

ALESSANDRA BARBOSA FERREIRA

**RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E MOLECULARES DE *Lactobacillus delbrueckii*  
UFV H2b20 AOS ESTRESSES ÁCIDO E POR SAIS BILIARES**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2011

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

F383r  
2011

Ferreira, Alessandra Barbosa, 1980-  
Respostas fisiológicas e moleculares de  
*Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 aos estresses ácido  
e por sais biliares / Alessandra Barbosa Ferreira. – Viçosa,  
MG, 2011.

xiii, 103f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Célia Alencar de Moraes.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Lactobacillus. 2. Probióticos. 3. Regulação de expressão  
gênica. 4. Genômica. 5. Nutrição. I. Universidade Federal de  
Viçosa. II. Título.


CDD 22. ed. 630.276

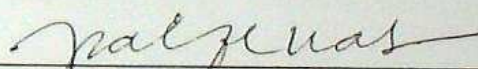
ALESSANDRA BARBOSA FERREIRA

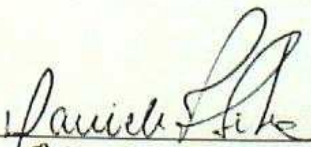
**RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E MOLECULARES DE *Lactobacillus delbrueckii*  
UFV H2b20 AOS ESTRESSES ÁCIDO E POR SAIS BILIARES**

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

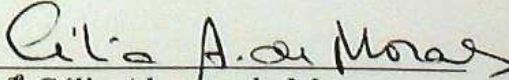
APROVADA: 29 de março de 2011

  
Prof. Arnaldo Chaer Borges  
(Co-orientador)

  
Dra. Poliane Alfenas Zerbini

  
Profª Daniele Ferreira da Silva

  
Profª Maria Aparecida S. Moreira

  
Profª Célia Alencar de Moraes  
(Orientadora)

À prof<sup>a</sup> Célia Alencar de Moraes

Ao prof. Arnaldo Chaer Borges

Dedico

Aos meus pais, Alexandre e Márcia

Aos meus irmãos, Flávio e Márcio

Ao meu noivo, Juarez

Dedico

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade de realização do curso.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro.

À professora Célia Alencar de Moraes, pela orientação, pelo exemplo profissional e pessoal, pelo incentivo e pela confiança em meu trabalho.

Ao professor Arnaldo Chaer Borges, meu coorientador, pelas valiosas contribuições, pelos conselhos e pelo incentivo constante.

À professora Marisa Vieira de Queiroz, minha coorientadora, pelas sugestões.

À Dra. Poliane Afenas Zerbini, pela orientação durante os experimentos, sugestões e participação na banca de defesa de tese.

À professora Daniele Ferreira da Silva, pela ajuda constante e participação na banca de defesa de tese.

À professora Maria Aparecida Scatamburlo, que me ensinou os primeiros passos no laboratório de Microbiologia Industrial, pela participação na banca de defesa de tese.

Ao professor Sukarno Olavo Ferreira pelo auxílio nos experimentos de Microscopia de Força Atômica.

À Dra Eunize Zambolim e ao professor Laércio Zambolim pela oportunidade oferecida, motivação constante e confiança em mim depositada.

Aos professores do Departamento de Microbiologia pela competência na execução de seus trabalhos.

Ao meu grande amigo e colega de trabalho, Marcelo, pela parceria durante todos esses anos.

À estudante de iniciação científica, Fernanda pela ajuda constante, pela seriedade e responsabilidade na execução do trabalho.

A Nilcéia e a Elizabete pela ajuda constante.

Aos funcionários Danilo, Evandro e Paulo pela colaboração diária.

Aos colegas e amigos do laboratório de Microbiologia Industrial, José Carlos, Eliana, Margarete, Ana Paula, Lisiane, Tatiane, Thiago, Maurício, Gabriel e Samira.

Aos amigos e colegas dos laboratórios do departamento de Microbiologia.

Ao meu noivo Juarez, pela dedicação, companheirismo e amor.

Aos meus irmãos Flávio e Márcio, pelo companheirismo e amizade.

Em especial, agradeço aos meus pais, Alexandre e Márcia, meus grandes incentivadores, por todo o carinho, amor, dedicação, apoio, companhia e confiança.

## **BIOGRAFIA**

ALESSANDRA BARBOSA FERREIRA, filha de Alexandre da Silva Ferreira e Márcia Maria Barbosa Ferreira, nasceu no dia vinte e sete de outubro de 1980 em Sete Lagoas, Minas Gerais.

Em março de 1999, ingressou no curso de Nutrição da Universidade Federal de Viçosa, graduando-se como Nutricionista em janeiro de 2004.

Em março de 2004, iniciou, na mesma instituição, o Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, obtendo título de mestre em fevereiro de 2006.

No período de março de 2006 a fevereiro de 2007, foi bolsista da EMBRAPA CAFÉ, desenvolvendo as atividades de pesquisa no Laboratório de Biotecnologia do Cafeeiro da Universidade Federal de Viçosa.

Em março de 2007, iniciou o Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, em nível de Doutorado, na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. Em 29 de março de 2011 foi realizada a defesa da tese de Doutorado.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
INTRODUÇÃO GERAL.....	x
<b>Capítulo 1 –GENÔMICA DA PROBIOSE EM <i>Lactobacillus</i></b> .....	<b>3</b>
1. Microbioma Intestinal Humano.....	3
2. O gênero <i>Lactobacillus</i> .....	6
3. Genômica da probiose.....	9
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	12
<b>Capítulo 2 - CRESCIMENTO, SOBREVIVÊNCIA E ANÁLISE MORFOLÓGICA DE CÉLULAS DE <i>Lactobacillus delbrueckii</i> UFV H2b20 SUBMETIDAS AOS ESTRESSES ÁCIDO E POR SAIS BILIARES</b> .....	<b>16</b>
RESUMO.....	17
1. INTRODUÇÃO.....	18
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
2.1. Micro-organismo e padronização da cultura.....	20
2.2. Crescimento de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20 exposto aos estresses ácido e por sais biliares.....	20
2.3. Sobrevivência de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20 exposto aos estresses ácido e por sais biliares.....	20
2.4. Detecção da atividade de Hidrolase de sais biliares (Bsh).....	21
2.5. Análise morfológica das células de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20 expostas a condições de estresse por Microscopia de Força Atômica (MFA).....	21
3. RESULTADOS.....	22
4. DISCUSSÃO.....	23
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26
TABELA.....	28

FIGURAS.....	29
<b>Capítulo 3 - IDENTIFICAÇÃO, FILOGENIA MOLECULAR E ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES <i>clp</i> EM <i>Lactobacillus delbrueckii</i> UFV H2b20 EXPOSTO AOS ESTRESSES ÁCIDO E POR SAIS BILIARES .....</b>	<b>39</b>
RESUMO .....	40
1. INTRODUÇÃO .....	41
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	43
2.1. Linhagem e condições de cultivo .....	43
2.2. Extração de DNA total de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20 .....	43
2.3. Seleção de <i>primers</i> e detecção dos genes alvos .....	43
2.4. Clonagem e sequenciamento dos genes .....	44
2.5. Análise comparativa de genes e Análise filogenética .....	44
2.6. Preparação das células de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20 para extração de RNA ..	44
2.7. Extração de RNA e síntese de cDNA.....	45
2.8. qRT-PCR.....	45
3. RESULTADOS.....	46
4. DISCUSSÃO .....	47
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
TABELAS.....	54
FIGURAS.....	58
<b>Capítulo 4 - IDENTIFICAÇÃO, FILOGENIA MOLECULAR E ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS NA DESCARBOXILAÇÃO DE AMINOÁCIDOS EM <i>Lactobacillus delbrueckii</i> UFV H2b20 EXPOSTO AO ESTRESSE ÁCIDO .....</b>	<b>66</b>
RESUMO .....	67
1. INTRODUÇÃO .....	68
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	70
2.1. Linhagem e condições de cultivo .....	70

2.2. Extração de DNA total de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20 .....	70
2.3. Seleção de <i>primers</i> e detecção dos genes alvos .....	70
2.4. Clonagem e sequenciamento dos genes .....	71
2.5. Análise comparativa de genes e Análise filogenética .....	71
2.6. Preparação das células de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20 para extração de RNA ..	71
2.7. Extração de RNA e síntese de cDNA.....	72
2.8. qRT-PCR.....	72
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	73
3.1. Identificação e Filogenia Molecular dos genes que codificam ornitina descarboxilase e permease de aminoácido em <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20 .....	73
3.2. Análise da expressão relativa dos genes que codificam a ornitina descarboxilase e a permease de aminoácido em <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20.....	75
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
TABELAS.....	80
FIGURAS.....	84
<b>Capítulo 5 - EXPRESSÃO DOS GENES <i>spx</i>, <i>dps</i> e <i>pox</i> EM <i>Lactobacillus delbrueckii</i> UFV H2b20 EXPOSTO AOS ESTRESSES ÁCIDOS E POR SAIS BILIARES.....</b>	<b>87</b>
RESUMO .....	88
1. INTRODUÇÃO .....	89
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	91
2.1. Linhagem.....	91
2.2. Preparação das células de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20 para extração de RNA ..	91
2.3. Extração de RNA e síntese de cDNA.....	91
2.4. qRT -PCR.....	92
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	92
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95
TABELA.....	97
FIGURAS.....	98

CONCLUSÕES GERAIS.....	102
------------------------	-----

## RESUMO

FERREIRA, Alessandra Barbosa, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2011. **Respostas fisiológicas e moleculares de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 aos estresses ácido e por sais biliares.** Orientadora: Célia Alencar de Moraes. Coorientadores: Arnaldo Chaer Borges e Marisa Vieira de Queiroz.

As bactérias do ácido láctico utilizadas como probióticos devem resistir à acidez do estômago e à presença de sais biliares no intestino. O presente trabalho teve por objetivo estudar as respostas fisiológicas e morfológicas de células de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 aos estresses ácido e por sais biliares, além de identificar e realizar análises filogenética e de expressão de genes possivelmente relacionados a esses estresses. *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 não cresce em caldo MRS pH 3,5 entretanto, células mantidas neste meio por quatro horas toleram o estresse ácido, como demonstrado por curvas de sobrevivência. A maior tolerância da bactéria aos sais biliares mistos e a menor ao ácido glicodeoxicólico são características de *L. delbrueckii* UFV H2b20 submetida a estes estresses, em estudo *in vitro*. A análise da morfologia das células por Microscopia de Força Atômica (MFA) mostrou que os estresses ácido e por sais biliares provocaram alterações na morfologia da célula – a superfície da parede se apresentou rugosa com acentuada redução na dimensão correspondente à altura, em todas as condições de estresse testadas. Em conjunto, os resultados demonstram características de respostas fisiológicas de *L. delbrueckii* UFV H2b20 aos estresses ácido e por sais biliares desejáveis e necessárias em bactéria probiótica, ou seja, resistir e sobreviver em condições similares às prevalentes no trato gastrointestinal (TGI) de humanos. Os genes *clpP*, *clpE*, *clpL* e *clpX* de *L. delbrueckii* UFV H2b20, cujos produtos pertencem ao complexo proteolítico Clp apresentaram alta identidade de sequência, variando de 96 a 97 % com as de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842. As árvores filogenéticas reconstruídas por Inferência Bayesiana mostraram os genes *clpP*, *clpL* e *clpE* agrupados com os de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842. As exposições das células aos meios MRS pH 3,5, MRS contendo 0,1 % de sais biliares mistos e a MRS contendo 0,1 % de ácido glicodeoxicólico por 30 e 60 minutos aumentaram a expressão dos quatro genes, enquanto a exposição a ácido taurodeoxicólico aumentou apenas a do gene *clpL*. Considerando o envolvimento dos genes *clpP*, *clpL*, *clpE* e *clpX* nas respostas aos estresses ácido e por sais biliares infere-se que a atividade do complexo proteolítico Clp

pode representar mecanismo de reparo e/ou degradação de proteínas danificadas pelas condições de estresse analisadas neste estudo. Os genes codificadores de ornitina descarboxilase e de permease de aminoácido identificados em *L. delbrueckii* UFV H2b20 agruparam na reconstrução filogenética com os de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842, sendo de 96 a 98 % a identidade das sequências. O aumento da expressão do gene que codifica a ornitina descarboxilase após a exposição das células por 30 e 60 minutos em MRS pH 3,5, meio rico, mostra o envolvimento deste gene na resposta ao estresse ácido em *L. delbrueckii* UFV H2b20 e evidencia que a proteína codificada por esse gene é a envolvida na regulação do pH intracelular. Sugere-se a descarboxilação de aminoácidos como mecanismo de adaptação à condição de acidez do meio. Com o estudo da expressão dos genes *spx*, *dps* e *pox*, todos envolvidos no estresse oxidativo em *L. delbrueckii* H2b20, caracterizou-se base molecular envolvida no fenômeno de proteção cruzada *in vitro* ao constatar-se a sobreposição e a inespecificidade de genes aos estresses investigados. Particularmente, o aumento da expressão do gene *dps* após exposição das células aos meios MRS pH 3,5 e MRS contendo 0,1 % de ácido glicodeoxicólico foi interpretado como mecanismo de proteção do DNA à acidez interna das células. No presente estudo, bases fisiológicas e moleculares que possibilitam a probiose por *L. delbrueckii* UFV H2b20 ficam esclarecidas no que tange à existência de mecanismos para sobrevivência e persistência em condições presentes no TGI de humanos.

## ABSTRACT

FERREIRA, Alessandra Barbosa, D.Sc., Federal University of Viçosa, March, 2011. **Physiological and molecular responses in *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 to acid and bile salts stress.** Adviser: Célia Alencar de Moraes. Co-Advisers: Arnaldo Chaer Borges and Marisa Vieira de Queiroz.

The lactic acid bacteria used as probiotics must resist the acid environment of the stomach as well as bile salts in the intestine. The objective of this work was to study the physiological and morphological responses of *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 to acid and bile salts stress and to identify and accomplish phylogenetic and expression analysis of genes related to these stress. *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 does not grow in MRS broth pH 3.5, however, cells treated in this medium for four hours tolerate acid stress, as demonstrated by survival curves. This bacterium is more tolerant to mixed bile salts and less tolerant to glycodeoxycolic. Analysis of cell morphology by atomic force microscopy (AFM) showed that acid stress and bile salts caused changes in cell morphology - the wall surface became rough and reduced in height, in all stress conditions tested. The results demonstrate that *L. delbrueckii* UFV H2b20 may resist similar conditions prevailing in the gastrointestinal tract of humans. The genes *clpP*, *clpE*, *clpL* and *clpX* of *L. delbrueckii* UFV H2b20, whose products belong to the Clp proteolytic complex showed high sequence identity, ranging from 96 to 97% with those of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842. Phylogenetic trees reconstructed by Bayesian inference showed the genes *clpP*, *clpE* and *clpL* grouped with the genes of *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842. The expression increase of the *clpP*, *clpE*, *clpL* and *clpX* genes in *L. delbrueckii* UFV H2b20 in response to acid and bile salts stress was observed after 30 and 60 minutes. The exposure of cells to MRS pH 3.5, MRS containing 0.1 % mixed mixed bile salts and MRS containing 0.1 % glycodeoxycolic acid for 30 and 60 minutes increased the expression of four genes, while exposure to taurodeoxycolic acid increased the expression of *clpL* alone. The involvement of *clpP*, *clpE*, *clpL* and *clpX* in the responses to acid stress and bile salts showed that the activity of the Clp proteolytic complex may represent the mechanism of repair and/or degradation of proteins damaged by the stress conditions analyzed in this study. The genes encoding ornithine decarboxylase and amino acid permease identified in *L. delbrueckii* UFV H2b20 grouped in phylogenetic

reconstruction with those of *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842, with 96 to 98% identity of sequences. The expression of the gene encoding ornithine decarboxylase increased after exposing the cells for 30 and 60 minutes in MRS pH 3.5, a rich medium, an evidence of the involvement of this gene in acid stress response in *L. delbrueckii* UFV H2b20 and also that the protein encoded by this gene is involved in the regulation of intracellular pH. It is suggested that the decarboxylation of amino acids as a mechanism for adaptation to acid stress. The molecular basis of the cross protection phenomenon was characterized by the expression of *spx*, *dps* and *pox*, all involved in oxidative stress response. There are overlaps and inespecificity in the expression of those genes to stress investigated. The increased in *dps* expression following exposure to pH 3.5 to 0,1 % glycodexycolic acid was interpreted as a DNA protective mechanism to low internal cell acidity. In this study, physiological and molecular basis that enable probiose in *L. delbrueckii* UFV H2b20 are clarified with regard to the existence of mechanisms for survival and persistence under conditions present in the human gut.

## INTRODUÇÃO GERAL

As bactérias do gênero *Lactobacillus* são expostas às condições adversas durante a passagem pelo trato gastrointestinal (TGI), especialmente a acidez do estômago e a presença de sais biliares no intestino. A capacidade de sobrevivência neste ambiente é uma característica de importância em programas de seleção de linhagens com potencial para uso em probióticos.

A exposição de células microbianas às condições de estresse envolve resposta transcricional ampla, com repressão e indução de genes cujos produtos são requeridos para superar os efeitos do estresse. Alguns desses genes parecem ser específicos, enquanto outros são induzidos por vários tipos de estresse e são denominados genes de resposta geral ao estresse. Os relatos sobre respostas de bactérias ao estresse ambiental têm mostrado comportamentos distintos e dependentes do micro-organismo em estudo.

Recentemente, o termo probiogenômica foi proposto para ser usado em estudos que envolvam genomas de bactérias probióticas. A integração da probiogenômica e da genômica funcional irá expandir os conhecimentos sobre os papéis da microbiota probiótica, das interações micro-organismo x micro-organismo e micro-organismo x hospedeiro (VENTURA *et al.*, 2009). Desta forma, os referidos estudos devem resultar em estratégias para melhorar a robustez de linhagens com potencial para uso em aplicação industrial (ZHU *et al.*, 2009).

O sequenciamento de genomas, os estudos de genômica funcional de várias bactérias do ácido láctico, incluindo as do gênero *Lactobacillus* e os avanços nas ferramentas de bioinformática estão fornecendo conhecimento sobre a diversidade e evolução deste grupo, bem como revelando as bases moleculares envolvidas na probiose. Assim, a identificação de genes exclusivos nos probiogenomas e sua verificação funcional são estratégias adotadas e que no futuro podem permitir o uso de sondas específicas para *screening high-throughput* e seleção mais eficiente de probióticos (VENTURA *et al.*, 2009; ZHU *et al.*, 2009).

Assim, diante do exposto e tendo em vista a diversidade dos mecanismos de respostas aos estresses em diferentes espécies, e mesmo entre diferentes linhagens, e o fato de que para exercerem os efeitos benéficos no hospedeiro, os probióticos devem resistir às condições do TGI, objetivou-se com este trabalho, conhecer as respostas fisiológicas e morfológicas de células de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 aos

estresses ácido e por presença de sais biliares, além de identificar e realizar análises filogenética e de expressão de genes possivelmente relacionados a esses estresses.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

VENTURA, M., O'FLAHERTY, S., CLAESSON, M.J., TURRONI, F., KLAENHAMMER, T.R., SINDEREM, D.V., O'TOOLE, P.W. Genome-scale analyses of health promoting bacteria: probiogenomics. **Nature Reviews Microbiology**, 7:63-72, 2009.

ZHU, Y., ZHANG, Y., LI, Y. Understanding the industrial application potential of lactic acid bacteria through genomics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 83:597-610, 2009.

## Capítulo 1 – GENÔMICA DA PROBIOSE EM *Lactobacillus*

### 1. Microbioma Intestinal Humano

O Projeto Microbioma Humano, iniciado em 2007, objetiva caracterizar o microbioma humano utilizando tecnologias *high-throughput*, determinar se existem associações entre as mudanças no microbioma e entre saúde e doença; bem como demonstrar se existem meios para melhorar a saúde pelo monitoramento ou pela manipulação do microbioma humano. O conceito de microbioma humano, sugerido em 2001, refere-se à comunidade ecológica de micro-organismos comensais, de simbióticos e de patogênicos que estão presentes no nosso corpo (LEDERBERG e McCRAY, 2001). Atualmente, o termo microbioma refere-se à coleção completa de genes da microbiota (TURNBAUGH *et al.*, 2007).

A microbiota humana é composta por aproximadamente 100 trilhões de células microbianas, o que representa 10 vezes mais o número total de células humanas (SAVAGE, 1977). A importância desta interação no contexto de uma ampla visão ecológica está no fato da sobrevivência de micro-organismos e de humanos ser interdependente (HOPPER e GORDON, 2001) e como consequência, o conhecimento do potencial metabólico humano requer a caracterização do microbioma. O trato gastrointestinal (TGI) é colonizado ou carrega transitoriamente uma coleção de micro-organismos dinâmica, diversa e complexa em termos taxonômicos (HOPPER *et al.*, 2002). O microbioma intestinal contém aproximadamente 150 vezes mais genes que o genoma humano e concorre para o aumento expressivo do potencial metabólico do organismo humano (QIN *et al.*, 2010).

A microbiota intestinal é de importância crucial para a vida humana, ela atua na proteção do epitélio intestinal (HOPPER e GORDON, 2001), na maturação do sistema imune (MAZMANIAN *et al.*, 2005), no balanço energético do hospedeiro (TURNBAUGH *et al.*, 2006), na degradação de componentes não digeríveis da dieta (FLINT *et al.*, 2008), portanto impacta a fisiologia e a nutrição do hospedeiro (HATTORI e TAYLOR, 2009). Por todas estas razões autores têm considerado os humanos como “super organismo”, cujo metabolismo representa uma mistura de atributos humanos e microbianos (GILL *et al.*, 2006). Além disso, alterações na microbiota estão ligadas a várias doenças, incluindo alergia (MACDONALD *et al.*,

2005), câncer (MCGARR *et al.*, 2005) obesidade (TURNBAUGH e GORDON, 2009) e doença inflamatória intestinal (QIN *et al.*, 2010). Análise do perfil bacteriano revelou diferenças entre a microbiota de indivíduos saudáveis, comparada com a de pacientes com colite ulcerativa e com doença de Crohn's (QIN *et al.*, 2010).

O conhecimento da diversidade da comunidade microbiana intestinal e do potencial genético das populações que a compõem expandiu-se com a aplicação de técnicas independentes de cultivo no estudo da composição do TGI (ZOETENDAL *et al.*, 2006). Com o advento de análise metagenômica está sendo possível caracterizar o microbioma e melhor compreender a interação entre as células do hospedeiro e as da comunidade microbiana residente (HATTORI e TAYLOR, 2009).

Os sequenciamentos *high-throughput*, como o pirosequenciamento e os microarranjos de DNA, como o HITChip (CLAESSON *et al.*, 2009), já estão sendo utilizados na caracterização do microbioma humano (HAMADY e KNIGHT, 2009). As novas ferramentas para análises multivariadas e avanços nas ferramentas de bioinformática são requeridas para integrar o grande volume de informações geradas por essas técnicas e para permitir a inferência de funções de membros de comunidades complexas, como as do TGI (TURNBAUGH e GORDON, 2009). Na atualidade, há consenso sobre a necessidade do conhecimento sobre diversidade, funcionalidade e potencial genético da comunidade microbiana intestinal, para se entender e explorar o impacto da microbiota intestinal na saúde humana (QIN *et al.*, 2010). As tecnologias *high-throughput* e as novas ferramentas computacionais estão revolucionando as análises das comunidades microbianas (HAMADY e KNIGHT, 2009, O'FLAHERTY e KLAENHAMMER, 2011).

A análise metagenômica do intestino revelou que a diversidade da microbiota intestinal foi subestimada pelos estudos que utilizaram técnicas dependentes de cultivo (ECKBURG *et al.*, 2005; RAJILIC-STOJANOVIC *et al.*, 2007). Representantes dos três domínios da vida, Bacteria, Archaea e Eukarya, estão presentes no trato intestinal (ECKBURG *et al.*, 2005). Os domínios Archaea e Eucarya são representados por membros de apenas um filo cada, enquanto XXX filas são do Bacteria, (RAJILIC-STOJANOVIC *et al.*, 2007). Nesse domínio, Firmicutes e Bacteroidetes são os filas com maior número de representantes, são mais abundantes e nos em que a diversidade é maior (ECKBURG *et al.*, 2005; XU *et al.*, 2007; QIN *et al.*, 2010). A análise metagenômica do intestino de 124 indivíduos revelou que mais de 99 % dos genes no TGI são bacterianos (QIN *et al.*, 2010).

