HARE, R. S. et al. Genetic footprinting in bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 5, p. 1694-1706, 2001.

HEILMANN, C. Adhesion mechanisms of staphylococci. **Bacterial Adhesion: Chemistry, Biology and Physics**, p. 105-123, 2011.

HESSE, J. E. et al. Sequence homology between two membrane transport ATPases, the Kdp-ATPase of *Escherichia coli* and the Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 81, n. 15, p. 4746-4750, 1984.

HU, Hailong et al. Silicon dioxide nanoparticles induce insulin resistance through endoplasmic reticulum stress and generation of reactive oxygen species. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 16, n. 1, p. 1-18, 2019.

HUMPHRIES, J. et al. Species-independent attraction to biofilms through electrical signaling. **Cell**, v. 168, n. 1, p. 200-209. e12, 2017..

ISLAM, M. R. et al. Identification and antibiotic sensitivity of the causative organisms of subclinical mastitis in sheep and goats. **Pak. Vet. J**, v. 32, n. 2, p. 179-182, 2012.

JAIN, A; AGARWAL, A. Biofilm production, a marker of pathogenic potential of colonizing and commensal staphylococci. **Journal of microbiological methods**, v. 76, n. 1, p. 88-92, 2009.

KHALIL, M. A.; SONBOL, F. I. Investigation of biofilm formation on contact eye lenses caused by methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **Nigerian Journal of Clinical Practice**, v. 17, n. 6, p. 776-784, 2014.

KHAN, N. et al. Solution structure and functional investigation of human guanylate kinase reveals allosteric networking and a crucial role for the enzyme in cancer. **Journal of Biological Chemistry**, v. 294, n. 31, p. 11920-11933, 2019.

LAIMINS, L.A.; ROADS, D.B.; EPSTEIN, W. Controle osmótico da expressão do operon kdp em *Escherichia coli*. **In. Anais da Academia Nacional de Ciências**, v. 78, n. 1, pág. 464-468, 1981.

LEÃO, J. C. et al. Uma análise temporal da rede de colaboração científica do IFNMG: 10 anos de iniciação científica e orientação acadêmica. **In. Anais dos Simpósios de Informática do IFNMG - Campus Januária**, v. 11, p. 7, 2019.

LEE, Jung-Su et al. Biofilm formation of *Staphylococcus aureus* on various surfaces and their resistance to chlorine sanitizer. **Journal of food science**, v. 80, n. 10, p. M2279-M2286, 2015.

LEIRA, M. H. et al. Fatores que alteram a produção e a qualidade do leite: Revisão. **Pubvet**, v. 12, p. 172, 2018.

LIBERA, K. et al. The association between selected dietary minerals and mastitis in dairy cows—A review. **Animals**, v. 11, n. 8, p. 2330, 2021.