As variações na composição da microbiota entre os indivíduos é um fato, porém existe uma estabilidade funcional que permite a microbiota manter a capacidade de realizar as várias reações bioquímicas básicas, incluindo a degradação de carboidratos e a síntese de vitaminas (HOOPER *et al.*, 2002). Há a possibilidade de que todos os humanos compartilhem as mesmas espécies microbianas, mas que a abundância das mesmas seja distinta entre as pessoas e possa afetar o metabolismo e a saúde do indivíduo (HAMADY e KNIGHT, 2009). O metagenoma do intestino humano gerou um catálogo que contém virtualmente todos os genes microbianos prevalentes, forneceu uma ampla visão de funções importantes para a vida bacteriana no intestino, mostrou a complementariedade entre o metagenoma intestinal e o genoma humano e indicou que muitas espécies bacterianas são, de fato, compartilhadas por diferentes indivíduos (QIN *et al.*, 2010).

As relações entre a microbiota intestinal e o hospedeiro são diversas e complexas e a elucidação de como a interação das diferentes espécies contribui para a saúde humana continua como desafio para a ciência. A principal dificuldade é a de correlacionar o *status* saúde do hospedeiro com a presença ou a ausência de certas espécies bacterianas (LEEBER *et al.*, 2008; HAMADY e KNIGHT, 2009). A análise metagenômica de comunidades complexas oferece uma oportunidade para examinar de maneira compreensiva como ecossistemas respondem a perturbações ambientais e, no caso de humanos, como o ecossistema microbiano contribui para a saúde e a doença (GILL *et al.*, 2006; VENTURA *et al.*, 2009; QIN *et al.*, 2010). O conceito “super organismo” representa uma importante mudança de paradigma no entendimento da biologia humana e pode ter impacto expressivo na prevenção e na terapia de doenças no futuro (NICHOLSON, 2006). Atualmente, o microbioma intestinal humano é considerado como uma nova fronteira da biologia humana, e os conhecimentos advindos dessa área estão contribuindo para o delineamento de estratégias inovadoras para manter a saúde humana (HATTORI e TAYLOR, 2009).

As técnicas de caracterização da microbiota intestinal e as de bioinformática, juntamente com as microscópicas e analíticas de alto poder de resolução, hoje disponíveis em laboratórios para estudos avançados das “ômicas” de modo geral, têm possibilitado o avanço no conhecimento da diversidade microbiana e de interações em ambientes complexos, como o do TGI (CLAESSON *et al.*, 2009; QIN *et al.*, 2010). Em resumo, com o estudo do microbioma humano estão sendo demonstrados os mecanismos moleculares relacionados aos efeitos benéficos no hospedeiro e o impacto

desses micro-organismos na saúde e na doença. Entretanto, avanços no conhecimento sobre o microbioma humano e as implicações acerca da complexa interação no TGI continuam demandando altos investimentos na pesquisa.

## 2. O gênero *Lactobacillus*

O gênero *Lactobacillus* pertence ao grupo de Bactérias do Ácido Lático formado por organismos Gram-positivos, de baixo conteúdo G+C, anaeróbios, não formadores de esporos, catalase negativos e tolerantes ao ácido. São encontrados em vários nichos ecológicos como leite, carnes, cereais, plantas e superfícies de mucosa de animais e de humanos. Apresentam metabolismo estritamente fermentativo, convertendo açúcar primariamente em ácido lático (GIRAFFA *et al.*, 2010). A acidificação do meio e os processos enzimáticos que normalmente acompanham o crescimento dessas bactérias contribuem para as características de *flavour*, textura e principalmente de preservação da qualidade microbiológica de muitos alimentos fermentados, como os produtos lácteos (KLAENHAMMER *et al.*, 2005).

Dentre os treze gêneros que compreendem as bactérias do ácido lático, *Lactobacillus* é o maior, com 145 espécies reconhecidas (KLEEREBEZEM e VAUGHAN, 2009). Taxonomicamente, este gênero pertence ao filo Firmicutes, Classe *Bacilli*, ordem *Lactobacillales* e família *Lactobacillaceae*. A análise do genoma completo de várias espécies de *Lactobacillus* mostra a diversidade filogenética, fenotípica e ecológica deste gênero. Além do papel importante na produção e biopreservação de alimentos, algumas são comensais do TGI de humanos e são utilizadas como probióticos, devido aos efeitos promotores de saúde (GOH e KLAENHAMMER, 2009).

A classificação dos *Lactobacillales* permanece não resolvida, especialmente porque a classificação fenotípica, que é tradicionalmente baseada no tipo de fermentação, não corresponde a filogenia baseada no rRNA 16S. A taxonomia de espécies de *Lactobacillus* tem mudado consideravelmente com o aumento do conhecimento da estrutura genômica e da relação filogenética, possibilitado pelo desenvolvimento dos métodos moleculares (FELIS e DELLAGLIO, 2005). A taxonomia polifásica que integra informações fenotípicas, genéticas e filogenéticas é reconhecida pelo *International Committee on Systematic Bacteriology* como ferramenta

para a descrição de espécies e para a revisão da nomenclatura de alguns grupos bacterianos (VANDAMME *et al.*, 1996), como o dos *Lactobacillales* (BERGER *et al.*, 2007).

A primeira análise filogenética, feita em 1991 por Collins e colaboradores, dividiu os *Lactobacillales* em três grupos: *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus casei-Pediococcus* e *Leuconostoc* (FELIS e DELLAGLIO, 2005). SCHLEIFER e LUDWIG (1995) confirmaram essa classificação e o grupo *L. delbrueckii* foi renomeado como *Lactobacillus acidophilus*. Além disso, o grupo *L. casei-Pediococcus* foi dividido em grupo *L. casei*, grupo *Lactobacillus plantarum*, grupo *Lactobacillus reuteri*, grupo *Lactobacillus buchneri* e o grupo *Lactobacillus salivarius*. Atualmente, a estrutura filogenética do gênero *Lactobacillus* também inclui o grupo *Lactobacillus perolens*, o grupo *Pediococcus* e o grupo *Lactobacillus vitulinus-cateniformis* (GIRAFFA *et al.*, 2010).

A principal discrepância na taxonomia do gênero *Lactobacillus* é a não correlação entre a análise filogenética e as propriedades metabólicas. De acordo com as características metabólicas, este gênero pode ser dividido em três: os homofermentativos obrigatórios, que são capazes de fermentar hexose pela via Embden-Meyhoif-Parnas (EMP) quase exclusivamente a ácido láctico, enquanto pentoses e gluconato não são fermentados; os heterofermentativos facultativos que degradam hexose a ácido láctico pela via EMP e são capazes de degradar pentoses e gluconato porque possuem aldolase e fosfoacetolase e os heterofermentativos obrigatórios que degradam hexose pela via das pentoses fosfato produzindo lactato, etanol ou ácido acético e CO<sub>2</sub>, além das pentoses que são fermentadas por essa via (FELIS e DELLAGLIO, 2005). Outra característica interessante do gênero *Lactobacillus* é a ampla faixa do conteúdo G+C do genoma, que varia de 32 a 54 % (GOH e KLAENHAMMER, 2009). *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, bactéria adaptada ao leite, possui grande diferença no conteúdo GC (49 %) em relação à espécie muito relacionada *L. acidophilus* (34,7 %), habitante do TGI de humanos (VAN DE GUCHTE *et al.*, 2006).

Atualmente, há 30 genomas de *Lactobacillus* sequenciados, pertencentes a 15 espécies ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes)). Os genomas de *Lactobacillus* são relativamente pequenos, variando de 1,8 a 3,3 Mb. O número de genes varia de 1.700 a 3.200, indicando eventos de perda, aquisição e duplicação de genes durante a evolução. Análise genômica confirmou que a maioria das espécies é altamente auxotrófica e que

muitos genes biossintéticos foram perdidos durante a evolução de *Lactobacillales*, entretanto as perdas foram compensadas pela presença de genes que codificam transportadores de aminoácidos e peptidases, necessários para a utilização de fontes de nitrogênio exógenas (MAKAROVA *et al.*, 2006; GOH e KLAENHAMMER, 2009). Os transportadores correspondem de 13 a 18 % do genoma de bactérias do ácido láctico, um número maior do que o encontrado em outras bactérias (SCHROETER e KLAENHAMMER, 2008).

A análise de genomas indicou que a adaptação em ambiente rico em nutrientes foi a principal força que fixou as duplicações, as perdas e as aquisições durante a evolução dos *Lactobacillales* (SCHROETER e KLAENHAMMER, 2009). Outra evidência da recente redução do genoma é a presença de pseudogenes, frequentemente em maior número comparado com outros grupos bacterianos. Esta característica é particularmente comum em organismos que estão associados a ambientes ricos em nutrientes, tais como: *L. delbruekii* ssp *bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *L. casei*, *L. lactis*, *Streptococcus thermophilus* e *Oenococcus oeni*. Especialmente, *L. bulgaricus* e *S. thermophilus* possuem muitos pseudogenes, 270 e 182, respectivamente, evidenciando a recente especialização ao ambiente do leite, rico em nutrientes (MAKAROVA *et al.*, 2006; VAN DE GUCHTE *et al.*, 2006).

Dentre as bactérias do gênero *Lactobacillus*, *L. plantarum* é a espécie mais versátil e apresenta o maior genoma, formado por 3,3 Mb, que codifica um grande número de proteínas regulatórias e de proteínas envolvidas no transporte e na utilização de carboidratos que permite a adaptação em diversos nichos ambientais (KLEEREBEZEM *et al.*, 2003). Por outro lado, *Lactobacillus johnsonii* tem menor número de genes envolvidos no transporte e no catabolismo de carboidratos e de genes regulatórios, refletindo a adaptação em um nicho mais constante em nutrientes que é o TGI (PRIDMORE *et al.*, 2004).

O sequenciamento de genomas de *Lactobacillus* associado aos estudos de genômica funcional fornecerá melhor entendimento dos processos metabólicos, das capacidades de bioprocessamento e dos papéis potenciais na saúde e bem-estar (CLAESSON *et al.*, 2007), bem como determinar as bases genéticas para a classificação taxonômica desse gênero (SINGH *et al.*, 2009).

### 3. Genômica da probiose

Probióticos são micro-organismos vivos que quando ingeridos em quantidades adequadas exercem efeitos benéficos ao hospedeiro (REID *et al.*, 2003) e, para serem considerados como tais, devem ser isolados, purificados e os efeitos benéficos cientificamente comprovados (OUWEHAND *et al.*, 2002; KLEEREBEZEM e VAUGHAN, 2009). *Lactobacillus acidophilus* NCFM, *Lactobacillus casei* Shirota, *Lactobacillus gasseri* ATCC 33323, *Lactobacillus johnsonii* NCC 533, *Lactobacillus salivarius* UCC118 são alguns exemplos de probióticos utilizados em humano (GOH e KLAENHAMMER, 2009).

O conceito de consumir micro-organismos viáveis para melhorar a saúde foi inicialmente introduzido em 1908 por Elie Metchnikoff, que propôs que o consumo de leite fermentado contendo *Lactobacillus* promove a saúde e a longevidade (GOH e KLAENHAMMER, 2009). Diversos estudos suportam o papel dessas bactérias em promover a saúde e o bem-estar, entretanto, os mecanismos moleculares pelos quais afetam benéficamente a saúde permanecem desconhecidos. Esses efeitos parecem envolver interações micro-organismo x micro-organismo e micro-organismo x hospedeiro. As interações entre os micro-organismos são baseadas principalmente na inibição de patógenos e as interações micro-organismo x hospedeiro são baseadas na proteção do epitélio intestinal e na modulação do sistema imune (MARCO *et al.*, 2006; KLEEREBEZEM e VAUGHAN, 2009; VENTURA *et al.*, 2009).

A inibição de patógenos no TGI pode envolver vários mecanismos como a produção de compostos antimicrobianos e a competição por sítios de adesão específicos e por nutrientes. O reforço das junções epiteliais, a secreção de mucinas e a modulação da apoptose de células epiteliais estão envolvidos na proteção do epitélio intestinal (KLEEREZEBEM e VAUGHAN, 2009). Diversos estudos mostraram que os probióticos podem modular o sistema imune pela ativação de macrófagos, pela regulação da expressão de citocinas, pelo aumento da atividade das células fagocíticas e dos níveis de imunoglobulinas. Entretanto, os mecanismos pelos quais os probióticos funcionam como imunomoduladores ainda não foram totalmente caracterizados, mas sabe-se que são específicos da linhagem (KLAENHAMMER *et al.*, 2005; KLEEREBEZEM e VAUGHAN, 2009).

As bactérias utilizadas como probióticos devem apresentar as seguintes características: tolerância à acidez do estômago e à presença de sais biliares no intestino, aderência à mucosa intestinal, persistência no TGI e características tecnológicas como estabilidade na produção e na estocagem e boas propriedades sensoriais (GIRAFFA *et al.*, 2010). Existem duas categorias principais de fatores que contribuem para a função ótima de *Lactobacillus* probióticos: fatores que permitem a adaptação ao TGI do hospedeiro (fatores de adaptação) e fatores que promovem os efeitos probióticos (fatores probióticos). Os fatores de adaptação referem-se aos que contribuem indiretamente para os efeitos probióticos, como a resistência aos estresses ambientais, o metabolismo adaptado ao ambiente do hospedeiro e a aderência à mucosa intestinal (LEBEER *et al.*, 2008).

As análises dos genomas de *L. acidophilus* (ALTERMANN *et al.*, 2005), *L. casei* (MAKAROVA *et al.*, 2006), *L. johnsonii* (PRIDMORE *et al.*, 2004), *L. plantarum* (KLEEREBEZEN *et al.*, 2003) e *L. salivarius* (PFEILER e KLAENHAMMER, 2007) permitiram a identificação de genes que possibilitam a probiose, como os envolvidos na tolerância aos estresses ácido e por presença de sais biliares, na aderência à mucosa intestinal e na utilização de carboidratos (LEBEER *et al.*, 2008).

Análises de genômica comparativa revelaram sequências comuns e únicas que podem indicar a evolução dessas linhagens, bem como a base genética de características particulares, incluindo diferenças entre as linhagens que habitam o TGI e as utilizadas na produção industrial (LEBEER *et al.*, 2008). A análise *in silico* das sequências do genoma de *L. helveticum* DPC457, isolado de queijo, reflete diferenças consideráveis com o de *L. acidophilus* NCFM, linhagem probiótica. *Lactobacillus helveticum* DPC457 não possui genes que codificam proteínas envolvidas na ligação à mucosa intestinal, importantes para a adaptação no intestino (LEBEER *et al.*, 2008).

Recentemente, o termo probiogenômica foi proposto para ser usado em estudos que envolvam genomas de bactérias probióticas. A integração da probiogenômica e da genômica funcional irá expandir os conhecimentos sobre os papéis da microbiota probiótica, das interações micro-organismo x micro-organismo e micro-organismo x hospedeiro (VENTURA *et al.*, 2009). Desta forma, os referidos estudos devem resultar em estratégias para melhorar a robustez de linhagens com potencial para uso em aplicação industrial (ZHU *et al.*, 2009).

O sequenciamento de genomas, os estudos de genômica funcional de várias bactérias do ácido láctico, incluindo as do gênero *Lactobacillus* e os avanços nas ferramentas de bioinformática estão fornecendo conhecimento sobre a diversidade e evolução deste grupo, bem como revelando as bases moleculares envolvidas na probiose. Assim, a identificação de genes exclusivos nos probiogenomas e sua verificação funcional são estratégias adotadas e que no futuro podem permitir o uso de sondas específicas para *screening high-throughput* e seleção mais eficiente de probióticos (VENTURA *et al.*, 2009; ZHU *et al.*, 2009).

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTERMANN, E., RUSSELL, W. M., AZCARATE-PERIL, M. A., BARRANGOU, R., BUCK, B. L., McAULIFFE, O., DOBSON, A., CALLANAN, M., LICK, S., HAMRICK, A., CANO, R., KLAENHAMMER, T. R. Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. **PNAS**, 102:3906-3912, 2005.

BERGER, B., PRIDMOREE, R. D., BARREO, C., DELMAS-JULIEN, F., SCHREIDER, K., ARIGONI, F., BRUSSOW, H. Similarity and differences in the *Lactobacillus acidophilus* group identified by polyphasic analysis and comparative genomics. **Journal of Bacteriology**, 189:1311-1321, 2007.

CLAESSON, M.J., SINDEREN, D.V., O'TOOLE, P.W. The genus *Lactobacillus* – a genomic basis for understanding its diversity. **FEMS Microbiology Letters**, 269:22-28, 2007.

CLAESSON, M.J., O'SULLIVAN, O., WANG, Q., NIKKILA, J., MARCHESI, J. R., SMIDT, H., DE VOS, W. M., ROSS, R. P., O'TOOLE, P.W. Comparative Analysis of Pirosequencing and a Phylogenetic Microarray for Exploring Microbial Community Structures in the Human Distal Intestine. **PLOS**, 4:1-15, 2009.

ECKBURG, P.B., BIK, E.M., BERNSTEIN, C.N., PURDOM, E., DETHLESFSEN, L., *et al.* Diversity of the human intestinal microbial flora. **Science**, 308:1635-1638, 2005.

FELIS, G. E., DELLAGIO, F. Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. **Current Issues Intestinal Microbiology**, 8:44-61, 2005.

FLINT, H. J., BAYER, E.A., RINCON, M.T., LAMED, R., WHITE, B.A. Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. **Nature Reviews Microbiology** 6:121-131, 2008.

GILL, S.R., POP, M., DEBOY, R.T., ECKBURG, P.B., TURNBAUGH, P.J., SAMUEL, B.S., GORDON, J.I., RELMAN, D.A., FRASER-LIGGETT, C.M., NELSON, K.E. Metagenomic Analysis of the Human Distal Gut Microbiome. **Science**, 312:1355-1359, 2006.

GIRAFFA, G., CHANISHVILLI, N., WIDYASTUTI, Y. Importance of Lactobacilli in food and feed biotechnology. **Research in Microbiology**, 6:1-8, 2010.

GOH, Y. J., KLAENHAMMER, T. R. Genomic features of *Lactobacillus* species. **Frontiers in Bioscience**, 14:1362-1386, 2009.

HAMADY, M., KNIGHT, R. Microbial community profiling for human microbiome projects: Tools, techniques e challenges. **Genome Research**, 19:1141-1152, 2009.

HATTORI, M., TAYLOR, T. D. The Human Intestinal Microbiome: A New Frontier of Human Biology. **DNA Research**, 16:1-12, 2009.

- HOOPER, L. V., GORDON, J. I. Commensal host-bacterial relationships in the gut. **Science**, 292:1115-1118, 2001.
- HOOPER, L. V., MIDTVEDT, T., AND GORDON, J. I., How host-microbial interactions shape the environment of mammalian intestine. **Annual Review of Nutrition**, 22:283-293, 2002.
- KLAENHAMMER, T.R., BARRANGOU, R., BUCK, B.L., AZCARATE-PERIL, M.A., ALTERMANN, E. Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. **FEMS Microbiology Letters**, 29:393-409, 2005.
- KLEEREBEZEM, M.; BOEKHORST, J.; VAN KRANENBURG, R.; MOLENAAR, D.; KUIPERS, O.P.; LEER, R. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. **PNAS**, 100:1990-1995, 2003.
- KLEEREBEZEM, M., VAUGHAN, E.E. Probiotic and Gut Lactobacilli and Bifidobacteria: Molecular Approaches to study diversity and activity. **Annual Review Microbiology** 63:269-290, 2009.
- LEEBER, S., VANDERLEYDEN, J., DE KEERSMAECKER, S. C. J. Genes and Molecules of Lactobacilli Supporting Probiotic Action. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 72:728-764, 2008.
- LEDERBERG, J., McCRAY, A. T. 'Ome Sweet' Omics – a genealogical treasury of words. **Scientist**, 15:8, 2001.
- MACDONALD, T. T. ET AL. Immunity, inflammation and allergy in the gut. **Science**, 307:1920-1925, 2005.
- MCGARR, S. E. ET AL. Diet, anaerobic bacterial metabolism and colon cancer: a review of the literature. **Journal of Clinical Gastroenterology**, 39:98-109, 2005.
- MAKAROVA, K., SLESAREV, A., WOLF, Y., SOROKIN, A., MIRKIN, B. , KOONIN, E., PAVLOV, A., PAVLOVA, N., KARAMYCHEV, V., POLOUCHINE, N., SHAKHOVA, V., GRIGORIEV, I., *et al.* Comparative Genomics of the Lactic Acid Bacteria. **PNAS**, 103:15611-15616, 2006.
- MARCO, M.L., PAVAN, S., KLEEREBEZEM, M. Towards understanding molecular modes of probiotic action. **Current Opinion in Biotechnology**, 17:204-210, 2006.
- MAZMANIAN, S.K., LIU, C. H., TZIANABOS, A.O., KASPER, D. L. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. **Cell**, 122:107-118, 2005.
- NICHOLSON, J. K. Global systems biology, personalized medicine and molecular epidemiology. **Molecular System Biology**, 2:52, 2006.
- O'FLAHERTY., KLAENHAMMER, T. R. The impact of Omic Technologies on the Study of Food Microbes. **Annual Review of Food Science Technology**, 2:353-71, 2011.

- OUWEHAND, A.C., SALMINEN, S., ISOLAURI, E. Probiotics: an overview of beneficial effects. **Antonie van Leeuwenhoek**, 82:279-289, 2002.
- PFEILER, E. A., KLAENHAMMER, T. R. The genomics of lactic acid bacteria. **Trends in Microbiology – Review**, 15:546-553, 2007.
- PRIDMORE, R. D., BERGER, B., DESIERE, F., VILANOVA, D., BARRETO, C., PITTET, A.C., ZWAHLEN, M., ROUVET, M., ALTERMAN, E., BARRANGOU, R., MOLLET, B., MERCENIER, A., KLAENHAMMER, T., ARIGONI, F., SCHELL, M.A. The genome sequence of the probiotic intestinal bacterium *Lactobacillus johnsonii* NCC 533. **PNAS**, 101:2512-2517, 2004.
- QIN, J; LI, R; RAES, J; ARUMUGAM, M; BURGDORF, K.S; MANICHANH, C; NIELSEN, T; *et al.* A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. **Nature**, 4:59-67, 2010.
- RAJILI-STOJANOVIC, M. H. S. W. M. D. V., Diversity of the human gastrointestinal tract microbiota revisited. **Environmental Microbiology**, 9:2125-2136, 2007.
- REID, G., SANDERS., GASKINS. H. R., GIBSON, G. R., MERCENIER, A., RASTALL, R., ROBERFROID, M., ROWLAND, I., CHERBUT, C., KLAENHAMMER, T. R. New scientific paradigms for probiotics and prebiotics. **Journal Clinical Gastroenterology**, 37:105-118, 2003.
- SAVAGE, D.C. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. **Annual Review Microbiology**, 31:107-133, 1977.
- SINGH, S., GOSWAMI, P., SINGH, R., HELLER, K.J. Application of molecular identification tools for *Lactobacillus*, with a focus on discrimination between closely related species: A review. **Food Science and Technology**, 42:448-457, 2009.
- SCHLEIFER, K.H., LUDWIG, W. Phylogeny of the genus *Lactobacillus* and related genera. **Systematic Applied Microbiology**, 14:461-467, 1995.
- SCHROETER, J., KLAENHAMMER, T. Genomics of lactic acid bacteria. Minireview **FEMS Microbiology Letters**, 292:1-6, 2009.
- TURNBAUGH, P.J., LEY, R.E., MAHOWALD, M. A., MAGRINI, V., MARDIS, E.R., GORDON, J.I. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. **Nature**, 44:1027-1031, 2006.
- TURNBAUGH, P. J., LEY, R. E., HAMADY, M., FRASER-LIGGETT, C. M., KNIGHT, R., GORDON, J. L. The human microbiome project. **Nature**, 449:804-810, 2007.
- TURNBAUGH, P.J., GORDON, J.I. The core gut microbiome, energy balance and obesity. **Journal of Physiology**, 587:4153-4158, 2009.

VANDAMME, P., POT, B., GILLIS, M., DE VOS, P., KERSTERS, K., SWINGS, J. Polypahsic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematic. **Microbiology Review**, 60:407-438, 1996.

VAN DE GUCHTE, M., PENAUD, S., GRIMALDI, C., BARBE, V., BRYSON, K., NICOLAS, P., ROBERT, C., *et al.* The complete genome sequence of *Lactobacillus bulgaricus* reveals extensive and ongoing reductive evolution. **PNAS**, 103:9275-9279, 2006.

VENTURA, M., O'FLAHERTY, S., CLAESSON, M.J., TURRONI, F., KLAENHAMMER, T.R., SINDEREM, D.V., O'TOOLE, P.W. Genome-scale analyses of health promoting bacteria: probiogenomics. **Nature Reviews Microbiology**, 7:63-72, 2009.

XU, J. *et al.* Evolution of symbiotic bacteria in the distal human intestine. **PLOS Biology**, 2006.

5:1574-1586, 2007.

ZOETENDAL, E. G., VAUGHAN, EL., DE VOS, W. M. A microbial world within us. **Molecular Microbiology**, 59:1639-1650, ZHU, Y., ZHANG, Y., LI, Y. Understanding the industrial application potential of lactic acid bacteria through genomics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 83:597-610, 2009.

**Capítulo 2 - CRESCIMENTO, SOBREVIVÊNCIA E ANÁLISE  
MORFOLÓGICA DE CÉLULAS DE *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20  
SUBMETIDAS AOS ESTRESSES ÁCIDO E POR SAIS BILIARES**

## **CRESCIMENTO, SOBREVIVÊNCIA E ANÁLISE MORFOLÓGICA DE CÉLULAS DE *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 SUBMETIDAS AOS ESTRESSES ÁCIDO E POR SAIS BILIARES**

### **RESUMO**

As bactérias do ácido láctico utilizadas como probióticos por humanos devem resistir à acidez própria do estômago e à presença de sais biliares no intestino. Desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar o crescimento, a sobrevivência e a morfologia de células de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 em meio de cultura MRS pH 3,5, e a distintas concentrações de sais biliares mistos e dos ácidos taurodeoxicólico e glicodeoxicólico. *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 não cresce em meio MRS pH 3,5, entretanto, após quatro horas de exposição a essa condição ocorreu redução de aproximadamente um ciclo logarítmico na curva de sobrevivência, indicando a tolerância ao estresse ácido. A bactéria apresentou maior tolerância aos sais biliares mistos e menor, nas condições testadas, ao ácido glicodeoxicólico. Em concentrações de 0,05 % e 0,1 % de sais biliares mistos no meio de cultivo não ocorreu alteração do crescimento de *L. delbrueckii* UFV H2b20 no período experimental, quando comparado ao controle. Entretanto, nas mesmas concentrações de ácido glicodeoxicólico, *L. delbrueckii* UFV H2b20 não apresentou crescimento, mas após quatro horas de exposição a 0,05 % deste ácido conjugado, ocorreu redução correspondente a aproximadamente um ciclo logarítmico em relação ao tratamento controle. A análise da morfologia das células por Microscopia de Força Atômica (MFA) mostrou que os estresses ácido e por sais biliares provocaram alterações na morfologia da célula – a superfície da parede se apresentou rugosa com acentuada redução na dimensão correspondente à altura, em todas as condições de estresse testadas. *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 não apresentou atividade de hidrolase de sais biliares (Bsh). Assim, a tolerância aos sais biliares verificada neste estudo foi atribuída a mecanismo ainda não identificado. Em conjunto, os resultados demonstraram que *L. delbrueckii* UFV H2b20 tolera condições similares às prevalentes no TGI de humanos, no que se refere à acidez no estômago e à presença de sais biliares no intestino, característica necessária a toda cultura probiótica.

Palavras-chave: *Lactobacillus*, estresse ácido, estresse por presença de sais biliares, MFA

## 1. INTRODUÇÃO

Algumas bactérias do ácido láctico são componentes do trato gastrointestinal (TGI) de humanos e são utilizadas como probióticos, ou seja, são micro-organismos vivos que quando ingeridos em quantidades adequadas exercem efeitos benéficos ao organismo do hospedeiro (REID *et al.*, 2003; GOH e KLAENHAMMER, 2009). *Lactobacillus* probióticos são expostos às condições adversas durante a passagem pelo TGI, especialmente a acidez do estômago e a presença de sais biliares no intestino, sendo o crescimento e a sobrevivência dependentes da capacidade da bactéria de acionar com rapidez os seus mecanismos sensores e de respostas adaptativas às condições existentes nos compartimentos do TGI pelos quais transitam (GOH e KLAENHAMMER, 2009; SERRAZANETTI *et al.*, 2009).

O tempo de trânsito dos probióticos através do TGI é variável e as células veiculadas em alimentos são submetidas a condições que causam estresse. Após a mastigação, a primeira barreira é a acidez do estômago. Os humanos secretam aproximadamente 2,5 litros de suco gástrico por dia e durante o jejum o pH no estômago corresponde a 1,5, valor que aumenta para 3 a 5 após a ingestão do alimento (VAN DE GUCHTE *et al.*, 2002; LEBEER *et al.*, 2008). Nas células submetidas a estas condições, a acidificação intracelular afeta o  $\Delta$ pH transmembrana que contribui para a força próton-motora, utilizada como fonte de energia pela célula. A acidificação interna também reduz a atividade de enzimas sensíveis ao ácido, danifica DNA, RNA e proteínas (VAN DE GUCHTE *et al.*, 2002; LEBEER *et al.*, 2008).

Micro-organismos fermentativos, como as espécies de *Lactobacillus*, produzem ácidos orgânicos como produto final do metabolismo de carboidratos e podem tolerar valores de pH menores, comparado a outras bactérias (COTTER e HILL, 2003). Em bactérias do ácido láctico, a tolerância ao ácido aumenta em pelo menos dois estádios fisiológicos distintos: durante o crescimento logarítmico, no qual uma resposta adaptativa pode ser induzida pela exposição das células ao ácido não letal e, após a entrada na fase estacionária, na qual a tolerância ao ácido aumenta como resultado da indução de uma resposta geral ao estresse (VAN DE GUCHTE *et al.*, 2002).

A secreção diária pelo fígado de um litro de bile no intestino representa outro desafio para a bactéria que alcança esse ambiente. A bile tem papel principal na emulsificação e na solubilização de lipídeos da dieta. Os sais biliares, um dos seus principais componentes, consistem de uma estrutura em anel derivada do colesterol,

conjugados com resíduos de glicina ou de taurina. O período de residência das células no intestino delgado é estimado em aproximadamente três a quatro horas e a concentração média de sais biliares é de 0,1 % (BEGLEY *et al.*, 2005), podendo alcançar 0,5 % (PFEILER *et al.*, 2007).

Os sais biliares são moléculas anfipáticas, com atividade antimicrobiana potente, capazes de causar danos às membranas celulares, ao DNA, às proteínas e, podem também provocar a acidificação intracelular (VAN DE GUCHTE *et al.*, 2002; BEGLEY *et al.*, 2005). As formas não dissociadas de sais biliares podem atravessar a membrana plasmática, alcançar o citoplasma e danificar proteínas e DNA (BEGLEY *et al.*, 2005). Assim, a capacidade de tolerar os sais biliares é importante para a sobrevivência e a funcionalidade de culturas probióticas (WHITEHEAD *et al.*, 2008).

Os mecanismos envolvidos na tolerância de bactérias Gram-positivas aos sais biliares são pouco conhecidos (WHITEHEAD *et al.*, 2008), entretanto em alguns casos é relacionada a proteínas que modificam os sais biliares, como as hidrolases de sais biliares (Bsh). Essas enzimas hidrolisam a ligação amida e liberam o resíduo de glicina ou de taurina do núcleo esteróide (BEGLEY *et al.*, 2006). A atividade de Bsh é encontrada em organismos isolados do TGI de mamíferos, porém ausente em isolados de ambientes que não contêm sais biliares (BEGLEY *et al.*, 2006; GOH e KLAENHAMMER, 2009). Alguns estudos associaram o consumo de linhagens produtoras de Bsh com a redução nos níveis de colesterol sérico, mas efeitos negativos como a alteração da absorção de lipídeos, a formação de litíase biliar e o risco aumentado de câncer de cólon, já foram descritos (BEGLEY *et al.*, 2006). Assim, estudos devem ser realizados para verificar as implicações de Bsh na saúde humana e determinar se a atividade desta enzima é uma propriedade desejável ou indesejável nas linhagens probióticas.

Microscopia de Força Atômica (MFA) é uma técnica particularmente adequada para fornecer informações detalhadas de estruturas em alto espectro de resolução, e em adição, permite imagens de amostras biológicas em seu estado nativo (SCHAER-ZAMMARETTI e UBBINK, 2003).

O *L. delbrueckii* UFV H2b20 apresenta características fisiológicas de interesse tecnológico e funcional. A sua utilização em alimentos probióticos reforça a necessidade do entendimento da resposta fisiológica às condições presentes no TGI, pois deve sobreviver à passagem pelo estômago e intestino e desempenhar funções específicas em condições desfavoráveis. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o

crescimento, a sobrevivência e a morfologia de células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 expostas aos estresses ácido e por presença de sais biliares mistos e dos ácidos conjugados, taurodeoxicólico e glicodeoxicólico. Adicionalmente, a atividade da enzima Bsh foi testada.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Micro-organismo e padronização da cultura**

Culturas estoque de *L. delbrueckii* UFV H2b20, isolado a partir de material fecal de crianças recém-nascidas (SANTOS, 1984) foram preparadas, congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -80 °C em caldo MRS, contendo 20 % de glicerol. As células foram reativadas em leite desnatado reconstituído (LDR) em água para concentração final de 10 % (p/v), e inoculadas em 5 mL de meio MRS contendo 2 % de glicose. Após o crescimento, a suspensão de células foi centrifugada a 7000 g, a 4°C, por 10 minutos e a massa celular ressuspendida em caldo MRS seguindo-se a padronização da densidade óptica (D.O.) para 0,6 em espectrofotômetro Spectronic 20D, em comprimento de onda de 600 nm.

### **2.2. Crescimento de *L. delbrueckii* UFV H2b20 exposto aos estresses ácido e por sais biliares**

Alíquotas da cultura padronizada foram inoculadas em 5 mL dos seguintes meios de cultura: MRS pH 6,7 (controle); MRS pH 3,5; MRS contendo 0,05 %, 0,1 % e 0,5 % (p/v) de sais biliares mistos (Himedia); MRS contendo 0,05 %, 0,1 % e 0,5 % (p/v) de ácido taurodeoxicólico (Sigma) e MRS contendo 0,05 %, 0,1 % e 0,5 % (p/v) de ácido glicodeoxicólico (Sigma), até se obter D.O.<sub>600nm</sub> de 0,05. O crescimento de *L. delbrueckii* UFV H2b20 exposto a essas condições foi monitorado por medidas de D.O.<sub>600nm</sub> e as médias das triplicatas foram utilizadas para construir as curvas de crescimento no período experimental. Os resultados foram apresentados como D.O.<sub>600nm</sub> em função do tempo.

### **2.3. Sobrevivência de *L. delbrueckii* UFV H2b20 exposto aos estresses ácido e por sais biliares**

Culturas padronizadas foram centrifugadas e os sedimentos ressuspendidos nos seguintes meios de cultura: MRS pH 6,7 (controle); MRS pH 3,5; MRS contendo 0,05

%, 0,1 % e 0,5 % (p/v) de sais biliares mistos (Himedia); MRS contendo 0,05 %, 0,1 % e 0,5 % (p/v) de ácido taurodeoxicólico (Sigma) e MRS contendo 0,05 %, 0,1 % e 0,5 % (p/v) de ácido glicodeoxicólico (Sigma), até se obter uma D.O.<sub>600nm</sub> de 0,6. Aliquotas da cultura foram coletadas a intervalos de tempo definidos, ou seja, 0, 30, 60, 120, 180 e 240 minutos, diluídas em solução salina 0,85 %, e 20 µL utilizados para a contagem de células na suspensão em ágar MRS, pelo método de microgotas (APHA, 2001). Após 24 horas de incubação a 37 °C, as colônias foram contadas e o resultado expresso em UFC mL<sup>-1</sup>. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

#### **2.4. Detecção da atividade de Hidrolase de sais biliares (Bsh)**

A atividade de Bsh foi testada utilizando-se o ensaio de sais biliares em placa (DASHKEVICZ e FEIGHNER, 1989). Aliquotas de 100 µL da suspensão de células padronizadas de *L. delbrueckii* UFV H2b20 foram transferidas e espalhadas em placas contendo ágar MRS correspondente aos tratamentos: MRS contendo 0,05 % e 0,1 % (p/v) de ácido taurodeoxicólico (Sigma) e MRS contendo 0,05 % e 0,1 % (p/v) de ácido glicodeoxicólico (Sigma). As placas foram incubadas por 48 horas a 37 °C seguindo-se a avaliação da presença de colônias brancas opacas, resultado da precipitação das formas desconjugadas dos sais biliares, como critério para identificar a atividade da enzima. *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 foi utilizado como controle positivo e *Lactococcus lactis* ATCC 12115, como negativo.

#### **2.5. Análise morfológica das células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 expostas a condições de estresse por Microscopia de Força Atômica (MFA)**

O efeito dos estresses ácido e por sais biliares sobre a morfologia das células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 foi avaliado por MFA, utilizando-se o microscópio de força atômica (NT-MDT, Ntegra Prima, Rússia) no Departamento de Física da Universidade Federal de Viçosa. Culturas padronizadas foram centrifugadas e os sedimentos ressuspensos nos seguintes meios de cultura: MRS pH 6,7 (controle); MRS pH 3,5; MRS contendo 0,5 % (p/v) de sais biliares mistos (Himedia); MRS contendo 0,5 % de ácido taurodeoxicólico (Sigma), até se obter D.O. de 0,6. As células foram mantidas por 4 horas a 37 °C. Após esse tempo, a suspensão de células de cada tratamento foi centrifugada e lavada por três vezes com tampão PBS (SAMBROOK *et al.*, 1989), sendo ressuspensas em 1 mL do mesmo tampão para a análise no MFA. As células foram espalhadas em lâminas de vidro (1cmxcm) com a utilização de alça de repicagem

e levadas ao MFA para a determinação das medidas de topografia das células, realizadas pelo modo de contato intermitente para minimizar o risco de deformação e permitir uma maior resolução lateral. Foram feitas medições em duas escalas: 3,0  $\mu\text{m}$  e 20  $\mu\text{m}$ .

### 3. RESULTADOS

*Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 não cresce em caldo MRS pH 3,5 (Figura 1), entretanto, após quatro horas de exposição a esta condição, ocorreu redução correspondente a aproximadamente um ciclo logarítmico (Figura 2). As figuras da análise da morfologia das células em Microscopia de Força Atômica (MFA) com varredura de 3  $\mu\text{m}$  mostram que as células mantidas em meio MRS pH 6,7 (tratamento controle) por quatro horas apresentaram superfície lisa e uniforme (Figuras 3A e 3B). Diferentemente, as expostas ao meio MRS pH 3,5, apresentaram superfície rugosa e uma redução na dimensão correspondente à altura de 500 nm (tratamento controle) para aproximadamente 200 nm (Figuras 3B e 3D). Quando utilizada a varredura de 20  $\mu\text{m}$  foi possível observar dois tipos de células morfologicamente distintas (Figuras 3E e 3F), uma célula que aparentemente não foi afetada pela acidez do meio (Figura 3E – parte inferior), e a outra em que se observa uma redução acentuada na altura da célula (Figura 3F).

O crescimento de *L. delbrueckii* UFV H2b20 em MRS contendo 0,05 % e 0,1% de sais biliares mistos foi similar ao do tratamento controle (Figura 4). Entretanto, após quatro horas de exposição das células ao meio MRS acrescido de 0,5% de sais biliares mistos ocorreu redução de aproximadamente um ciclo logarítmico (Figura 5). A imagem da topografia das células, utilizando varredura de 3  $\mu\text{m}$  no MFA, mostra células com superfície rugosa após quatro horas de exposição a MRS contendo 0,5 % de sais biliares mistos. Foi observado também uma redução na altura das células, 250 nm (Figura 6D), e também perda da integridade da parede celular, com possível extravasamento do material intracelular (Figura 6C e 6D).

Os efeitos do ácido taurodeoxicólico em meio MRS sobre o crescimento (Figura 7) e a sobrevivência (Figura 8) de *L. delbrueckii* UFV H2b20 demonstram maior inibição do taurodeoxicólico em relação aos sais biliares mistos. A bactéria não cresceu em MRS contendo 0,5 % deste sal conjugado (Figura 7). Nessa concentração, ocorreu uma redução inicial de aproximadamente dois ciclos logarítmicos na curva de sobrevivência, a qual se manteve constante até a quarta hora (Figura 8). Pela análise

morfológica das células em MFA é possível verificar que a exposição de *L. delbrueckii* UFV H2b20 a 0,5 % de taurodeoxicólico, por quatro horas, provocou alterações na parede celular, com a presença de marcas de deposição de material extracelular (Figura 6E e 6F). Além disso, a altura das células mostrou-se reduzida para aproximadamente 200 nm (Figura 6F).

O efeito inibitório do ácido glicodeoxicólico é mais acentuado sobre o crescimento de *L. delbrueckii* UFV H2b20 em meio MRS (Figura 9) quando comparado ao de taurodeoxicólico (Figuras 7); as células não cresceram no meio acrescido da menor concentração de glicodeoxicólico utilizada neste estudo, 0,05 % (Figura 9). Após quatro horas de exposição a 0,05 % de glicodeoxicólico ocorreu redução de aproximadamente um ciclo logarítmico, enquanto que em 0,1 %, após o mesmo período de tempo, a contagem em placa foi de aproximadamente  $10^3$  UFC mL<sup>-1</sup>. Ausência de colônias de *L. delbrueckii* UFV H2b20 foi observada no tratamento MRS contendo 0,5 % de glicodeoxicólico (Figura 10).

*Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 não apresentou atividade de Bsh após exposição por 48 horas aos meios MRS contendo 0,05 % e 0,1 % de ácido taurodeoxicólico e MRS contendo 0,05 % e 0,1 % de glicodeoxicólico.

#### 4. DISCUSSÃO

A tolerância de *L. delbrueckii* UFV H2b20 ao estresse ácido, característica necessária a toda linhagem probiótica foi verificada no presente estudo. Após quatro horas de exposição das células ao meio MRS pH 3,5 ocorreu redução de aproximadamente um ciclo logarítmico na curva de sobrevivência (Figura 2). As alterações na morfologia de *L. delbrueckii* UFV H2b20, observadas após a exposição das células por 4 horas em meio MRS pH 3,5 (Figura 3D), pode ser atribuída a danos causados a componentes celulares e/ou a indução da expressão de proteínas de superfície, a fim de minimizar os efeitos da acidez na fisiologia da célula. A superfície bacteriana é uma barreira de proteção contra diversos estresses ambientais e as bactérias podem alterar a composição da parede ou da membrana celular, a fim de diminuir a permeabilidade aos prótons, para aumentar a tolerância aos ácidos (WALL *et al.*, 2007). Análises morfológicas, utilizando microscopia de varredura, revelaram que o estresse ácido provocou modificações morfológicas na superfície da parede celular de *L.*

*plantarum*, tornando-a rugosa, possivelmente pela indução da expressão de proteínas de superfície (PIETERSE *et al.*, 2005).

As células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 expostas ao meio MRS pH 3,5 que apresentaram morfologias distintas (Figuras 3E e 3F), possivelmente encontravam-se em estados fisiológicos distintos. É provável que a que aparentemente não foi afetada pelo estresse possivelmente encontrava-se na fase estacionária e, a indução de uma resposta geral ao estresse, comum a esse estado fisiológico, pode ter possibilitado maior resistência à acidez do meio de cultura. Estudos anteriores mostraram que em bactérias do ácido láctico, as células na fase estacionária são naturalmente resistentes à condição de acidez, enquanto células na fase exponencial necessitam de um tempo adicional de adaptação para induzir a tolerância ao ácido (KIM *et al.*, 2001; VAN DE GUCHTE *et al.*, 2002).

Em adição a tolerância à acidez do meio, a resistência aos sais biliares foi também critério utilizado para confirmar o potencial probiótico de *L. delbrueckii* UFV H2b20. *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 apresentou tolerância diferenciada para os três tipos de sais biliares utilizados neste estudo, sendo a maior tolerância aos sais biliares mistos (Figura 5). Dentre os ácidos biliares conjugados utilizados no presente estudo, *L. delbrueckii* UFV H2b20 apresentou maior tolerância ao taurodeoxicólico (Figuras 8) e menor ao glicodeoxicólico (Figura 10) possivelmente relacionada à diferença de pKa dos dois ácidos. O taurodeoxicólico apresenta pKa de 1,9 e em condições fisiológicas encontra-se ionizado e não é capaz de atravessar a membrana, fato a que foi atribuído o dano mais localizado causado na superfície da parede conforme observado nas imagens topográficas por MFA (Figura 6F). O glicodeoxicólico apresenta valor de pka de 3,9 e a forma não dissociada pode entrar na célula e ao dissociar-se, intracelularmente, pode reduzir o pH citoplasmático e causar danos aos componentes celulares.

A presença de sais biliares mistos e de taurodeoxicólico provocou alterações na superfície celular de *L. delbrueckii* UFV H2b20 que se tornou rugosa (Figuras 6D e 6F). Adicionalmente, ocorreu redução da altura da célula após quatro horas de exposição aos meios MRS contendo sais biliares mistos (Figura 6D) e MRS contendo taurodeoxicólico (Figura 6F). É possível interpretar pelas imagens topográficas em MFA que a exposição aos sais biliares mistos resultou em extravasamento do material intracelular em decorrência da perda de integridade da parede celular (Figuras 6C e 6D). Esse efeito já foi descrito, a parede celular do probiótico *Lactobacillus plantarum* WCFS1

apresentou-se rugosa após a exposição a 0,5 % de sais biliares por quatro horas e algumas células apresentaram-se menores e vazias, possivelmente em razão do extravasamento de material intracelular (BRON *et al.*, 2004).

A ausência de atividade *in vitro* de Bsh em *L. delbrueckii* UFV H2b20 sugere que a linhagem não é capaz de desconjugar os sais biliares presentes na bile. A tolerância de *L. delbrueckii* UFV H2b20 aos sais biliares verificada neste estudo foi atribuída a mecanismo ainda não identificado. A resistência de algumas bactérias a concentrações fisiológicas de bile está relacionada à atividade de Bsh (BEGLEY *et al.*, 2006). Os sais biliares desconjugados apresentam solubilidade reduzida, quando comparada à da sua forma conjugada. Assim, hidrólise de sais biliares pode levar à sua precipitação, e conseqüentemente, diminuir o estresse causado pelos mesmos. Por essa teoria, a capacidade de hidrolisar sais biliares é uma característica que pode contribuir para sobrevivência de linhagens bacterianas no TGI de humanos (LAMBERT *et al.*, 2008). Vários organismos probióticos que apresentam o genoma sequenciado possuem o gene *bsh* (Tabela 1). *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 possui três genes *bsh* que, possivelmente, estão envolvidos na tolerância aos sais biliares (PRIDMORE *et al.*, 2004). Entretanto, a essencialidade dessa enzima para a sobrevivência no TGI começou a ser questionada quando se verificou que a inativação de *bsh* não afetou a tolerância aos sais biliares em *L. acidophilus* NCFM (McAULIFFE *et al.*, 2005). Assim, o papel ecológico e as implicações de Bsh para a saúde humana ainda não se encontram esclarecidos.

Em conjunto, os resultados mostraram que apesar dos efeitos deletérios dos estresses ácido e por presença de sais biliares, *L. delbrueckii* UFV H2b20 é capaz de tolerar as condições adversas prevalentes no TGI, no que se refere à acidez do estômago e à presença de sais biliares no intestino, característica fundamental a toda linhagem probiótica. Estudos genômicos e funcionais necessários para identificação e análise da expressão de genes envolvidos na resposta aos estresses em *L. delbrueckii* UFV H2b20 continuam sendo de relevância não apenas para demonstrar o papel desses genes na resposta ao estresse como também para o desenvolvimento de novas culturas probióticas com características de resistência às condições inibitórias presentes no TGI.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APHA - **Compendium of methods for the microbiological examination of foods.**

Fourth Edition. France Pouch Downes Keith Ito, 2001.

BEGLEY, M., GAHAN, C.G.M., HILL, C. The interaction between bacteria and bile. **FEMS Microbiology Reviews**, 29:625-651, 2005.