- LIU, Y; ZHANG, J; JI, Y. Environmental factors modulate biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. **Science Progress**, v. 103, n. 1, p. 0036850419898659, 2020.
- MADIGAN, M. T. et al. Brock Biology of Microorganisms. 15th Global Edition. **Boston, US: Benjamin Cummins**, v. 1, p. 1391-1407, 2018.
- MAHLANGU, P; MAINA, N; KAGIRA, J. Prevalence, risk factors, and antibiogram of bacteria isolated from milk of goats with subclinical mastitis in Thika East Subcounty, Kenya. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 2018, 2018.
- MANNING, D. AC; THEODORO, Suzi Huff. Enabling food security through use of local rocks and minerals. **The Extractive Industries and Society**, v. 7, n. 2, p. 480-487, 2020.
- MARINHEIRO, D. et al. Silica-Based Nanomaterials for Diabetes Mellitus Treatment. **Bioengineering**, v. 10, n. 1, p. 40, 2022.
- MARSCHNER, H. (Ed.). **Marschner's mineral nutrition of higher plants**. Academic press, 2011.
- MCDOWELL, L. R. Minerals For Ruminants Under Pasture in Tropical Regions, Empathizing Brazil. **São Paulo, Brazil: UNESP**, 1999.
- MCDOWELL, L. R. et al. **Minerals in animal and human nutrition**. Academic Press Inc., 1992.
- MIYAKAWA, T. et al. Cell wall peptidoglycan mutants of *Escherichia coli* K-12: existence of two clusters of genes, *mra* and *mrh*, for cell wall peptidoglycan biosynthesis. **Journal of Bacteriology**, v. 112, n. 2, p. 950-958, 1972.
- NOVAC, C. S., A, S. The Impact of mastitis on the biochemical parameters, oxidative and nitrosative stress markers in goat's milk: A review. **Pathogens**, v. 9, n. 11, p. 882, 2020.
- O'GARA, J. P. *ica* and beyond: biofilm mechanisms and regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. **FEMS microbiology letters**, v. 270, n. 2, p. 179-188, 2007.
- OLIVEIRA, F; FRANÇA, A; CERCA, N. *Staphylococcus epidermidis* is largely dependent on iron availability to form biofilms. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 307, n. 8, p. 552-563, 2017.
- PILON, L. E. Características genotípicas de *Staphylococcus coagulase-negativos* e taxas de cura da mastite ovina. 2016.
- PRINDLE, A. et al. Ion channels enable electrical communication in bacterial communities. **nature**, v. 527, n. 7576, p. 59-63, 2015.
- SANCHEZ, D. C. C. Perfil bioquímico dos soros lácteo e sanguíneo de cabras com mastite de ocorrência natural. 2015.

SILVA, V. A. et al. Mineralogical analysis of rock dust for remineralization of soil intended for pasture. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 13, n. 2, p. 1-13, 2022.

SINGH, R; et al. Penetration of antibiotics through Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis biofilms. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 65, n. 9, p. 1955-1958, 2010.

SINGH, V. K. et al. An insight into the significance of the DnaK heat shock system in Staphylococcus aureus. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 302, n. 6, p. 242-252, 2012.

SPURIA, L. et al. Microbial agents in macroscopically healthy mammary gland tissues of small ruminants. **PeerJ**, v. 5, p. e3994, 2017.

SWOBODA, P.; DÖRING, T. F.; HAMER, M. Remineralizing soils? The agricultural usage of silicate rock powders: A review. **Science of The Total Environment**, v. 807, p. 150976, 2022.

TIWARI, M.; PANWAR, Shruti; TIWARI, Vishvanath. Assessment of potassium ion channel during electric signalling in biofilm formation of Acinetobacter baumannii for finding antibiofilm molecule. **Heliyon**, v. 9, n. 1, 2023.

VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, D; HABIMANA, O; HOLCK, A. Impact of food-related environmental factors on the adherence and biofilm formation of natural Staphylococcus aureus isolates. **Current microbiology**, v. 66, p. 110-121, 2013.

VERT, M. et al. Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). **Pure and Applied Chemistry**, v. 84, n. 2, p. 377-410, 2012.

WALDERHAUG, M. O.; DOSCH, D. C.; EPSTEIN, W. Potassium transport in bacteria. In: **Ion transport in prokaryotes**. Academic Press, 1987. p. 85-130.

WANGWIWATSIN, A. et al. Toward novel treatment against filariasis: Insight into genome-wide co-evolutionary analysis of filarial nematodes and Wolbachia. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, p. 1052352, 2023.

WANG, Min et al. Role of silicon on plant–pathogen interactions. **Frontiers in plant science**, v. 8, p. 701, 2017.

WATANABE, H. et al. Purification of human tumor cell autocrine motility factor and molecular cloning of its receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 20, p. 13442-13448, 1991.

WILLIAMS, F. E. et al. Antibacterial action of functional silicon dioxide: an investigation of the attachment and separation of bacteria. **Environmental Technology**, 2018.

ZHANG, T. et al. Multi-omics analysis reveals genes and metabolites involved in *Bifidobacterium pseudocatenulatum* biofilm formation. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, 2023.

ZIMARO, Tamara et al. Insights into *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* biofilm through proteomics. **BMC microbiology**, v. 13, p. 1-14, 2013.