BEGLEY, M., HILL, C., GAHAN, C. G. M. Bile salt hydrolase activity in probiotics. **Applied and Environmental Microbiology**, 72:1729-1738, 2006.

BRON, P. A., MARCO, M., HOFFER, S. M., MULLEKOM, E. V., DE VOS, W. M., KLEEREBEZEM, M. Genetic Characterization of the bile response in *Lactobacillus plantarum* and analysis of responsive promoters in vitro and in situ in the gastrointestinal tract. **Journal of Bacteriology**, 186:7829-7835, 2004.

COTTER, P. D., HILL, C. Surviving the acid test: responses of Gram-positive bacteria to low pH. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 67:429-453, 2003.

DASHKEVICZ, M. P., FEIGHNER, S. D. Development of a differential medium for bile salt hydrolase-active *Lactobacillus* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, 55:11-16, 1989.

GOH, Y. J., KLAENHAMMER, T. R. Genomic features of *Lactobacillus* species. **Frontiers in Bioscience**, 14:1362-1386, 2009.

KIM, W.S., PERL, L., PARK, J. H., TANDIANUS, J. E., DUNN, N. W. Assessment of Stress Response of the Probiotic *Lactobacillus acidophilus*. **Current Microbiology**, 43: 346-350, 2001.

LAMBERT, J. M., BONGERS, R. S., DE VOS, W. M., KLEEREBEZEN, M. Funcional analysis of four bile salt hydrolase and penicillin acylase family members in *Lactobacillus plantarum* WCFS1. **Applied and Environmental Microbiology**, 74: 4719-4726, 2008.

LEBEER, S., VANDERLEYDEN, J., DE KEERSMAECKER, S. C. J. Genes and Molecules of Lactobacilli Supporting Probiotic Action. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 72:728-764, 2008.

McAULIFFE, O., CANO, R. J., KLAENHAMMER, T. R. Genetic Analysis of two Bile Salt Hydrolase Activities in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. **Applied and Environmental Microbiology**, 71:4925-4929, 2005.

PFEILER, E.A., PERIL-AZCARATE, M.A., KLAENHAMMER, T.R. Characterization of a Novel Bile-Inducible Operon Encoding a Two-Component Regulatory System in *Lactobacillus acidophilus*. **Journal of Bacteriology**, 189:4624-4634, 2007.

PIETERSE, B., LEER, R. J., SCHUREN, F. H., VAN DER WERF, M. J. Unravelling the multiple effects of lactic acid stress on *Lactobacillus plantarum* by transcription profiling. **Microbiology**, 151:3881-3894, 2005.

PRIDMORE, R. D., BERGER, B., DESIERE, F., VILANOVA, D., BARRETO, C., PITTET, A. C., ZWAHLEN, M., ROUVET, M., ALTERMAN, E., BARRANGOU, R., MOLLET, B., MERCENIER, A., KLAENHAMMER, T., ARIGONI, F., SCHELL, M. A. The genome sequence of the probiotic intestinal bacterium *Lactobacillus johnsonii* NCC 533. **PNAS**, 101:2512-2517, 2004.

REID, G., SANDERS, M.E., GASKINS, H. R., GIBSON, G. R., MERCENIER, A., RASTALL, R., ROBERFROID, M., ROWLAND, I., CHERBUT, C., KLAENHAMMER, T. R. New scientific paradigms for probiotics and prebiotics. **Journal Clinical Gastroenterology**, 37:105-118, 2003.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. **Molecular cloning a laboratory manual**, 3. Cold Spring Harbor: Laboratory Press, 1989.

SANTOS, N. S. **Isolamento e caracterização de *Lactobacillus acidophilus* de fezes de crianças alimentadas ao seio e de bezerros, visando sua utilização como adjunto dietético**. Viçosa, 69p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, 1984.

SCHAER-ZAMMARETTI, P., UBBIN, J. Imaging of lactic acid bacteria with AFM – elasticity and adhesion maps and their relationship to biological and structural data. **Ultramicroscopy**, 97:199-208, 2003.

SERRAZANETTI, D.I., GUERZONI, M.E., CORSETTI, A., VOGEL, R. Metabolic impact and potential exploitation of the stress reactions in lactobacilli. **Food Microbiology** 26:700-711, 2009.

VAN DE GUTCHE, M., SERROR, P., CHERVAUX, C., SMOKVINA, T., STANISLAV, D. Stress response in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, 82:187-216, 2002.

WALL, T., BATH, K., BRITTON, R. A., JONSSON, H., VERSALOVIC, J., ROSS, S. The early response to acid shock in *Lactobacillus reuteri* involves the ClpL chaperone and a putative cell wall-altering esterase. **Applied and Environmental Microbiology**, 73:3924-3935, 2007.

WHITEHEAD, K., VERSALOVIC, J., ROOS, S., BRITTON, R. A. Genomic and Genetic Characterization of the Bile Stress Response of probiotic *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730. **Applied Environmental Microbiology**, 74:1812-1819, 2008.

Tabela 1. Distribuição de genes *bsh* em linhagens probióticas.

Micro-organismo	Gene <sup>1/</sup>	Proteína <sup>1/2</sup>
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM	LBA0892	Hidrolase de sais biliares
	LBA1078	Hidrolase de sais biliares
<i>Lactobacillus johnsonii</i> FI9785	FI9785_118	Hidrolase de sais biliares
<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	LVIS_1962	Proteína like hidrolase de sais biliares
<i>Lactobacillus gasseri</i> ATCC 33323	LGAS_0054	Proteína like hidrolase de sais biliares
<i>Lactobacillus reuteri</i> JCM 1112	LAR_0701	Hidrolase de sais biliares
<i>Lactobacillus plantarum</i> WCFS1	lp_0067	Hidrolase de sais biliares
	lp_2572	Hidrolase de sais biliares
	lp_3362	Hidrolase de sais biliares
	lp_3536	Hidrolase de sais biliares
<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 20016	Lreu_0730	Coloiglicina hidrolase
<i>Lactobacillus johnsonii</i> NCC 533	LJ1412	Hidrolase de sais biliares
	LJ1147	Hidrolase de sais biliares
	LJ0056	Hidrolase de sais biliares
<i>Lactobacillus plantarum</i> JDM1	JDM1_2822	Coloiglicina hidrolase
	JDM1_0076	Coloiglicina hidrolase
	JDM1_2695	Coloiglicina hidrolase

<sup>1/</sup>Nomenclatura conforme *National Center for Biotechnology Information* (NCBI)

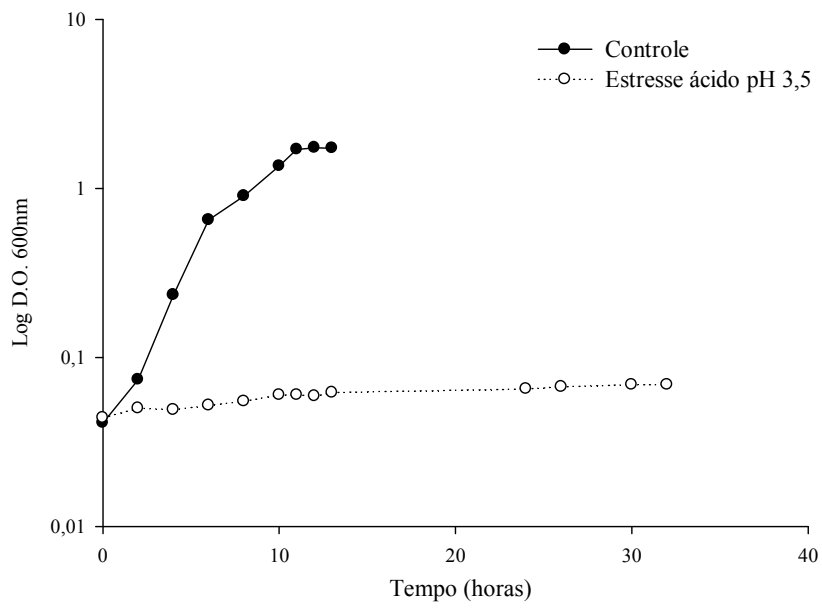


Figura 1. Efeito do estresse ácido sobre o crescimento de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20. As células foram cultivadas nos meios MRS pH 6,7 (controle) e MRS pH 3,5, e mantidas a 37 °C.

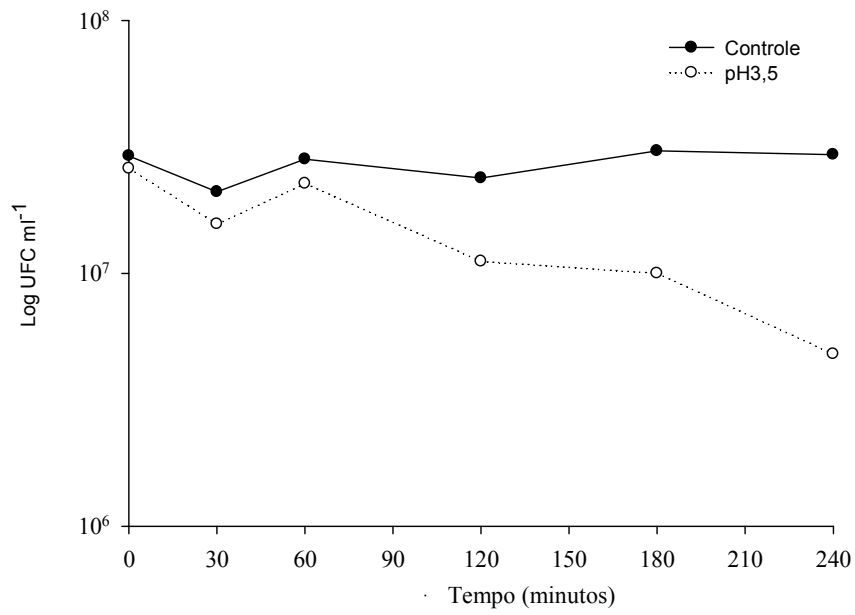


Figura 2. Efeito do estresse ácido sobre a sobrevivência de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20. As células foram mantidas nos meios MRS pH 6,7 (controle) e MRS pH 3,5 a 37 °C por quatro horas.

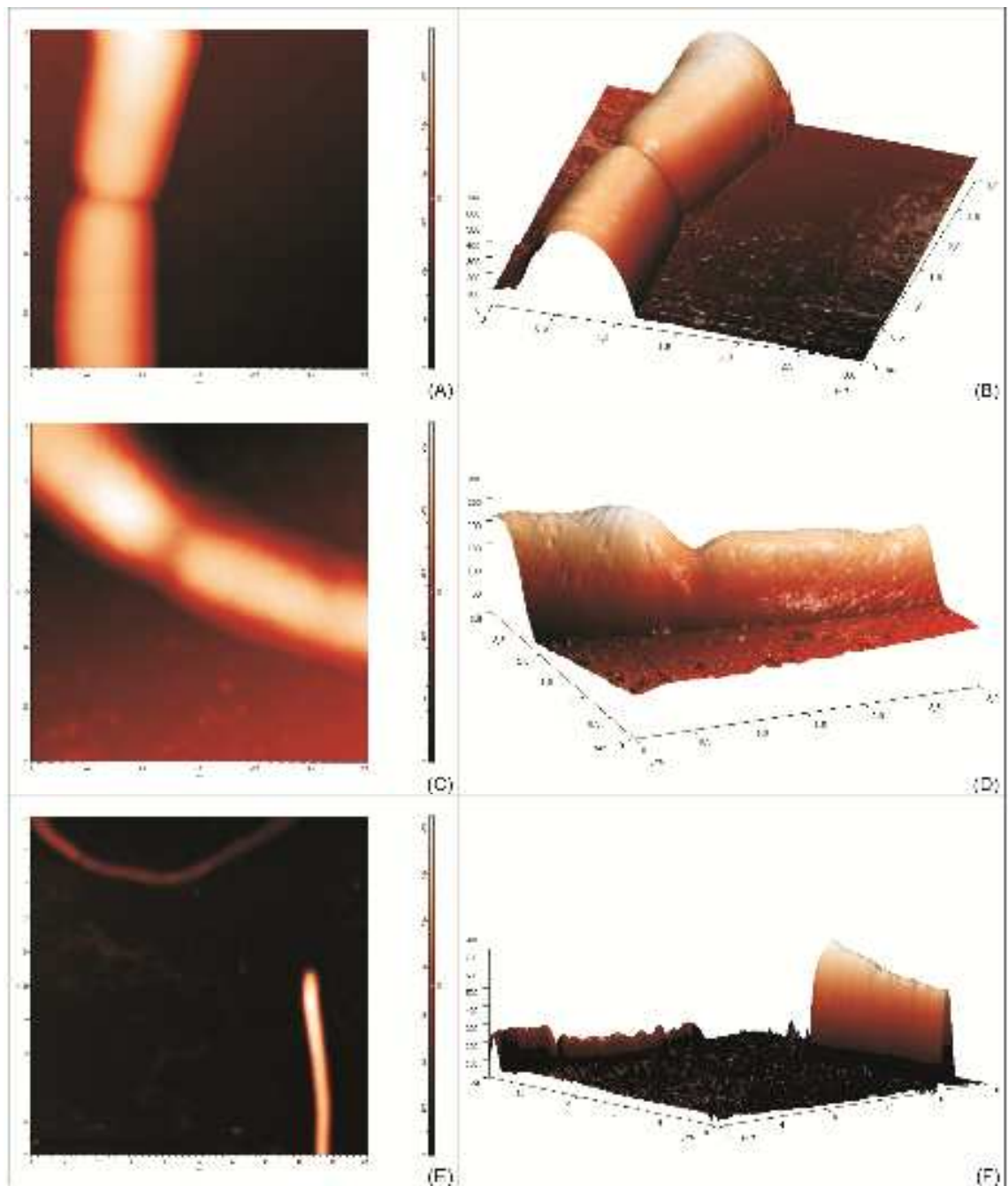


Figura 3. Imagens topográficas de Microscopia de Força Atômica (MFA) de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 exposto ao estresse ácido. As células foram mantidas em meio MRS pH 6,7 e MRS pH 3,5 a 37 °C por quatro horas. (A) e (B) células mantidas em MRS pH 6,7 (controle); (C), (D), (E) e (F) células mantidas em MRS pH 3,5. (A), (C) e (E) – imagens bidimensionais; (B), (D) e (F) – imagens tridimensionais. As medidas de topografia foram realizadas com varredura de 3,0  $\mu\text{m}$  (A), (B), (C) e (D) e de 20  $\mu\text{m}$  (E) e (F).

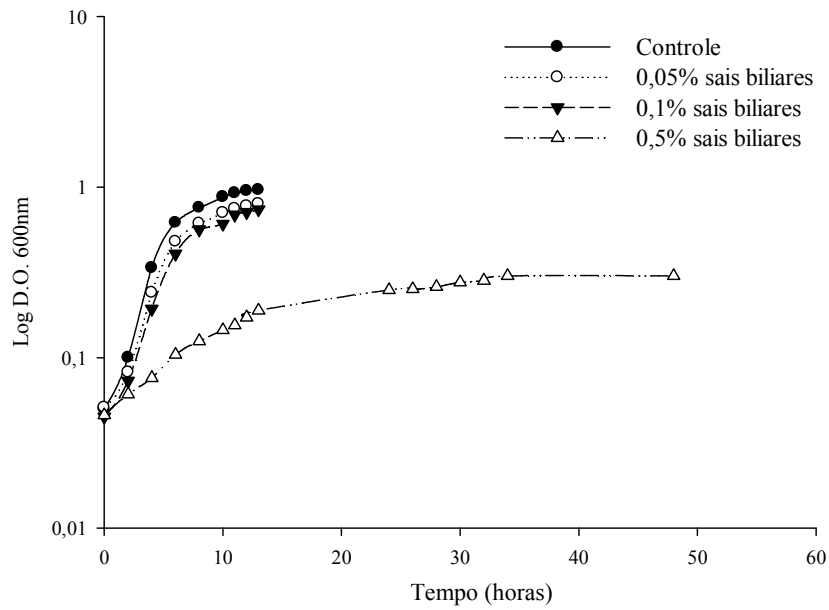


Figura 4. Efeito de sais biliares mistos sobre o crescimento de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20. As células foram cultivadas nos meios MRS pH 6,7 (controle); MRS contendo 0,05 %; 0,1% e 0,5 % (p/v) de sais biliares e mantidas a 37 °C.

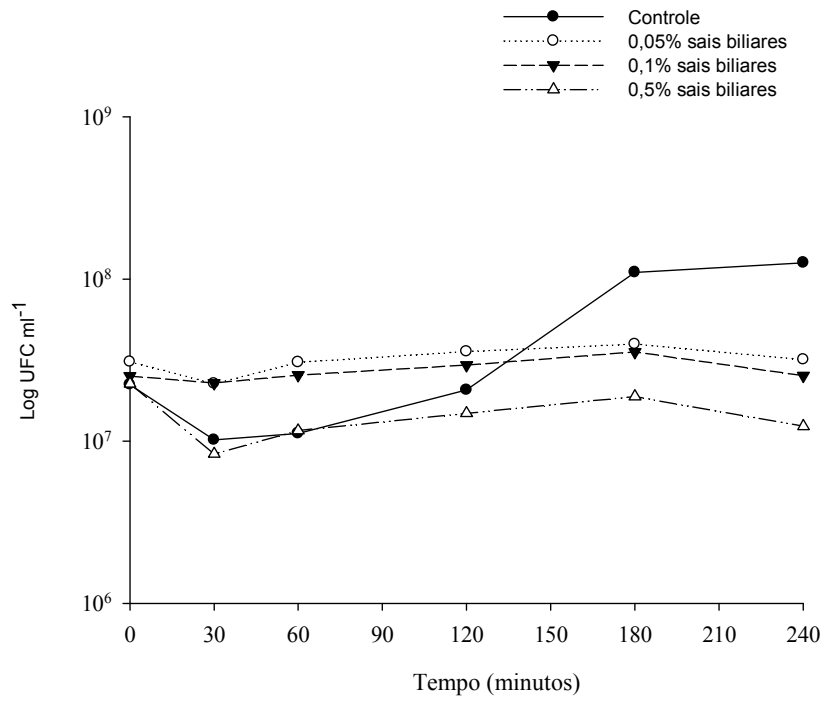


Figura 5. Efeito de sais biliare mistos sobre a sobrevivência de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20. As células foram mantidas nos meios MRS pH 6,7 (controle); MRS contendo 0,05 %; 0,1% e 0,5 % (p/v) de sais biliare a 37 °C por quatro horas.

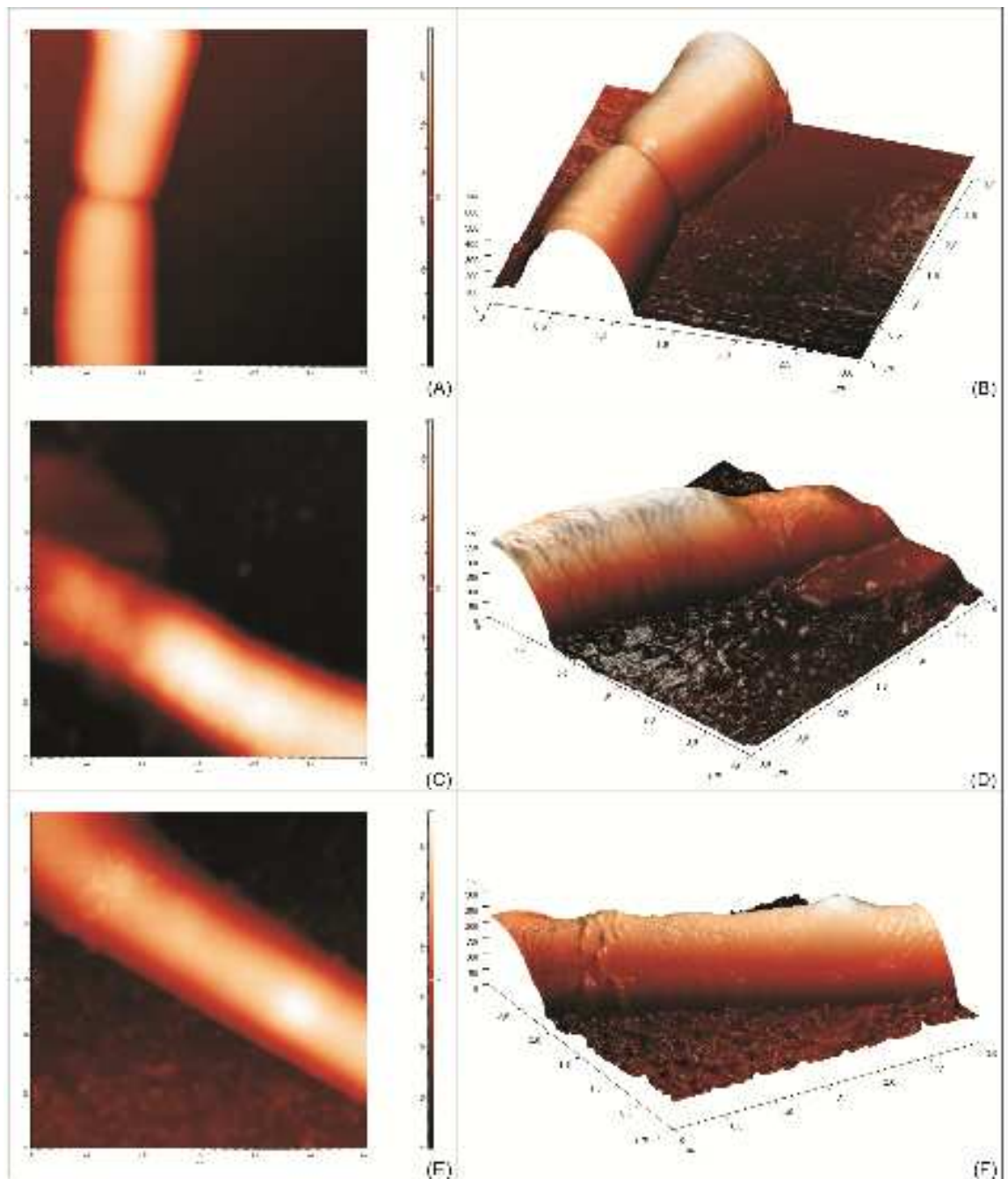


Figura 6. Imagens topográficas de Microscopia de Força Atômica (MFA) de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 exposto ao estresse por sais biliares. As células foram mantidas em meio MRS a 37 °C por quatro horas. (A) e (B) células mantidas em MRS (controle); (C) e (D) células mantidas em MRS contendo 0,5 % (p/v) de sais biliares; (E) e (F) células mantidas em MRS contendo 0,5 % de taurodeoxicólico. (A), (C) e (E) – imagens bidimensionais; (B), (D) e (F) – imagens tridimensionais. As medidas de topografia foram realizadas com varredura de 3,0 µm.

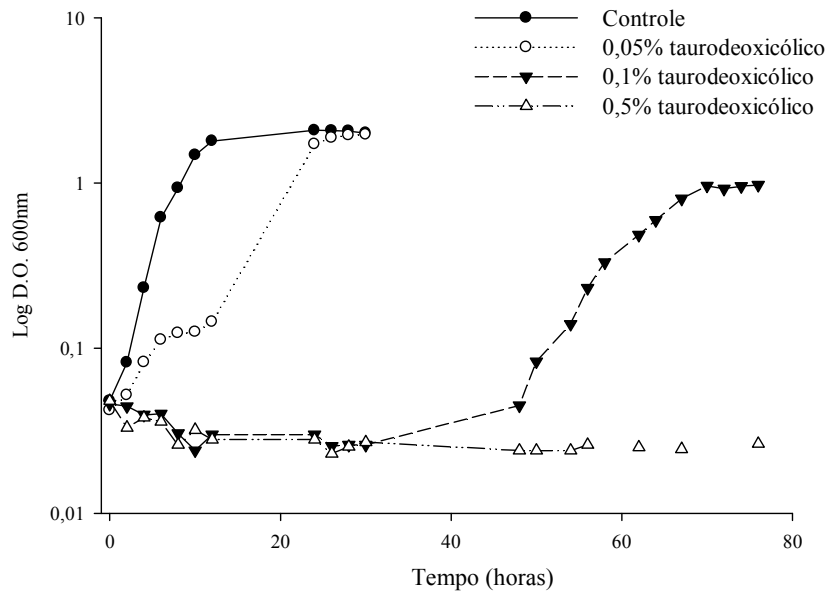


Figura 7. Efeito de ácido taurodeoxicólico sobre o crescimento de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20. As células foram cultivadas nos meios MRS pH 6,7 (controle); MRS contendo 0,05 %; 0,1% e 0,5 % (p/v) de ácido taurodeoxicólico e mantidas a 37°C.

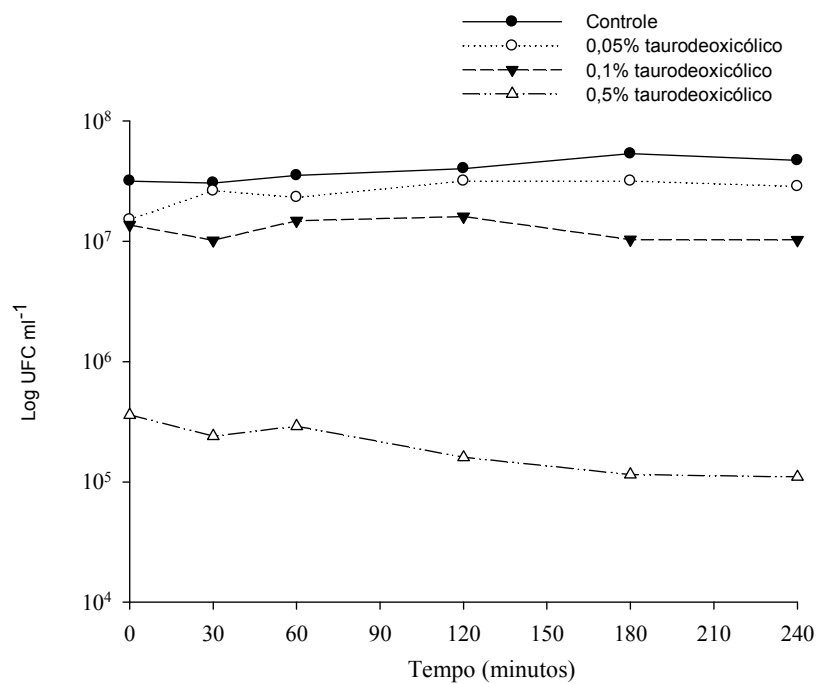


Figura 8. Efeito de ácido taurodeoxicólico sobre a sobrevivência de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20. As células foram mantidas nos meios MRS pH 6,7 (controle); MRS contendo 0,05 %; 0,1% e 0,5 % (p/v) de ácido taurodeoxicólico a 37 °C por quatro horas.

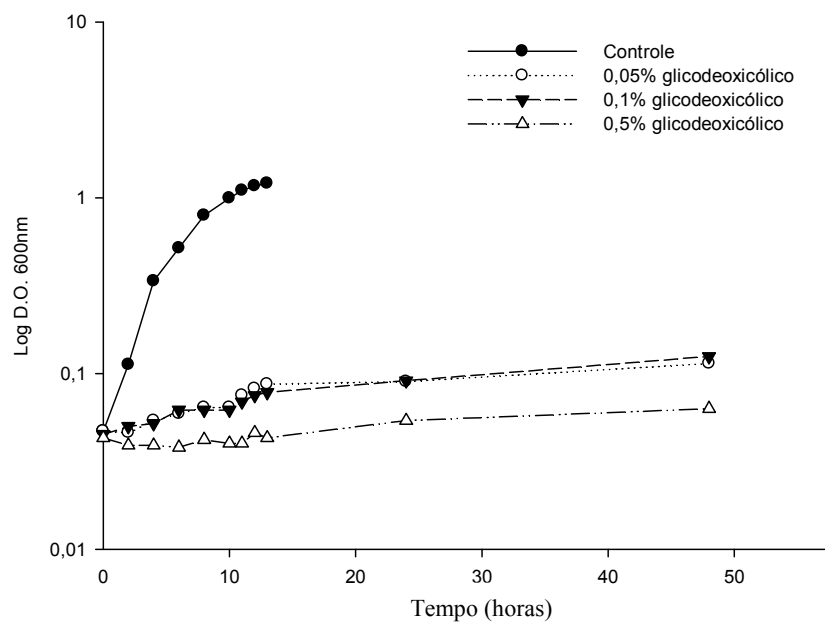


Figura 9. Efeito de ácido glicodeoxicólico sobre o crescimento de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20. As células foram cultivadas nos meios MRS pH 6,7 (controle); MRS contendo 0,05 %; 0,1% e 0,5 % (p/v) de ácido glicodeoxicólico e mantidas a 37 °C.

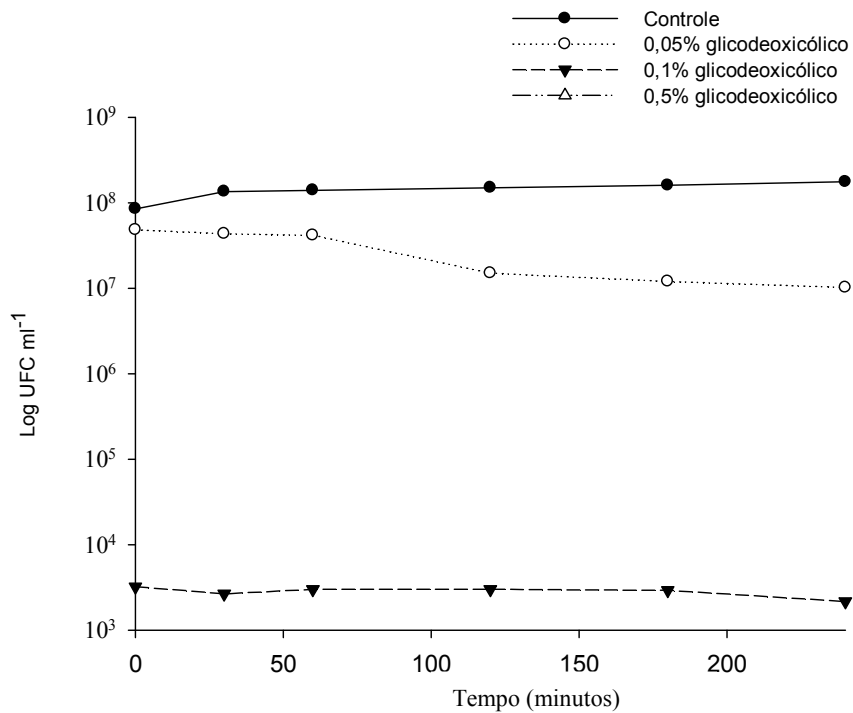


Figura 10. Efeito de ácido glicodeoxicólico sobre a sobrevivência de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20. As células foram mantidas nos meios MRS pH 6,7 (controle); MRS contendo 0,05 % (p/v); 0,1% (p/v) e 0,5 % (p/v) de ácido glicodeoxicólico 37 °C por quatro horas.

**Capítulo 3 - IDENTIFICAÇÃO, FILOGENIA MOLECULAR E ANÁLISE DA  
EXPRESSÃO DE GENES *clp* EM *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20  
EXPOSTO AOS ESTRESSES ÁCIDO E POR SAIS BILIARES**

# IDENTIFICAÇÃO, FILOGENIA MOLECULAR E ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES *clp* EM *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 EXPOSTO AOS ESTRESSES ÁCIDO E POR SAIS BILIARES

## RESUMO

As bactérias utilizadas como probióticos, ao serem submetidas às condições de estresse durante a passagem pelo trato gastrointestinal (TGI), apresentam respostas transcricionais de genes cujos produtos concorrem para a sobrevivência e adaptação ao ambiente. Diversos genes estão envolvidos na resposta ao estresse, como os genes que codificam as proteínas pertencentes ao complexo proteolítico Clp. Assim, o objetivo deste trabalho foi identificar e realizar análises filogenética e de expressão, por qRT-PCR, dos genes *clpP*, *clpE*, *clpL* e *clpX* em *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 exposto a condições de estresses prevalentes no TGI. Análises das sequências parciais dos quatro genes mostraram alta identidade de sequência, variando de 96 a 97 %, com as de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842. Foi realizada análise de ortologia com o banco de dados *Cluster of Orthologous Groups* (COG) para reconstrução da história evolutiva dos genes. As árvores filogenéticas reconstruídas por Inferência Bayesiana mostraram que os genes *clpP*, *clpL* e *clpE* de *L. delbrueckii* UFV H2b20 agruparam com os de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842, confirmando a identidade da linhagem em estudo. As exposições das células aos meios MRS pH 3,5, MRS contendo 0,1 % de sais biliares mistos e a MRS contendo 0,1 % de ácido glicodeoxicólico por 30 e 60 minutos provocaram aumento da expressão dos quatro genes. A exposição a 0,1 % de ácido taurodeoxicólico nas mesmas condições provocou aumento da expressão do gene *clpL*. Considerando o envolvimento dos genes *clpP*, *clpL*, *clpE* e *clpX* nas respostas aos estresses ácido e por sais biliares infere-se que a atividade do complexo proteolítico Clp representa mecanismo de reparo e/ou degradação de proteínas danificadas pelas condições de estresse analisadas neste estudo.

Palavras-chave: *Lactobacillus*, probióticos, estresse, filogenia molecular, PCR em tempo real

## 1. INTRODUÇÃO

As bactérias do gênero *Lactobacillus* frequentemente encontram condições de estresses nos ambientes que transitam, a exemplo de acidez elevada e presença de bile durante a passagem pelo trato gastrointestinal (TGI). A capacidade de sobrevivência nestes ambientes adversos é um critério importante para o processo de seleção de linhagens com potencial para uso como probióticos (GOH e KLAENHAMMER, 2009).

A exposição de células microbianas às condições de estresse envolve uma ampla resposta transcricional com muitos genes reprimidos e induzidos, cujos produtos são requeridos para superar os efeitos deletérios do estresse. Alguns desses genes parecem ser específicos, enquanto outros são induzidos por vários tipos de estresse e são denominados genes de resposta geral ao estresse. As inúmeras respostas são distintas e dependem da natureza do micro-organismo e do tipo de estresse ambiental (VAN DE GUCHTE *et al.*, 2002; SERRAZANETTI *et al.*, 2009).

As bactérias apresentam uma rede complexa de vias de resposta ao estresse para a promoção da sobrevivência durante desafios ambientais. Como consequência, uma série particular de proteínas, incluindo chaperones moleculares e proteases, é expressa. Chaperones moleculares auxiliam no dobramento correto de proteínas e as proteases degradam as que não podem ser dobradas corretamente (SUOKKO, 2005). Dentro deste contexto, as proteínas do complexo Clp se destacam em razão da importância para a resposta rápida de *Lactobacillus* ao estresse ou quando em condições adversas à sobrevivência, como no TGI (LEBEER *et al.*, 2008).

Os complexos proteolíticos Clp, amplamente conservados em bactérias Gram-positivas, consistem de um núcleo proteolítico formado por 14 subunidades de serina peptidases ClpP, empilhadas em dois anéis heptaméricos, formando um canal interno que é flanqueado por Clp ATPases (WANG *et al.*, 1997). As Clp ATPases contêm um ou dois domínios de ligação ao nucleotídeo (AAA-1, AAA-2). Os domínios funcionais incluem o denominado P, requerido para a ligação a ClpP; o de ligação Zn, envolvido na dimerização, e os domínios N1 e N2 que possivelmente são envolvidos na ligação à proteína a ser degradada (FREES *et al.*, 2007).

Para a expressão da atividade proteolítica, o multímero ClpP se associa com um ou dois anéis hexaméricos de Clp ATPases, formando o complexo proteolítico Clp. Em associação com o núcleo proteolítico, as Clp ATPases são responsáveis pelo

reconhecimento, dobramento e translocação de substratos para o canal de degradação ClpP (ZOLKIEWSKI, 2006). Os papéis de dobramento de proteínas e de desagregação parecem ser compartilhadas por todas as Clp ATPases. Contudo, apenas algumas podem interagir com ClpP, uma propriedade que está associada com a presença de um tripeptídeo de reconhecimento à ClpP encontrada em ClpA, ClpC e ClpE, mas não em ClpB e ClpL (KIM *et al.*, 2001).

Esses complexos têm papel indispensável ao sistema de controle de qualidade de proteínas, pelo redobramento e/ou degradação de proteínas danificadas em células estressadas e não estressadas (FREES *et al.*, 2007). A produção de ClpP e a maioria das Clp ATPases é fortemente aumentada em resposta ao choque térmico e a outras condições de estresse. Em bactérias Gram-positivas de baixo conteúdo GC, o controle da transcrição dos genes *clp* é primariamente mediada pela ligação do repressor CtsR ao heptanucleotídeo repetido A/GGTCAAA/T localizado na região promotora dos genes alvos (DERRÉ *et al.*, 1999).

A análise filogenética de sequências de DNA ou de proteínas é uma ferramenta importante para o estudo evolutivo, de todos os organismos vivos (NEI e KUMAR, 2000). A identificação dos grupos de ortólogos é um pré-requisito para análise informativa genômica-evolucionária de qualquer grupo de organismos (KOONIN, 2005). O banco de dados *Cluster of Orthologous Groups* (COG), utilizado na classificação filogenética, é uma plataforma para a anotação funcional de genomas recentemente sequenciados e para os estudos de evolução de genomas (TATUSOV *et al.*, 2001).

A técnica de PCR em tempo real (RT-qPCR) é atualmente uma das ferramentas utilizadas para avaliar a expressão de genes de bactérias, inclusive a de linhagens probióticas sob condições de estresse (PFEILER e KLAENHAMMER, 2007; O'FLAHERTY e KLAENHAMMER, 2011). Enquanto a sequência do genoma é uma visão estática do organismo, o proteoma e o transcriptoma introduzem uma visão quantitativa e dinâmica das variações de proteínas e RNA em diferentes condições ambientais (CHAMPOMIER-VERGES *et al.*, 2002).

Assim, o objetivo deste trabalho foi identificar e realizar análises filogenética e de expressão dos genes *clpP*, *clpE*, *clpL* e *clpX* em *L. delbrueckii* UFV H2b20 exposto aos estresses ácido e por presença de sais biliares.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Linhagem e condições de cultivo

Culturas estoque de *L. delbrueckii* UFV H2b20, isolado a partir de material fecal de crianças recém-nascidas (SANTOS, 1984) foram preparadas, congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -80 °C em caldo MRS, contendo 20 % de glicerol. As células foram reativadas em leite desnatado reconstituído (LDR) em água para concentração final de 10 % (p/v), e inoculadas em 5 mL de meio MRS contendo 2 % de glicose.

### 2.2. Extração de DNA total de *L. delbrueckii* UFV H2b20

O DNA de *L. delbrueckii* UFV H2b20 foi extraído utilizando o kit Wizard Genomic DNA purification kit (Promega), seguindo as recomendações do fabricante ou o protocolo adaptado no laboratório de Microbiologia Industrial do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil (MAGALHÃES *et al.*, 2008).

### 2.3. Seleção de *primers* e detecção dos genes alvos

Para amplificação dos genes que codificam as proteínas do complexo Clp, foram desenhados *primers* (Tabela 1) baseados nas sequências de nucleotídeos de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842 (NC008054), sendo os genes *clpP* (Ldb06240); *clpE* (Ldb0574); *clpL* (Ldb2102); *clpX* (Ldb0778), disponíveis no banco de dados *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Para a seleção dos *primers* foi utilizada a ferramenta *Primer-Blast*, disponível no NCBI e a qualidade dos mesmos foi verificada pelo programa *OligoAnalyzer* 3.1 (<http://www.idtdna.com>).

As reações de amplificação foram conduzidas em volume total de 25 µL, utilizando-se a DNA polimerase Gotaq (Promega) segundo instruções do fabricante e 25 ng de DNA total de *L. delbrueckii* UFV H2b20 como molde. Para determinar a temperatura de anelamento a ser utilizada com cada par de *primer* foi utilizado o termociclador com gradiente programável Bio-Rad iClicer (Techne TC 512) (Tabela 1).

## 2.4. Clonagem e sequenciamento dos genes

Os DNAs amplificados foram clonados em pGEM-T Easy Vector (Promega), como instruções do fabricante, e transformados em *Escherichia coli* JM109 por choque térmico, conforme técnicas padrão (SAMBROOK, 1989). Os insertos foram sequenciados no sequenciador MegaBACE™ 500 de 48 capilares (GE Healthcare) no Laboratório de Genômica, UFV e a análise das sequências foi realizada utilizando-se o programa Sequencher 4.1.4. (Gene Codes Corporation).

## 2.5. Análise comparativa de genes e Análise filogenética

Para cada sequência obtida foi feita uma busca de identidade com a utilização do algoritmo *Basic Local Alignment Search Tool* para nucleotídeos (BLASTn). A seguir, foram realizadas buscas de ortologia no banco de dados COG, uma vez que o objetivo foi o de reconstruir a história evolutiva dos genes. As sequências de genes ortólogos foram utilizadas para a reconstrução de árvores filogenéticas por Inferência Bayesiana no programa MrBayes 3.1, utilizando o método Markov chain Monte Carlo para 10 milhões de gerações. Foram feitas duas corridas independentes com quatro cadeias simultâneas, usando as configurações originais do programa. O modelo de substituição de nucleotídeos usado foi o estabelecido pelo programa MrModelTest, usando o critério Akaike (POSADA & BUCKLEY, 2004). As árvores foram amostradas a cada 1000 gerações e 25 % delas foram descartadas como “burn-in”. A probabilidade posterior, representada em cada nó da árvore construída, representa uma indicação do suporte daquele nó baseado no conjunto de dados.

## 2.6. Preparação das células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 para extração de RNA

Células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 congeladas foram reativadas em LDR 10% (p/v) e, transferidas para placa contendo MRS ágar. Para cada tratamento foram preparados 10 tubos contendo 3 mL de MRS. Em cada tubo foram transferidas três colônias que foram cultivadas até atingir D.O.<sub>600</sub> de 0,5. Aliquota de 1 mL de cada uma das culturas crescidas foram transferidas para um microtubo de 1,5 mL, totalizando 10 microtubos. Em seguida, as células foram centrifugadas, ressuspensas em 1 mL de MRS de acordo com cada tratamento. Aliquotas de 100 µL da suspensão de cada um dos 10 microtubos foram transferidas para um tubo de 1,5 mL, com volume final de 1 mL, e centrifugadas. O sedimento nos tubos foi congelado no próprio microtubo em nitrogênio líquido e estocado a -80 °C para posterior extração de RNA. Foram

realizados os seguintes tratamentos: 1. Controle (MRS pH 6,7); 2. Estresse ácido (MRS pH 3,5); 3. Estresse por presença de sais biliares (MRS contendo 0,1 % de sais biliares); 4. Estresse por presença de ácido taurodeoxicólico (MRS contendo 0,1 % de taurodeoxicólico); 5. Estresse por presença de ácido glicodeoxicólico (MRS contendo 0,1 % de glicodeoxicólico). As amostras foram mantidas em cada uma destas condições por 30 ou 60 minutos.

## 2.7. Extração de RNA e síntese de cDNA

As células tratadas e armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  foram descongeladas, ressuspensas em  $300\ \mu\text{L}$  de TE pH 7,4 acrescido de  $5\ \mu\text{L}$  de lisozima ( $50\ \text{mg mL}^{-1}$ ) e mantidas por 35 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  em banho-maria. A extração do RNA foi feita utilizando-se Trizol (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. A pureza e quantificação do RNA foram determinadas utilizando-se o espectrofotômetro Evolution Thermo Scientific<sup>TM</sup>. O RNA ( $2\ \mu\text{g}$ ) foi tratado com DNase (Promega), conforme instruções do fabricante e  $400\ \text{ng}$  do RNA tratado foi utilizado para síntese do cDNA, utilizando kit *ImProm-II<sup>TM</sup> Reverse Transcription System* (Promega), segundo instruções do fabricante.

## 2.8. qRT-PCR

A verificação do nível de expressão dos genes *clpP*, *clpE*, *clpL* e *clpX*, foi realizada por RT-PCR quantitativo (qRT-PCR). As sequências parciais dos genes *clpP*, *clpE*, *clpL* e *clpX* de *L. delbrueckii* UFV H2b20, previamente obtidas por sequenciamento, foram utilizadas para o desenho de *primers* específicos para qRT-PCR (Tabela 2). O gene homólogo a *sigA* foi o utilizado como gene controle ou de referência após a verificação de que a expressão do mesmo não foi significativamente afetada sob as condições experimentais. A presença de um único amplicon foi inicialmente testada por PCR convencional, utilizando-se cDNA de *L. delbrueckii* UFV H2b20 do tratamento controle. Os resultados foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida (8 %).

As análises quantitativas foram realizadas em termociclador CFX96<sup>TM</sup> Real-Time PCR detection systems – C100<sup>TM</sup> Thermal Cycler (Bio-Rad), utilizando *Fast SYBER Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems) para monitorar a síntese de DNA fita dupla. As reações foram montadas em volume final de  $12\ \mu\text{L}$ , conforme instruções do fabricante. Todas as amostras foram analisadas em triplicata. As eficiências de

reação foram determinadas como descrito por PFALL, 2001; BUSTIN *et al.*, 2005 e a especificidade da amplificação foi determinada por meio da análise das curvas de dissociação. A determinação da expressão relativa foi feita pelo método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001).

### 3. RESULTADOS

Neste estudo, os genes *clpP*, *clpE*, *clpL* e *clpX* que codificam as proteínas do complexo proteolítico Clp de *L. delbrueckii* UFV H2b20 foram identificados por PCR. Análise comparativa das sequências parciais obtidas mostrou que todos os genes apresentaram alta identidade com os de *L. delbrueckii* ATCC 11842; os genes *clpP*, *clpL* e *clpX* apresentaram 97 % e *clpE* apresentou valor de 96 % de identidade (Tabela 3).

Para reconstrução da história evolutiva dos quatro genes foi realizada análise da anotação funcional, realizada pela busca no banco de dados de ortólogos das sequências codificadas pelos respectivos genes (Tabela 4). A análise da anotação funcional mostrou que as proteínas pertencem a duas categorias funcionais; a proteína ClpP pertence à categoria NO (Motilidade e secreção celular/Modificação pós-traducional, *turnover* de proteínas e chaperones) e as proteínas ClpL, ClpE e ClpX pertencem à categoria O (Modificação pós-traducional, *turnover* de proteínas e chaperones) (Tabela 4).

As árvores filogenéticas mostraram que os genes *clpP*, *clpE* e *clpL* de *L. delbrueckii* UFV H2b20 agruparam com os de *L. delbrueckii* ATCC 11842 (Figuras 1, 2 e 3). O agrupamento filogenético de *clpX* diferiu-se dos demais genes; apresentou-se como um ramo externo às espécies de *Lactobacillus*, dentre as quais se encontra o *L. delbrueckii* ATCC 11842 (Figura 4).

A exposição de células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 por 30 e 60 minutos ao estresse ácido (MRS pH 3,5) provocou aumento da expressão dos genes *clpP*, *clpE*, *clpL* e *clpX* (Figura 5). O gene *clpP* foi o que apresentou maior aumento, 8,5 vezes maior que no tratamento controle após 30 minutos, e 14 vezes após 60 minutos. A expressão do gene *clpE* foi 0,96 maior que o tratamento controle após 30 minutos e 0,6 após 60 minutos. O gene *clpL* apresentou expressão de 6,35 vezes maior após 30 minutos e 1,65 após 60 minutos. A expressão do gene *clpX* foi 0,6 vezes maior em ambos os tempos analisados (Figura 5).

A exposição de células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 por 30 e 60 minutos ao meio MRS contendo 0,1 % de sais biliares mistos provocou aumento da expressão dos genes *clpP* e *clpE* (Figura 6). Diferentemente, os genes *clpL* e *clpX* apresentaram maior expressão apenas após 30 minutos de exposição e repressão após 60 minutos, comparado ao tratamento controle (Figura 6).

A expressão dos quatro genes analisados de *L. delbrueckii* UFV H2b20 exposto ao ácido conjugado taurodeoxicólico se diferiu quando comparada a de sais biliares mistos (Figuras 6 e 7). A repressão dos genes *clpP* e *clpE* foi observada em resposta a exposição a 0,1 % de taurodeoxicólico por 30 e 60 minutos. Já a expressão do gene *clpL* foi 0,55 vezes maior que o tratamento controle após exposição por 30 minutos desse ácido conjugado. O gene *clpX* foi reprimido após exposição por 30 minutos e sua expressão foi similar ao tratamento controle após 60 minutos (Figura 7).

O perfil de expressão dos genes em resposta ao ácido conjugado glicodeoxicólico diferiu-se do de ácido taurodeoxicólico (Figuras 7 e 8). O gene *clpP* apresentou aumento de 1,8 vezes na expressão, após 30 minutos na presença de 0,1 % de glicodeoxicólico, quando comparado ao tratamento controle. Os genes *clpE* e *clpX* apresentaram expressão similar ao controle, após 30 minutos de exposição ao glicodeoxicólico. A expressão de *clpL* foi maior que a do tratamento controle nos dois tempos analisados (Figura 8).

#### 4. DISCUSSÃO

A reconstrução filogenética por Inferência Bayesiana de *clpP*, *clpE*, *clpL* de *L. delbrueckii* UFV H2b20 mostrou que estes genes agruparam com os de *L. delbrueckii* ATCC 11842. Estes agrupamentos, associados aos altos valores de identidade confirmaram a identidade e corroboram dados de trabalho anterior sobre a reclassificação da bactéria (MAGALHÃES *et al.*, 2008). *L. delbrueckii* UFV H2b20, originalmente classificado como *L. acidophilus* pelas características fenotípicas (SANTOS, 1984) foi reclassificado como pertencente à espécie *L. delbrueckii* (MAGALHÃES *et al.*, 2008). Esta bactéria apresenta características específicas que a distingue de outras dessa espécie, especialmente no que se refere à probiose. As bactérias com genomas completamente sequenciados, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842 e *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* BAA 365, não são probióticas (GOH e KLAENHAMMER, 2009). Até o momento, não há relatos na literatura de linhagens de

*L. delbrueckii* com funções probióticas. Diferentemente, o gene *clpX* apresentou-se como um ramo externo às espécies de *Lactobacillus*, dentre as quais se encontra o *L. delbrueckii* ATCC 11842. Esse agrupamento associado ao tamanho do ramo pode indicar mutações no gene *clpX* durante a evolução.

A reconstrução de árvores filogenéticas mostrou que em relação às bactérias do ácido láctico probióticas, o gene *clpP* de *L. delbrueckii* UFV H2b20 é filogeneticamente mais próximos ao de *L. acidophilus* NCFM. Essas duas espécies pertencem ao mesmo grupo pela filogenia do rRNA 16S (SCHLIFER e LUDWIG, 1995; FELIS e DELLAGLIO, 2005). *Lactobacillus acidophilus* NCFM, de origem humana, como *L. delbrueckii* UFV H2b20, é produzida comercialmente desde 1972, possui genoma de 1,9 Mb, não possui plasmídeos e o conteúdo GC é de 34,7 % (ALTERMANN *et al.*, 2005). *L. delbrueckii* UFV H2b20 foi reclassificado como pertencente à espécie *L. delbrueckii* após análise da sequência rDNA 16S e hibridização DNA-DNA (MAGALHÃES *et al.*, 2008), não apresenta plasmídeos (FLORESTA, 2008) e o conteúdo GC possivelmente é maior que o de *L. acidophilus*, já que o conteúdo de *L. delbrueckii bulgaricus* ATCC 11842 é de 49,7 % (VAN DE GUCHTE *et al.*, 2006).

Em relação aos probióticos, o gene *clpE* de *L. delbrueckii* UFV H2b20 é filogeneticamente mais próximo ao de *L. johnsonii* F19785. *L. delbrueckii* e *L. johnsonii* pertencem ao mesmo grupo pela filogenia do rRNA 16S (SCHLIFER e LUDWIG, 1995; FELIS e DELLAGLIO, 2005). Adicionalmente, uma sintenia global foi observada entre os genomas de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842, *L. acidophilus* e *L. johnsonii* (BERGER *et al.*, 2007). Aproximadamente 55 a 60 % das proteínas de *L. delbrueckii* apresentam homólogos em *L. acidophilus* e *L. johnsonii* e 25 a 35% das proteínas são únicas ao *L. delbrueckii* (VAN DE GUCHTE *et al.*, 2006).

O gene *clpL* de *L. delbrueckii* UFV H2b20 é filogeneticamente mais próximo ao de *Lactobacillus salivarius* UCC 118, em relação aos probióticos. *Lactobacillus delbrueckii* e *L. salivarius* não pertencem ao mesmo grupo pela filogenia do rRNA (SCHLIFER e LUDWIG, 1995; FELIS e DELLAGLIO, 2005), entretanto como *L. delbrueckii* UFV H2b20, *L. salivarius* UCC118 é probiótico e foi isolado do TGI de humanos (ZHU *et al.*, 2009) e, assim essas duas espécies compartilham o mesmo nicho ecológico. A busca no banco de dados NCBI mostrou que espécies mais relacionadas ao *L. delbrueckii* UFV H2b20 como *L. acidophilus* e *L. johnsonii* não possuem o gene *clpL*, o que pode explicar o agrupamento obtido pela reconstrução filogenética desse gene.

Neste estudo, o aumento da expressão dos *clpP*, *clpE*, *clpL* e *clpX* de *L. delbrueckii* UFV H2b20 em meio MRS pH 3,5 mostrou o envolvimento destes genes na resposta ao estresse ácido e sugere que as proteínas do complexo Clp podem estar envolvidas no reparo e/ou degradação de proteínas danificadas pelo estresse e assim, contribuir para a sobrevivência e persistência da bactéria no TGI de humanos. Alguns estudos mostraram o envolvimento dos genes *clp* em bactérias do ácido láctico expostas ao estresse ácido. Em *L. reuteri* ATCC 55730, o gene *clpL* (lr1863) apresentou aumento da expressão em pH 2,7 e o mutante *clpL* foi mais sensível ao ácido que a linhagem selvagem (WALL *et al.*, 2007). Em outro estudo, expressão da proteína ClpL de *Streptococcus mutans* LT11 foi maior quando as células foram crescidas em meio com pH 5,0 do que as células em pH 7,0 (LEN *et al.*, 2004). Em *Lactobacillus plantarum* WCFS1 ocorreu aumento da expressão do gene *clpE* quando a bactéria foi exposta ao meio de cultura com pH 4,8 (PIETERSE *et al.*, 2005).

O aumento da expressão dos genes *clpP*, *clpE*, *clpL* e *clpX* de *L. delbrueckii* UFV H2b20 à exposição ao MRS contendo 0,1 % de sais biliares mistos mostrou o envolvimento dos mesmos na resposta a esse estresse e sugere que as proteínas codificadas por esses genes podem ser necessárias para a adaptação de *L. delbrueckii* UFV H2b20 no TGI, já que os sais biliares apresentam atividade antimicrobiana potente, podendo causar danos às membranas celulares, ao DNA e às proteínas (BEGLEY *et al.*, 2005). Os genes *clpE* e *clpL* de *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 apresentaram aumento na expressão de 5 e 3,2 vezes, respectivamente em resposta a esse estresse. Além disso, o mutante *clpL* apresentou diminuição da sobrevivência em exposição aos sais biliares, quando comparado a linhagem selvagem (WHITEHEAD *et al.*, 2008).

Para verificar a resposta transcricional dos genes *clpP*, *clpE*, *clpL* e *clpX* ao estresse por presença de sais biliares conjugados, *L. delbrueckii* UFV H2b20 foi exposto ao taurodeoxicólico e ao glicodeoxicólico. Em relação ao taurodeoxicólico, os genes *clpP* e *clpE* foram reprimidos nos dois tempos analisados. A expressão de *clpX* foi menor no tempo 30 e similar ao controle no tempo 60. Assim, esses dados indicam que os genes *clpP*, *clpE* e *clpX* possivelmente não estão envolvidos na resposta ao estresse por presença de taurodeoxicólico em *L. delbrueckii* UFV H2b20. De forma distinta, a expressão de *clpL* foi maior que no tratamento controle. Assim, o gene *clpL* pode estar envolvido na resposta ao estresse por presença de taurodeoxicólico e a proteína ClpL pode ser importante para a sobrevivência de *L. delbrueckii* UFV H2b20 no TGI.

A resposta à presença de glicodeoxicólico foi distinta da de taurodeoxicólico. Os genes *clpP* e *clpL* apresentaram maior expressão após 30 minutos de exposição em meio MRS contendo 0,1 % de glicodeoxicólico. A expressão de *clpE* e *clpX* foi similar ao tratamento controle após 30 minutos de exposição, e após 60, a do gene *clpX* foi 0,8 vezes maior que o tratamento controle. Estes dados mostram que possivelmente os quatro genes analisados estão envolvidos de formas diferentes na resposta ao estresse por glicodeoxicólico.

A expressão dos genes *clp* em resposta aos estresses ácido e por presença de sais biliares em *L. delbrueckii* UFV H2b20 mostrou que esses genes estão relacionados à resposta ao estresse geral e que mecanismos moleculares envolvidos na resistência aos estresses ácido e por presença de sais biliares são comuns a esses estresses. Estudo com *L. reuteri* ATCC 55730, mostrou que genes diferentemente regulados sob condições de estresse ácido, também apresentaram expressão alterada na presença de sais biliares. Isso pode indicar que quando as células são expostas ao pH ácido no estômago, muitos mecanismos envolvidos na resposta ao estresse por sais biliares são ativados (WALL *et al.*, 2007; WHITEHEAD *et al.*, 2008).

Em conjunto, os dados mostraram que os genes *clpP*, *clpL*, *clpE* e *clpX* estão envolvidos na resposta ao estresse ácido e por presença de sais biliares e que respondem a essas condições de forma distinta. As proteínas do complexo Clp possivelmente estão envolvidas no reparo e/ou degradação de proteínas danificadas pelas condições prevalentes no TGI investigadas neste estudo. Assim, os genes *clp* podem contribuir para a sobrevivência e persistência de *L. delbrueckii* no TGI, característica necessária às linhagens utilizadas como probióticos. Estudos com mutantes são necessários para confirmar a essencialidade destes genes em *L. delbrueckii* UFV H2b20 sob condições de estresse.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTERMANN, E., RUSSELL, W. M., AZCARATE-PERIL, M. A., BARRANGOU, R., BUCK, B. L., McAULIFFE, O., DOBSON, A., CALLANAN, M., LICK, S., HAMRICK, A., CANO, R., KLAENHAMMER, T. R. Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. **PNAS**, 102:3906-3912, 2005.

BEGLEY, M., GAHAN, C.G.M., HILL, C. The interaction between bacteria and bile. **FEMS Microbiology Reviews**, 29: 625-651, 2005.

BERGER, B., PRIDMOREE, R. D., BARREO, C., DELMAS-JULIEN, F., SCHREIDER, K., ARIGONI, F., BRUSSOW, H. Similarity and differences in the *Lactobacillus acidophilus* group identified by polyphasic analysis and comparative genomics. **Journal of Bacteriology**, 189:1311-1321, 2007.

BUSTIN, S. A., BENES, V., NOLAN, T., PFALL, M.W. Quantitative real-time RT-PCR –a perspective. **Journal of Molecular Endocrinology**, 34:597-601, 2005.

CHAMPOMIER-VERGES, M.C., MAGUIN, E., MISTOU, M.Y., ANGLADE, P., CHICH, J.F. Lactic acid bacteria and proteomics: current knowledge and perspectives. **Journal of Chromatography B**. 771:329-342, 2002.

CLAESSON, M.J., LI, Y., LEAHY, S., CANCHAYA, C., PIJKEREN, J. P., CERDENO-TARRAGA, A. M., PARKHILL, J., O'SULLIVAN, G. C., COLLINS, J. K *et al.* Multireplicon genome architecture of *Lactobacillus salivarius*. **PNAS**. 103:6718-6728, 2006.

DERRÉ, I., RAPOPORT, G., MSADEK, T. CtsR, a novel regulator of stress and heat shock response, controls *clp* and molecular chaperone gene expression in Gram-positive bacteria. **Molecular Microbiology**, 31:117-131, 1999.

FLORESTA, A. F. **Características de superfície de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 probiótico**. Viçosa, 56p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, 2008.

FREES, D., SAVIJOKI, K., VARMANEN, P., INGMER, H. Clp ATPases and ClpP proteolytic complexes regulate vital biological processes in low GC, Gram-positive bacteria. **Molecular Microbiology**, 63:1285-1295, 2007.

GOH, Y. J., KLAENHAMMER, T. R. Genomic features of *Lactobacillus* species. **Frontiers in Bioscience**, 14:1362-1386, 2009.

KIM, Y.I., LEVCHENKO, I., FRACZKOWSKA, K., WOODRUFF, R.V., SAUER, R.T., BAKER, T. A. Molecular determinants of complex formation between Clp/Hsp100 ATPases and the ClpP peptidase. **Nature Structural and Molecular Biology**, 8:230-233, 2001.

- KOONIN, E. V. Orthologs, paralogs, and evolutionary genomics. **Annual Review Genetics**. 39:309-338, 2005.
- LEBEER, S., VANDERLEYDEN, J., DE KEERSMAECKER, S. C. J. Genes and Molecules of Lactobacilli Supporting Probiotic Action. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 72:728-764, 2008.
- LEN, A. C. L., HARTY, D. W. S., JACQUES, N. A. Stress-responsive proteins are upregulated in *Streptococcus mutans* during acid tolerance. **Microbiology**, 150:1339-1351, 2004.
- LIVAK, K. J., SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Method. **Methods**, 25:402-408, 2001.
- MAGALHÃES, J. T., UETANABARO, A. P. T., MORAES, C.A. Identification of *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 (Probiotic strain) using DNA-DNA hybridization. **Brazilian Journal of Microbiology**, 39:524-546, 2008.
- NEI, M., KUMAR, S. **Molecular evolution and phylogenetics**. New York: Ed. Oxford, 2000. 333 p.
- O'FLAHERTY., KLAENHAMMER, T. R. The impact of Omic Technologies on the Study of Food Microbes. **Annual Review of Food Science Technology**, 2:353-71, 2011.
- PFALL, M. W. A A new mathematic model for relative quantification in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, 29: 45-53, 2001.
- PFEILER, E. A., KLAENHAMMER, T. R. The genomics of lactic acid bacteria. **Trends in Microbiology – Review**, 15:546-553, 2007.
- PIETERSE, B., LEER, R. J., SCHUREN, F. H., VAN DER WERF, M. J. Unravelling the multiple effects of lactic acid stress on *Lactobacillus plantarum* by transcription profiling. **Microbiology**, 151:3881-3894, 2005.
- POSADA, D., BUCKEY, T. R. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. **System Biology**, 53:793-808, 2004.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. **Molecular cloning a laboratory manual**, 3. Cold Spring Harbor: Laboratory Press, 1989.
- SANTOS, N. S. **Isolamento e caracterização de *Lactobacillus acidophilus* de fezes de crianças alimentadas ao seio e de bezerros, visando sua utilização como adjunto dietético**. Viçosa, 69p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, 1984.
- SCHLEIFER, K.H., LUDWIG, W. Phylogeny of the genus *Lactobacillus* and related genera. **Systematic Applied Microbiology**, 14:461-467, 1995.

SERRAZANETTI, D.I., GUERZONI, M.E., CORSETTI, A., VOGEL, R. Metabolic impact and potential exploitation of the stress reactions in lactobacilli. **Food Microbiology**, 26:700-711, 2009.

SUOKKO, A., SAVIJOKI, K., MALINEN, E., PALVA, A., VARMANEN, P. Characterization of a Mobile clpL gene from *Lactobacillus rhamnosus*. **Applied and Environmental Microbiology**, 71:2061-2069, 2005.

TATUSOV, R. I., KOONIN, E.V., LIPMAN, D.J. A genomic perspective on protein families. **Science**, 278:631-637, 1997.

VAN DE GUTCHE, M., SERROR, P., CHERVAUX, C., SMOKVINA, T., STANISLAV, D. Stress response in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, 82:187-216, 2002.

VAN DE GUCHTE, M., PENAUD, S., GRIMALDI, C., BARBE, V., BRYSON, K., NICOLAS, P., ROBERT, C., *et al.* The complete genome sequence of *Lactobacillus bulgaricus* reveals extensive and ongoing reductive evolution. **PNAS**, 103:9275-9279, 2006.

WALL, T., BATH, K., BRITTON, R. A., JONSSON, H., VERSALOVIC, J., ROSS, S. The early response to acid shock in *Lactobacillus reuteri* involves the ClpL chaperone and a putative cell wall-altering esterase. **Applied and Environmental Microbiology**, 73:3924-3935, 2007.

WANG, J., HARTLING, J.A., FLANAGAN, J. M. The structure of ClpP at 2.3Å resolution suggests a model for ATP-dependent proteolysis. **Cell**, 91:447-456, 1997.

WHITEHEAD, K., VERSALOVIC, J., ROOS, S., BRITTON, R.A. Genomic and genetic characterization of the bile stress response of probiotic *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730. **Applied and Environmental Microbiology**, 74:1812-1819, 2008.

ZOLKIEWSKI, M. A camel passes through the eye of a needle: protein unfolding activity of Clp ATPases. **Molecular Microbiology**, 61:1094-1100, 2006.

ZHU, Y., ZHANG, Y., LI, Y. Understanding the industrial application potential of lactic acid bacteria through genomics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 83:597-610, 2009.

Tabela 1. Sequências dos primers e temperatura de anelamento utilizados na amplificação dos genes que codificam as proteínas Clp de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20.

Gene	Primer (5'-3') <sup>a</sup>	Temperatura de anelamento
<i>clpP</i>	ClpPf - CCGTAGTCCTTGGCTTCCT	54,5 °C
	ClpPr - GACATTTACTCCCGCTTGCTT	
<i>clpE</i>	ClpEf1- CTGTCAA AACTGCCACCAAC	47,9 °C
	ClpEr1- TTCTTCTTGTGCCTGGATGT	
<i>clpE</i>	ClpEf2- GAAGACTACGAAAAAGCTGCC	49 °C
	ClpEr2- GTGATTTCCCGTCCCTTA	
<i>clpL</i>	ClpLf1- CCAGGGCAAGCAAAAAGAAG	60,8 °C
	ClpLr1- CCGACGAAGAGGAAGGAG	
<i>clpL</i>	ClpLf2 - AAGACTACCAAGCCGCCC	62,6 °C
	ClpLr2 - GTTTACGTCAGCCAGCATCC	
<i>clpX</i>	ClpXf - CGGGCCAAGCGGGTTCTGTC	60,3 °C
	ClpXr - CCTCTTCCAGTTCGCGGCGG	

<sup>a</sup>Primers selecionados com base nas sequências de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842

Tabela 2. Sequências de *primers* utilizados no estudo de expressão de genes por qRT-PCR em *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 exposto aos estresses ácido e por presença de sais biliares

Gene alvo	Primer (5'-3')	Tamanho do amplicon
<i>sigA</i>	Ldb1245f - AGCCAAGAACCAGGAAAC Ldb1245r - GTCAGGAACTCACCCATC	147
<i>clpP</i>	qClpPf - GCGGTGTGATCACTTCCGGCAT qClpPr - TGCCCTTTTCGCCTTCAGCC	109
<i>clpE</i>	qClpEf - CGGCAGCGAAGACGCCATGA qClpEr - GGCGGACCCGTTTCGGTCAAT	114
<i>clpL</i>	qClpLf - GGGACGTGCCGGAAGCAATCA qClpLr - GCCTCTGTCCTTGACTTCCTTGACC	109
<i>clpX</i>	qClpXf - CCCAGCGGGGGATCATTTATATCG qClpXr - CCTGCGGCGGAATAGAAGCAA	129

<sup>a</sup>Os *primers* foram selecionados com base nas sequências parciais dos genes de *L. delbrueckii* UFV H2b20 obtidas por sequenciamento.

Tabela 3. Tamanho das sequências parciais obtidas dos genes em *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 e valores de identidade em relação aos genes de *Lactobacillus delbrueckii* ATCC 11842

<b>Gene</b>	<b>Sequência obtida <sup>a</sup></b>	<b>Tamanho da sequência <sup>b</sup></b>	<b>Identidade (BlastN)</b>
<i>clpP</i>	462pb	585pb	97%
<i>clpE</i>	1888pb	2156pb	96%
<i>clpL</i>	1686pb	2091pb	97%
<i>clpX</i>	908pb	1254pb	97%

<sup>a</sup>Sequências parciais em pares de bases (pb) obtidas do sequenciamento dos genes de *L. delbrueckii* UFV H2b20

<sup>b</sup>Sequências dos genes em pares de bases (pb) de *L. delbrueckii* ATCC 11842, disponíveis no banco de dados NCBI

Tabela 4. Anotação funcional de genes envolvidos nos estresses ácido e por presença de sais biliares e seus ortólogos em Bactérias do Ácido Lático

Genes <sup>a</sup>	Ortólogos <sup>b</sup>	COG <sup>c</sup>	Anotação funcional	
			Categoria	Descrição
			<b>ClpP</b>	
Ldb0624	LC705_00984; LAR_0379; LCABL_1070; LP_0786; LGAS_1312; LJ0869; LSL_1168; lmo2468; bsu34540	0740NO	Motilidade e secreção celular/modificação pós-traducional, turnover de proteínas, chaperones	Processos celulares
			<b>ClpE</b>	
Ldb0574	LBA0638; LSA1465; LSL_0386; lp_1269; LCABL_19810; FI9785_1389;LGG_01823;lmo0997; stu0602	0542O	Modificação pós-traducional, turnover de proteínas, chaperones	Processos celulares
			<b>ClpL</b>	
Ldb2102	lp_3583;LSA0207; LSL_0059; LCABL_22120; LGG_02035; stu1614; LCK_00197; SA2336	0542O	Modificação pós-traducional, turnover de proteínas, chaperones	Processos celulares
			<b>ClpX</b>	
Ldb0778	LAR_0630;LCABL_15610;LAF_0620;lhv_0897;LGG_01352; FI9785_1195; LGAS_1166; LBA0847; LSA1061; LVIS_1387; lp_2116; lmo1268; BSU28220	1219O	Modificação pós-traducional, turnover de proteínas, chaperones	Processos celulares

<sup>a</sup> Genes de *L. delbrueckii* ATCC 11842, disponíveis no banco de dados NCBI/ <sup>b</sup> Nomenclatura conforme NCBI

<sup>c</sup> Códigos das categorias funcionais conforme o banco de dados *Cluster Orthologous of Groups* (COG)

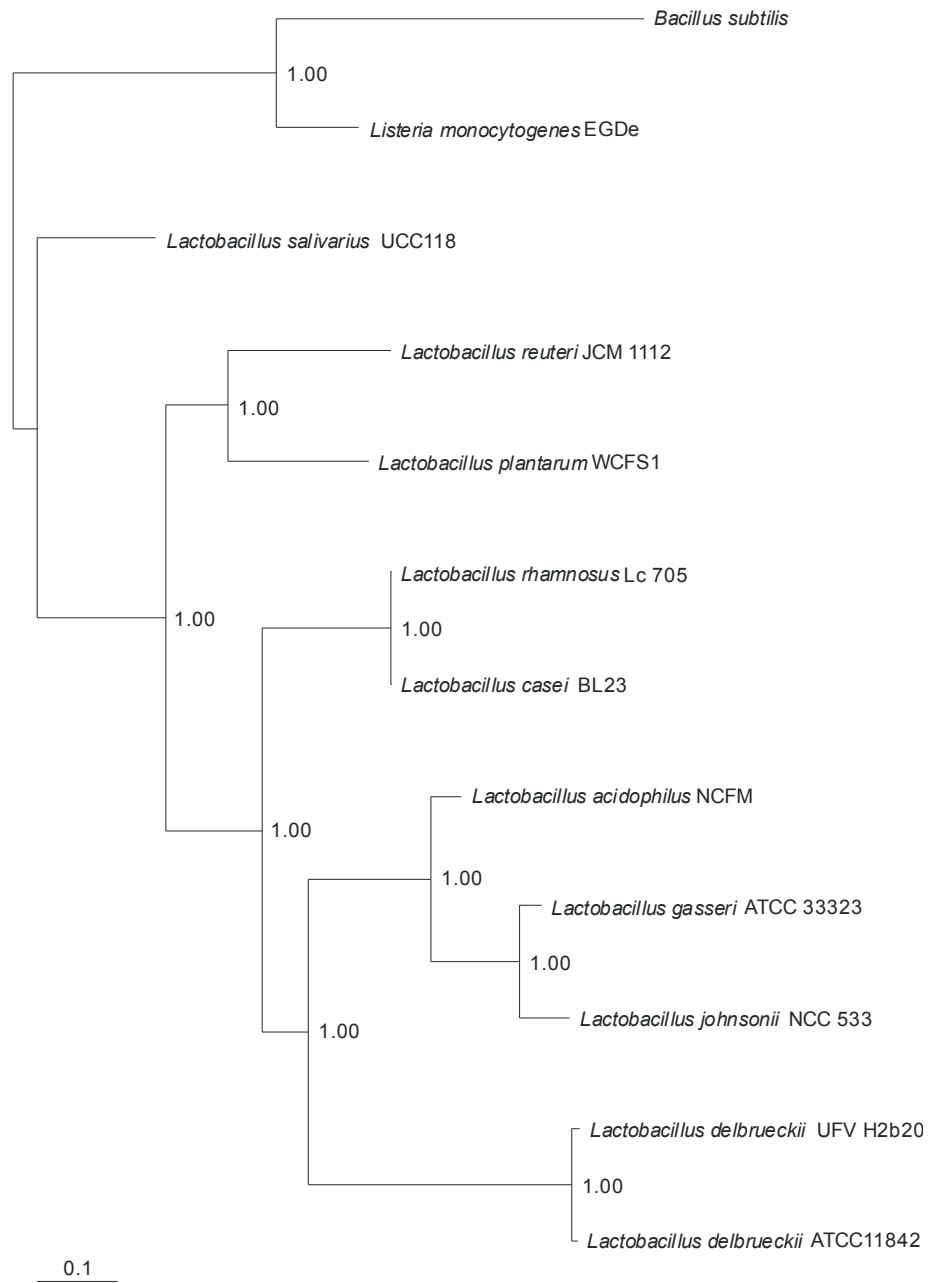


Figura 1. Árvore filogenética reconstruída por Inferência Bayesiana com ortólogos do gene *clpP*. *Listeria monocytogenes* EGDe e *Bacillus subtilis* 168 foram utilizados como grupo externo.

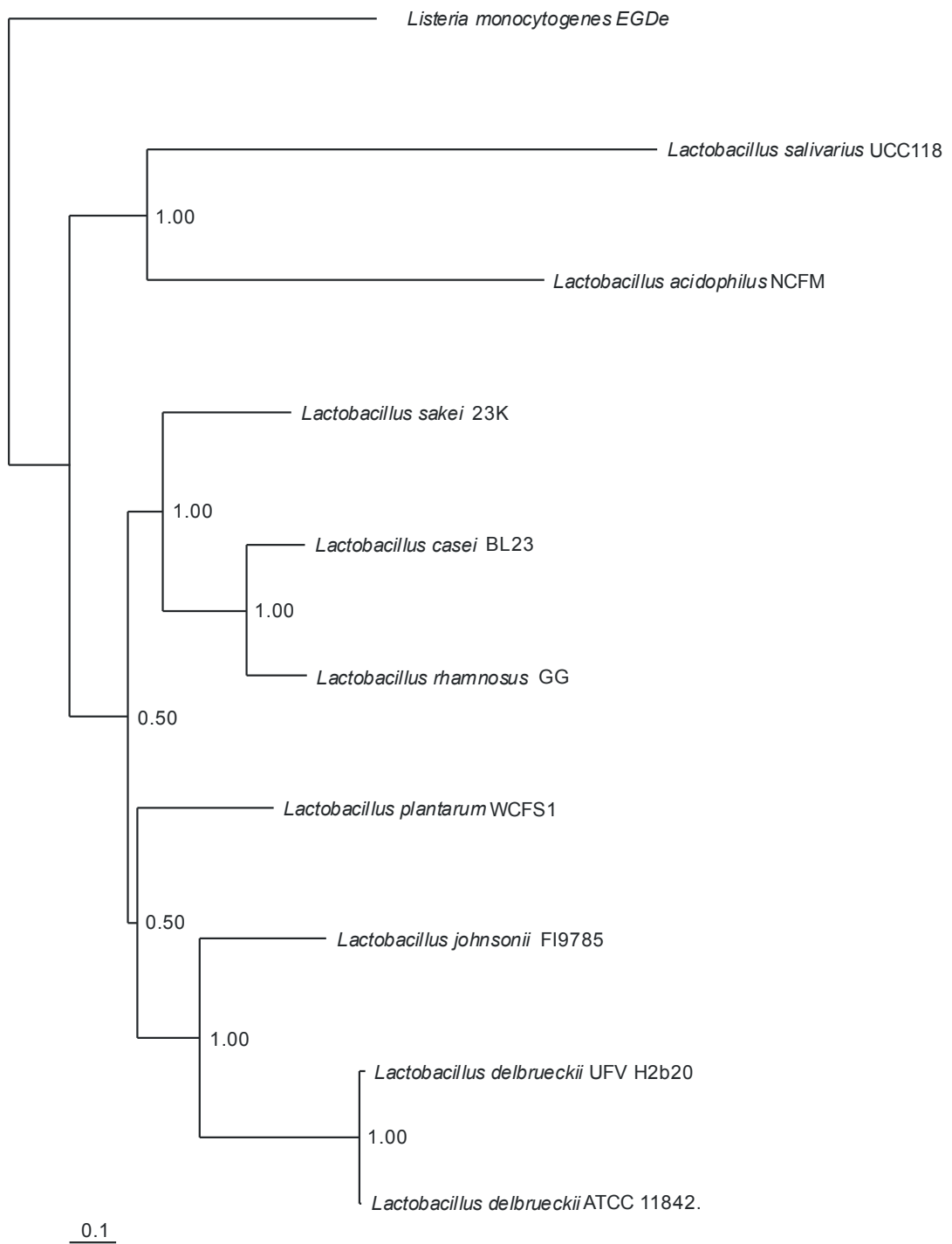


Figura 2. Árvore filogenética reconstruída por Inferência Bayesiana com ortólogos do gene *clpE*. *Listeria monocytogenes* EGDe foi utilizada como grupo externo.

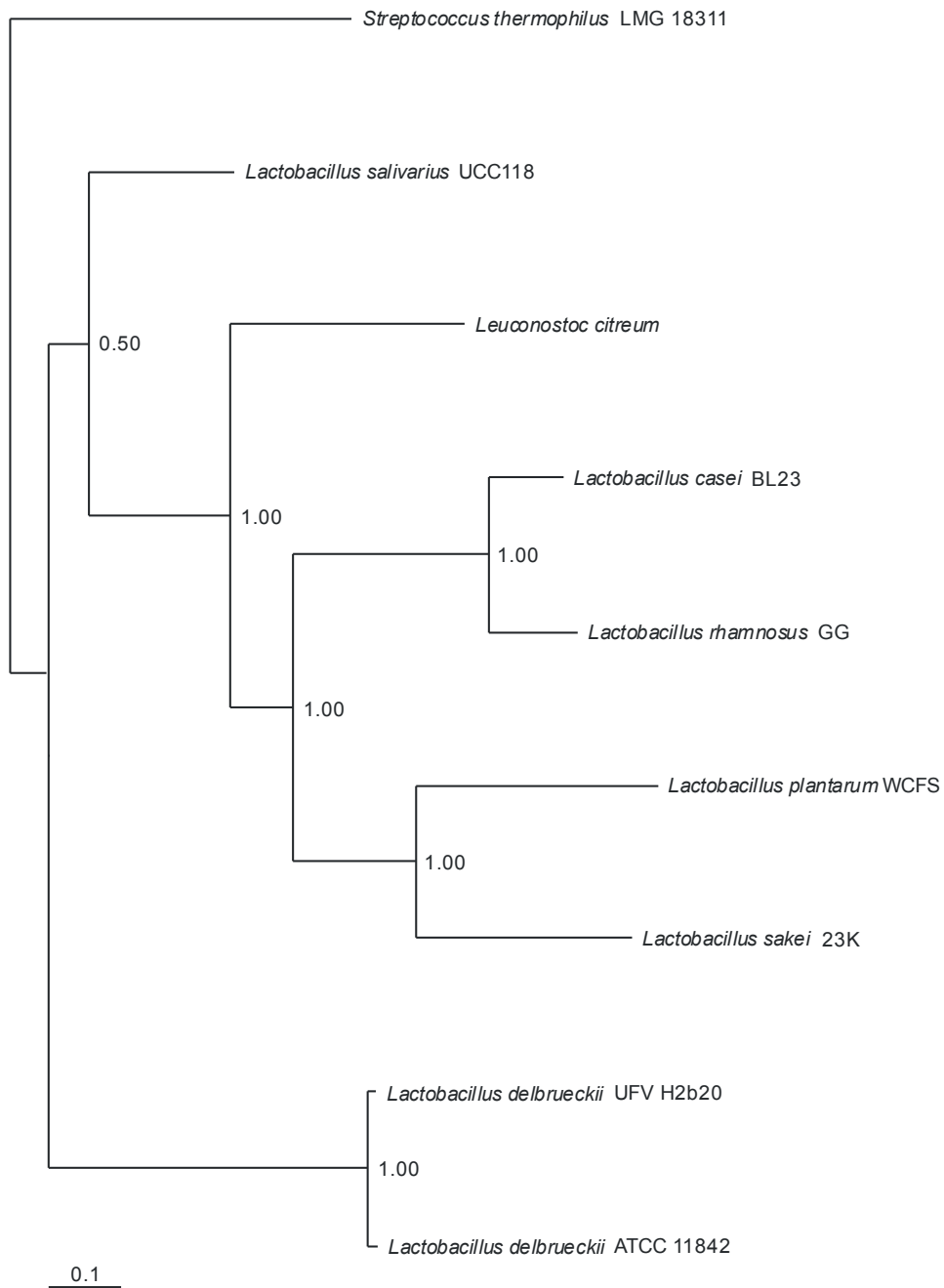


Figura 3. Árvore filogenética reconstruída por Inferência Bayesiana com ortólogos do gene *clpL*. *Streptococcus thermophilus* LMG18311 foi utilizado como grupo externo.

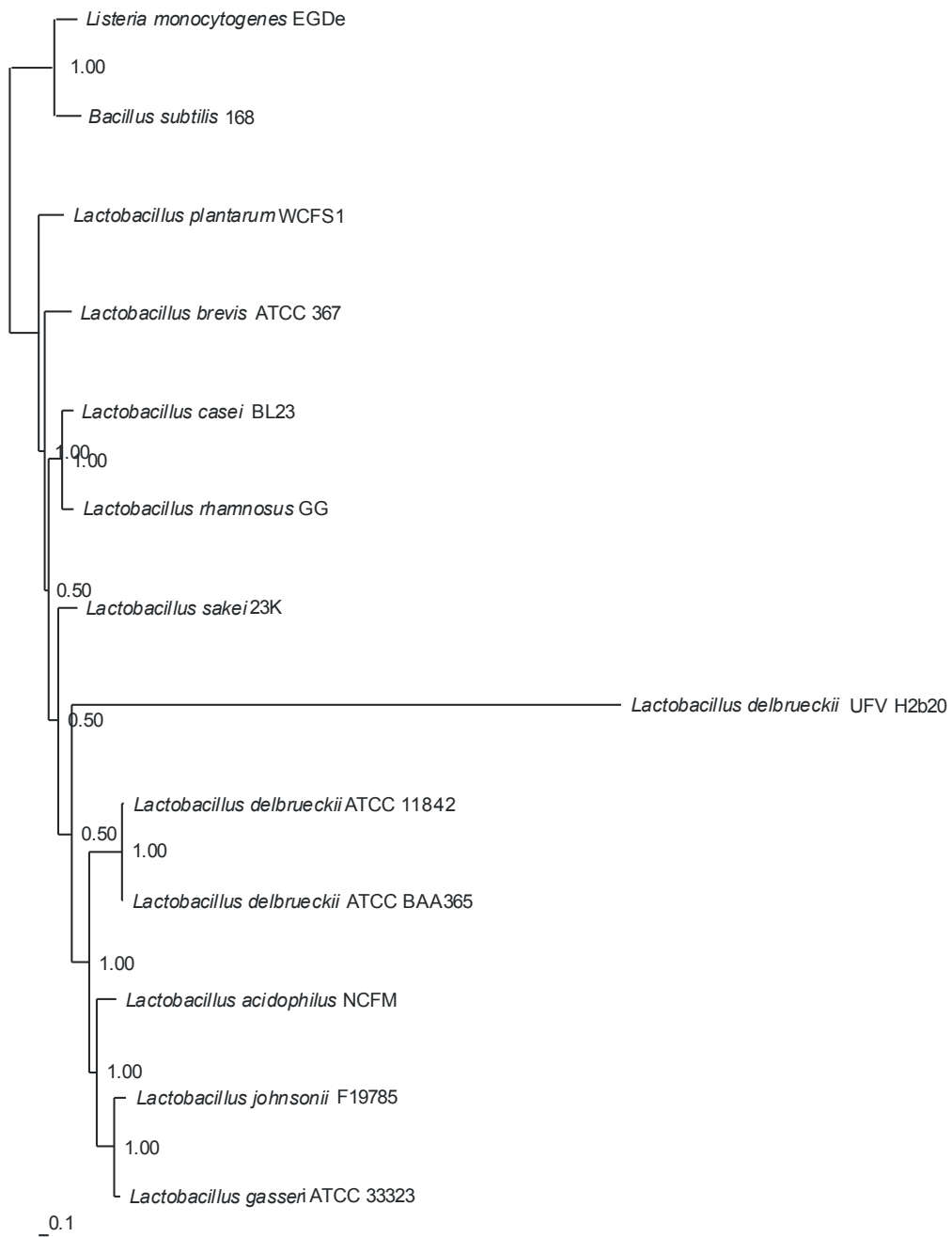


Figura 4. Árvore filogenética reconstruída por Inferência Bayesiana com ortólogos do gene *clpX*. *Listeria monocytogenes* EGDe e *Bacillus subtilis* 168 foram utilizados como grupo externo.

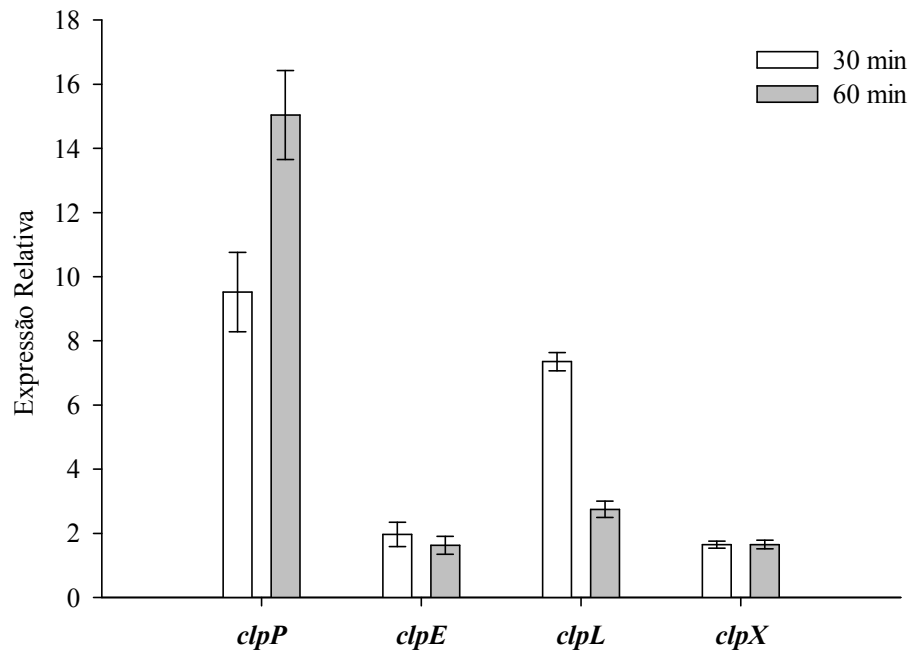


Figura 5. Expressão relativa normalizada dos genes *clpP*, *clpE*, *clpL* e *clpX* de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 exposto ao meio MRS pH 3,5 por 30 e 60 minutos. As barras correspondem ao nível de expressão relativa em relação ao tratamento controle, cujo valor é igual a 1. As barras de erro correspondem aos desvios-padrão.

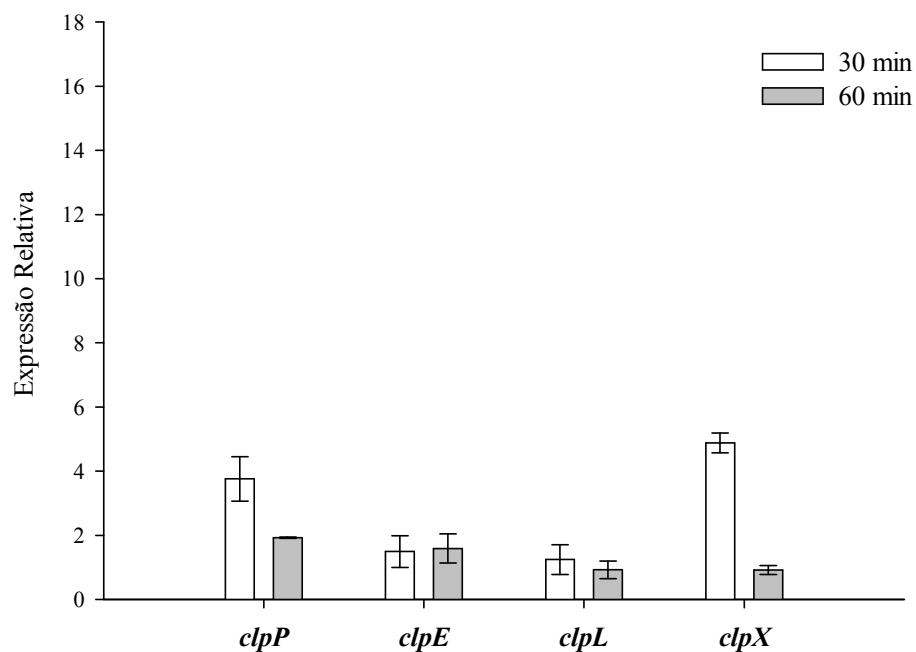


Figura 6. Expressão relativa normalizada dos genes *clpP*, *clpE*, *clpL* e *clpX* de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 exposto ao meio MRS acrescido de 0,1 % (p/v) de sais biliares mistos por 30 e 60 minutos. As barras correspondem ao nível de expressão relativa em relação ao tratamento controle, cujo valor é igual a 1. As barras de erro correspondem aos desvios-padrão.

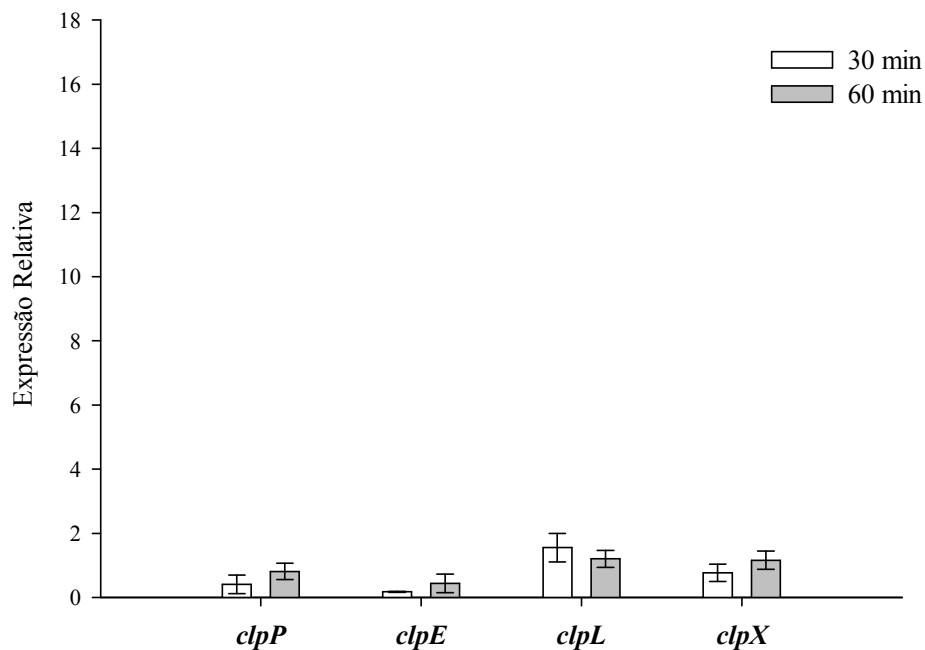


Figura 7. Expressão relativa normalizada dos genes *clpP*, *clpE*, *clpL* e *clpX* de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 exposto ao meio MRS acrescido de 0,1 % (p/v) de taurodeoxicólico por 30 e 60 minutos. As barras correspondem ao nível de expressão relativa em relação ao tratamento controle, cujo valor é igual a 1. As barras de erro correspondem aos desvios-padrão.

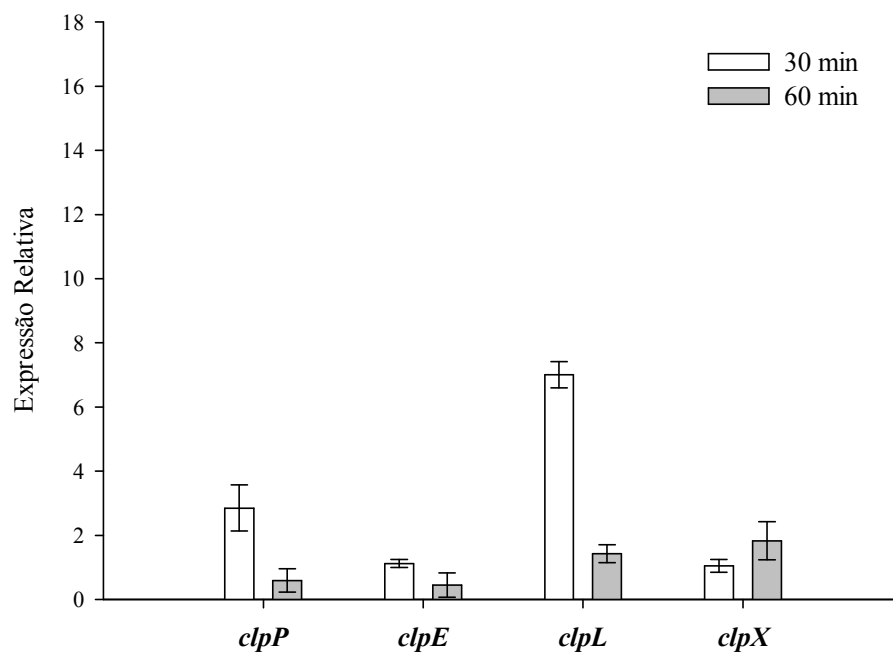


Figura 8. Expressão relativa normalizada dos genes *clpP*, *clpE*, *clpL* e *clpX* de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 exposto ao meio MRS acrescido de 0,1 % (p/v) de glicodeoxicólico por 30 e 60 minutos. As barras correspondem ao nível de expressão relativa em relação ao tratamento controle, cujo valor é igual a 1. As barras de erro correspondem aos desvios-padrão.

**Capítulo 4 - IDENTIFICAÇÃO, FILOGENIA MOLECULAR E ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS NA DESCARBOXILAÇÃO DE AMINOÁCIDOS EM *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 EXPOSTO AO ESTRESSE ÁCIDO**

# IDENTIFICAÇÃO, FILOGENIA MOLECULAR E ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS NA DESCARBOXILAÇÃO DE AMINOÁCIDOS EM *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 EXPOSTO AO ESTRESSE ÁCIDO

## RESUMO

O processo de descarboxilação de aminoácidos é importante para a manutenção do pH intracelular em células de bactérias sob condições de estresse ácido. Assim, o objetivo deste trabalho foi identificar e realizar análises filogenética e de expressão, por qRT-PCR, de dois genes que codificam proteínas envolvidas na descarboxilação de aminoácidos em *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 exposto ao estresse ácido. As sequências parciais dos genes que codificam ornitina descarboxilase e permease de aminoácido em *L. delbrueckii* UFV H2b20 apresentaram alta identidade de sequência e agruparam com as de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842. A análise de ortologia com o banco de dados *Cluster of Orthologous Groups* (COG) mostrou as proteínas codificadas por esses genes como integrantes da categoria funcional de Transporte e Metabolismo de Aminoácidos. As exposições das células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 em MRS pH 3,5, por 30 e 60 minutos provocaram aumento na expressão do gene que codifica a ornitina descarboxilase, sendo que a exposição por 60 minutos foi 7,5 vezes maior que no tratamento controle. Ao contrário, a expressão do gene que codifica a permease de aminoácido foi similar ao tratamento controle após a exposição por 30 minutos e menor após 60 minutos. O aumento da expressão do gene que codifica a ornitina descarboxilase após a exposição das células por 30 e 60 minutos em MRS, meio rico, mostra o envolvimento deste gene na resposta ao estresse ácido em *L. delbrueckii* UFV H2b20 e evidencia que a proteína codificada pelo gene identificado neste estudo é a envolvida na regulação do pH intracelular. Sugere-se a descarboxilação de aminoácidos como mecanismo de adaptação à condição de acidez do meio, uma característica desejável e necessária para culturas probióticas, e naturalmente de importância para a sobrevivência e persistência de *L. delbrueckii* UFV H2b20 no TGI de humanos.

Palavras-chave: *Lactobacillus*, estresse, descarboxilação de aminoácidos, PCR em tempo real

## 1. INTRODUÇÃO

As Bactérias do Ácido Lático (BAL) probióticas devem possuir genes envolvidos na resposta ao estresse ácido para a sobreviverem no trato gastrointestinal (TGI) (ZHU *et al.*, 2009). Dentre os mecanismos para manter a homeostase intracelular em bactérias Gram-positivas em relação ao pH encontram-se a bomba de prótons F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase, a descarboxilação de aminoácidos, a expressão de proteínas gerais de estresse, a produção de compostos alcalinos e a modificação da composição da membrana celular (COTTER e HILL, 2003; GOH e KLAENHAMMER, 2009).

A descarboxilação de aminoácido é de importância para manutenção do pH intracelular de células sob estresse ácido (AZCARATE-PERIL *et al.*, 2004). Nestas reações, um aminoácido é transportado para dentro da célula, onde a descarboxilação ocorre, um próton é consumido e o produto, uma amina, é exportado da célula. O resultado é o aumento do pH intracelular. Além disso, a extrusão da amina acoplada à entrada do substrato, o aminoácido, também pode contribuir para o aumento do pH extracelular (LEBEER *et al.*, 2008).

A Ornitina descarboxilase é uma enzima que, geralmente é induzida em pH ácido e também desempenha papel na manutenção da homeostase em relação ao pH, ao catalisar a conversão de ornitina a putrescina. Em *Escherichia coli*, a ornitina “biossintética” é expressa constitutivamente por todas as linhagens de *E. coli* crescidas em meio mínimo com pH neutro, enquanto a forma “biodegradativa” da enzima é induzida em 10 % das linhagens crescidas em meio rico com baixo valor de pH e, tem papel na regulação do pH intracelular (APPLEBAUM *et al.*, 1977).

O genoma de *L. acidophilus* NCFM codifica diversas proteínas envolvidas na resposta ao estresse, dentre elas a ornitina descarboxilase (ALTERMANN *et al.*, 2005), relacionada à tolerância ao meio ácido (AZCARATE-PERIL *et al.*, 2004). Em *L. acidophilus*, quatro genes que codificam homólogos envolvidos na descarboxilação de aminoácidos (antiporte, ornitina descarboxilase, permease de aminoácido e o regulador transcricional) foram associados com a tolerância ácida, sendo os mutantes dos quatro genes mais sensíveis ao baixo pH que a linhagem parental (AZCARATE-PERIL *et al.*, 2004). Entretanto, em *Lactobacillus curvatus* CTC273 a ornitina descarboxilase parece não estar envolvida na neutralização do

ambiente ácido, já que sua atividade é fortemente inibida sob essas condições (CID *et al.*, 2008). A troca de uma amina citoplasmática por um aminoácido externo resulta em efluxo de carga positiva com consequente geração de potencial de membrana. Este gradiente eletrostático, junto com o gradiente pH transmembrana, gera uma força próton-motora, que induz a entrada de prótons, que pode ser usada para síntese de ATP. Além disso, a produção de putrescina foi maior em meio com baixa concentração de glicose. Estes processos sugerem a descarboxilação de ornitina como um possível mecanismo para gerar energia em *L. curvatus* CTC273 quando a bactéria cresce em meio com baixa disponibilidade de glicose (CID *et al.*, 2008).

A filogenética molecular tem vantagens sobre a metodologia clássica uma vez que o DNA pode ser usado para comparar qualquer grupo de organismos. Além disso, é sabido que a mudança evolucionária segue um modelo mais ou menos regular, e assim torna possível o uso de modelos matemáticos para comparar DNAs de organismos distantemente relacionados, usando as sequências de nucleotídeos que contêm quantidade muito maior de informações quando comparadas as de caracteres morfológicos (NEI e KUMAR, 2000). As comparações podem ser feitas com o uso de métodos já consagrados na literatura e que exigem quantidade de dados e poder computacional cada vez maiores, como os denominados de: *Neighbor-Joining*, Máxima Parcimônia, Máxima Verossimilhança e de inferência Bayesiana (BOLLBACK, 2002; FELSENSTEIN, 2004). O de inferência Bayesiana é atualmente o de utilização mais ampla, por possibilitar uma análise rápida de grande volume de dados e por ser a sua base estatística robusta e com modelos evolutivos complexos (BOLLBACK, 2002).

A caracterização é o primeiro passo na prospecção de genes possivelmente envolvidos na probiose e as tecnologias de genômica funcional são necessárias para demonstrar o envolvimento desses genes na regulação do estado fisiológico dos probióticos em condições determinadas (CALLANAN *et al.*, 2005; LEBEER *et al.*, 2008). Desta forma, estes estudos resultam em estratégias para melhorar a robustez de linhagens com potencial para uso em aplicação industrial (ZHU *et al.*, 2009).

Assim, este trabalho teve por objetivo identificar e realizar análises filogenética e de expressão de dois genes envolvidos no processo de descarboxilação de aminoácidos que codificam uma ornitina descarboxilase e uma permease de

aminoácido, para compreender melhor o papel dos mesmos na resposta ao estresse ácido em *L. delbrueckii* UFV H2b20.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Linhagem e condições de cultivo**

Culturas estoque de *L. delbrueckii* UFV H2b20, isolado a partir de material fecal de crianças recém-nascidas (SANTOS, 1984) foram preparadas, congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -80 °C em caldo MRS, contendo 20 % de glicerol. As células foram reativadas em leite desnatado reconstituído (LDR) em água para concentração final de 10 % (p/v), e inoculadas em 5 mL de meio MRS contendo 2 % de glicose.

### **2.2. Extração de DNA total de *L. delbrueckii* UFV H2b20**

O DNA de *L. delbrueckii* UFV H2b20 foi extraído utilizando o kit Wizard Genomic DNA purification kit (Promega), seguindo as recomendações do fabricante ou o protocolo adaptado no laboratório de Microbiologia Industrial do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil (MAGALHÃES *et al.*, 2008).

### **2.3. Seleção de *primers* e detecção dos genes alvos**

Para amplificação dos genes que codificam proteínas envolvidas na descarboxilação de aminoácidos foram desenhados *primers* (Tabela 1) baseados nas sequências de nucleotídeos de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842 (NC008054), sendo os genes codificadores de ornitina descarboxilase (Ldb0547 e Ldb1775); e de permease de aminoácido (Ldb0539), disponíveis no banco de dados *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Para a seleção dos *primers* foi utilizada a ferramenta *Primer-Blast*, disponível no NCBI e a qualidade dos mesmos foi verificada pelo programa *OligoAnalyzer* 3.1 (<http://www.idtdna.com>).

As reações de amplificação foram conduzidas em volume total de 25 µL, utilizando-se a DNA polimerase Gotaq (Promega) segundo instruções do fabricante e 25 ng de DNA total de *L. delbrueckii* UFV H2b20 como molde. Para determinar a

temperatura de anelamento a ser utilizada com cada par de *primer* foi utilizado o termociclador com gradiente programável Bio-Rad iClicer (Techne TC 512) (Tabela 1).

#### **2.4. Clonagem e sequenciamento dos genes**

Os DNAs amplificados foram clonados em pGEM-T Easy Vector (Promega), como instruções do fabricante, e transformados em *Escherichia coli* JM109 por choque térmico, conforme técnicas padrão (SAMBROOK, 1989). Os insertos foram sequenciados no sequenciador MegaBACE™ 500 de 48 capilares (GE Healthcare) no Laboratório de Genômica, UFV e a análise das sequências foi realizada utilizando-se o programa Sequencher 4.1.4. (Gene Codes Corporation).

#### **2.5. Análise comparativa de genes e Análise filogenética**

Para cada sequência obtida foi feita uma busca de identidade com a utilização do programa *Basic Local Alignment Search Tool* para nucleotídeos (BLASTn). A seguir, foram realizadas buscas de ortologia no banco de dados COG, uma vez que o objetivo foi o de reconstruir a história evolutiva dos genes. As sequências de genes ortólogos foram utilizadas para a reconstrução de árvores filogenéticas por Inferência Bayesiana no programa MrBayes 3.1, utilizando o método Markov chain Monte Carlo para 10 milhões de gerações. Foram feitas duas corridas independentes com quatro cadeias simultâneas, usando as configurações originais do programa. O modelo de substituição de nucleotídeos usado foi o estabelecido pelo programa MrModelTest, usando o critério Akaike (POSADA & BUCKLEY, 2004). As árvores foram amostradas a cada 1000 gerações e 25 % delas foram descartadas como “burn-in”. A probabilidade posterior, representada em cada nó da árvore construída, representa uma indicação do suporte daquele nó baseado no conjunto de dados.

#### **2.6. Preparação das células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 para extração de RNA**

Células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 congeladas foram reativadas em LDR 10% (p/v) e, transferidas para placa contendo MRS ágar. Para cada tratamento foram preparados 10 tubos contendo 3 mL de MRS. Em cada tubo foram transferidas três colônias que foram cultivadas até atingir D.O.<sub>600</sub> de 0,5. Alíquota de 1 mL de cada uma das culturas crescidas foram transferidas para um microtubo de 1,5 mL,

totalizando 10 microtubos. Em seguida, as células foram centrifugadas, ressuspensas em 1 mL de MRS de acordo com cada tratamento. Alíquotas de 100 µL da suspensão de cada um dos 10 microtubos foram transferidas para um tubo de 1,5 mL, com volume final de 1 mL, e centrifugadas. O sedimento nos tubos foi congelado no próprio microtubo em nitrogênio líquido e estocado a -80 °C para posterior extração de RNA. Foram realizados os seguintes tratamentos: 1. Controle (MRS pH 6,7); 2. Estresse ácido (MRS pH 3,5). As amostras foram mantidas em cada uma destas condições por 30 e 60 minutos.

### **2.7. Extração de RNA e síntese de cDNA**

As células tratadas e armazenadas a -80 °C foram descongeladas, ressuspensas em 300 µL de TE pH 7,4 acrescido de 5 µL de lisozima (50 mg mL<sup>-1</sup>) e mantidas por 35 minutos a 37 °C em banho-maria. A extração do RNA foi feita utilizando-se Trizol (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. A pureza e quantificação do RNA foram determinadas utilizando-se o espectrofotômetro Evolution Thermo Scientific™. O RNA (2 µg) foi tratado com DNase (Promega), conforme instruções do fabricante e 400 ng do RNA tratado foi utilizado para síntese do cDNA, utilizando kit *ImProm-II™ Reverse Transcription System* (Promega), segundo instruções do fabricante.

### **2.8. qRT-PCR**

A verificação do nível de expressão dos genes codificadores de ornitina descarboxilase e de permease de aminoácidos foi realizada por qRT-PCR. As sequências parciais desses genes, previamente obtidas por sequenciamento, foram utilizadas para seleção de *primers* específicos para qRT-PCR (Tabela 2). O gene homólogo a *sigA* foi o utilizado como gene controle ou de referência após a verificação de que a expressão do mesmo não foi significativamente afetada sob as condições experimentais. A presença de um único amplicon foi inicialmente testada por PCR convencional, utilizando-se cDNA de *L. delbrueckii* UFV H2b20. Os resultados foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida (8 %).

As análises quantitativas foram realizadas em termociclador CFX96™ Real-Time PCR detection systems – C100™ Thermal Cycler (Bio-Rad), utilizando *Fast SYBER Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems) para monitorar a síntese de

DNA fita dupla. As reações foram montadas em volume final de 12  $\mu$ L, conforme instruções do fabricante. Todas as amostras foram analisadas em triplicata. As eficiências de reação foram determinadas (PFALL, 2001; BUSTIN *et al.*, 2005) e a especificidade da amplificação foi determinada por meio da análise das curvas de dissociação. A determinação da expressão relativa foi feita pelo método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Identificação e Filogenia Molecular dos genes que codificam ornitina descarboxilase e permease de aminoácido em *L. delbrueckii* UFV H2b20

A sequência parcial do gene codificador de ornitina descarboxilase de *L. delbrueckii* UFV H2b20 apresentou 96 % de identidade e a do gene codificador de permease de aminoácidos correspondeu a 98 %, com as de *L. delbrueckii* ATCC 11842 (Tabela 3). As proteínas codificadas por esses genes pertencem à mesma categoria funcional, ou seja, Transporte e Metabolismo de Aminoácidos, conforme análise da anotação funcional do banco de dados COG (Tabela 4).

*Lactobacillus delbrueckii* ATCC 11842 possui dois genes (VAN DE GUCHTE *et al.*, 2006) que codificam as proteínas ornitina descarboxilase (Ldb0547 e Ldb1775) e apresentam 65 % de identidade entre si, segundo análise no banco de dados BlastN. Algumas bactérias contêm duas formas de ornitina descarboxilase, uma “biossintética” e outra “biodegradativa” (APPLEBAUM *et al.*, 1975). Entretanto, até o momento não foram encontrados registros de informações se os dois genes, codificadores de ornitina descarboxilase, presentes no genoma de *L. delbrueckii* ATCC 11842 correspondem a essas diferentes formas.

As duas reações utilizando os dois pares de *primers* selecionados (Tabela 1), para a detecção de cada um desses dois genes codificadores de ornitina descarboxilase em *L. delbrueckii* UFV H2b20 mostraram a presença de apenas um gene em *L. delbrueckii* UFV H2b20, a reação utilizando o par de *primer* selecionado a partir da sequência Ldb0547 foi positiva. A reação com o *primer* selecionado a partir da sequência Ldb1775 não resultou em amplificação. Esse resultado sugere a presença de apenas um gene que codifica a ornitina descarboxilase em *L. delbrueckii*

UFV H2b20, ou a sequência de outro possível gene seja muito distinta da sequência de *L. delbrueckii* ATCC 11842, não sendo por isso, detectada por PCR.

A árvore filogenética reconstruída para o estudo da história evolutiva do gene que codifica a ornitina descarboxilase (Figura 1), utilizando ortólogos do respectivo gene (Tabela 4), mostrou que a sequência parcial do gene de *L. delbrueckii* UFV H2b20 agrupou com a de *L. delbrueckii* ATCC 11842 e *L. delbrueckii* BAA 356 (Figura 1). Este agrupamento, associado ao valor de identidade (Tabela 3), confirma a identidade da linhagem, mesmo considerando que *L. delbrueckii* UFV H2b20 apresenta características específicas que a distingue de outras bactérias dessa espécie, especialmente no que se refere à probiose. Até o momento, não há relatos na literatura de linhagens de *L. delbrueckii* com funções probióticas.

Em relação aos probióticos, o gene codificador de ornitina descarboxilase de *L. delbrueckii* UFV H2b0 é filogeneticamente próximo ao de *L. casei* BL23 (Figura 1). Pela filogenia do rRNA 16S as duas espécies não pertencem ao mesmo grupo (SCHLIFER e LUDWIG, 1995; FELIS e DELLAGLIO, 2005) e apresentam significativa diferença em relação ao tamanho do genoma, 1,86 Mbp em *L. delbrueckii* ATCC 11842 (VAN DE GUCHTE *et al.*, 2006) e 3,0 Mbp em *L. casei* (MAKAROVA *et al.*, 2006). Entretanto, a linhagem *L. delbrueckii* foi isolada do TGI de humanos (SANTOS, 1984) e, compartilha, portanto, o mesmo nicho ecológico de *L. casei* BL 23, linhagem probiótica e habitante comum do TGI de humanos (ZHU *et al.*, 2009).

A sequência parcial do gene que codifica a permease de aminoácido de *L. delbrueckii* UFV H2b0 agrupou com a de *L. delbrueckii* ATCC 11842 e, em relação aos probióticos, apresenta-se próxima filogeneticamente a de *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 (Figura 2), linhagem probiótica (PRIDMORE *et al.*, 2004). *Lactobacillus delbrueckii* e *L. johnsonii* pertencem ao mesmo grupo pela filogenia do rRNA 16S (SCHLIFER e LUDWIG, 1995; FELIS e DELLAGLIO, 2005) e os estudos de genômica comparativa *in silico* mostraram extensiva similaridade de sequência de proteínas e sintenia dos genomas de *L. johnsonii* NCC 533 com o de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842 (BERGER *et al.*, 2007). Aproximadamente 55 a 60 % das proteínas de *L. delbrueckii* apresentam homólogos em *L. johnsonii* e 25 a 35 % das proteínas são únicas as de *L. delbrueckii* (VAN DE GUCHTE *et al.*, 2006).

Neste estudo, a reconstrução filogenética dos genes codificadores de ornitina descarboxilase e permease de aminoácido confirmou a filogenia do rRNA 16S de *L. delbrueckii* UFV H2b20, conforme trabalho anterior (MAGALHÃES *et al.*, 2008). Estudos filogenéticos podem auxiliar na elucidação da história evolutiva e na taxonomia dos *Lactobacillales*, especialmente porque a classificação desse grupo não pode ser considerada como totalmente resolvida.

### **3.2. Análise da expressão relativa dos genes que codificam a ornitina descarboxilase e a permease de aminoácido em *L. delbrueckii* UFV H2b20**

A análise da expressão relativa por RT-qPCR dos genes que codificam a ornitina descarboxilase e a permease de aminoácidos foi realizada para verificar se os mesmos estão envolvidos na resposta das células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 ao estresse ácido. As exposições das células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 em MRS pH 3,5, por 30 e 60 minutos provocaram aumento na expressão do gene que codifica a ornitina descarboxilase, sendo que a exposição por 30 minutos foi 1,1 vezes maior que no tratamento controle e por 60 minutos, 7,5 vezes maior (Figura 3). Ao contrário, a expressão do gene que codifica a permease de aminoácido foi similar ao tratamento controle após a exposição por 30 minutos e menor após 60 minutos (Figura 3). A maior expressão do gene que codifica a ornitina descarboxilase em MRS pH 3,5, meio rico, mostra o envolvimento desse gene na resposta ao estresse ácido em *L. delbrueckii* UFV H2b20 e evidencia que a proteína codificada por esse gene é a envolvida na regulação do pH intracelular nesta bactéria.

O envolvimento do gene codificador da ornitina descarboxilase na resposta ao estresse ácido foi também demonstrado em *L. acidophilus* NCFM e os mutantes desse gene apresentaram maior sensibilidade à acidez do meio que a linhagem parental (AZCARATE-PERIL *et al.*, 2004). Entretanto, em *L. curvatus* CTC273 a descarboxilação de ornitina parece não ser um mecanismo para neutralizar o ambiente ácido, pois a atividade da enzima foi fortemente inibida nessa condição e a produção de putrescina foi maior em meio com baixa concentração de glicose (CID *et al.*, 2008). Assim, estudos adicionais são necessários para verificar a função desse gene e o seu envolvimento na resposta ao estresse ácido em *Lactobacillus*. Adicionalmente, deve-se levar em consideração que os mecanismos moleculares envolvidos na resposta ao estresse geralmente são específicos da linhagem e não

podem ser generalizados. Os dados sugerem que o gene que codifica a ornitina descarboxilase em *L. acidophilus* NCFM possivelmente codifica a proteína envolvida na regulação do pH intracelular e o gene identificado em *L. curvatus* codifica a proteína envolvida na geração de energia.

Em resumo, os resultados obtidos no presente estudo mostraram o envolvimento do gene que codifica a ornitina descarboxilase na resposta ao estresse ácido e evidenciou que a proteína codificada pelo gene identificado em *L. delbrueckii* UFV H2b20 é a envolvida na regulação do pH intracelular. Sugere-se a descarboxilação de aminoácidos como mecanismo de adaptação à condição de acidez do meio, uma característica desejável e necessária para culturas probióticas, e naturalmente de importância para a sobrevivência e persistência de *L. delbrueckii* UFV H2b20 no TGI de humanos.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTERMANN, E., RUSSELL, W. M., AZCARATE-PERIL, M. A., BARRANGOU, R., BUCK, B. L., McAULIFFE, O., DOBSON, A., CALLANAN, M., LICK, S., HAMRICK, A., CANO, R., KLAENHAMMER, T. R. Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. **PNAS**, 102:3906-3912, 2005.

APPLEBAUM, D., DUNLAP, J. C., MORRIS, D. R. Comparison of the Biosynthetic and Biodegradative Ornithine Decarboxylases of *Escherichia coli*. **Biochemistry**, 16:1580-1585, 1977.

AZCARATE-PERIL, M. A., ALTERMAN, E., HOOVER-FITZULA, R. L., CANO, R. J., KLAENHAMMER, T. R. Identification and inactivation of genetic loci involved with *Lactobacillus acidophilus* acid tolerance. **Applied and Environmental Microbiology**, 70:5315-5322, 2004.

BERGER, B., PRIDMOREE, R. D., BARREO, C., DELMAS-JULIEN, F., SCHREIDER, K., ARIGONI, F., BRUSSOW, H. Similarity and differences in the *Lactobacillus acidophilus* group identified by polyphasic analysis and comparative genomics. **Journal of Bacteriology**, 189:1311-1321, 2007.

BOLLBACK, J. P. Bayesian model adequacy and choice in phylogenetics. **Molecular Biology and Evolution**, 19:1171-1180, 2002.

BUSTIN, S. A., BENES, V., NOLAN, T., PFALL, M.W. Quantitative real-time RT-PCR –a perspective. **Journal of Molecular Endocrinology**, 34:597-601, 2005.

CALLANAN, M. Mining the probiotic genome: advanced strategies, enhanced benefits, perceived obstacles. **Current Pharmaceutical Design**, 11:25-36, 2005.

CID, S. B., MIGUÉLEZ-ARRIZADO, M. J., BECKER, B., HOLZAPFEL, W. H., CAROU, C. V. Amino acid decarboxylation by *Lactobacillus curvatus* CTC273 affected by the pH and glucose availability. **Food Microbiology**, 25:269-277, 2008.

COTTER, P. D., HILL, C. Surviving the acid test: responses of Gram-positive bacteria to low pH. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 67:429-453, 2003.

FELIS, G. E., DELLAGLIO, F. Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. **Current Issues Intestinal Microbiology**, 8:44-61, 2005.

FELSENSTEIN, J. **Inferring phylogenies**. Massachusetts: Ed. Sinauer. 2004. 664 p.

GOH, Y. J., KLAENHAMMER, T. R. Genomic features of *Lactobacillus* species. **Frontiers in Bioscience**, 14:1362-1386, 2009.

LEBEER, S., VANDERLEYDEN, J., DE KEERSMAECKER, S. C. J. Genes and Molecules of Lactobacilli Supporting Probiotic Action. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 72:728-764, 2008.

LIVAK, K. J., SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Method. **Methods**, 25:402-408, 2001.

MAGALHÃES, J. T., UETANABARO, A. P. T., MORAES, C.A. Identification of *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 (Probiotic strain) using DNA-DNA hybridization. **Brazilian Journal of Microbiology**, 39:524-546, 2008.

MAKAROVA, K., SLESAREV, A., WOLF, Y., SOROKIN, A., MIRKIN, B., KOONIN, E., PAVLOV, A., PAVLOVA, N., KARAMYCHEV, V., POLOUCHINE, N., *et al.* Comparative genomics of the lactic acid bacteria. **PNAS**, 103: 15611-15616, 2006.

NEI, M., KUMAR, S. **Molecular evolution and phylogenetics**. New York: Ed. Oxford, 2000. 333 p.

PFALL, M. W. A new mathematic model for relative quantification in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, 29: 45-53, 2001.

POSADA, D., BUCKEY, T. R. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. **Systematic Biology**, 53:793-808, 2004.

PRIDMORE, R.D., BERGER, B., DESIERE, F., VILANOVA, D., BARRETTO, C., PITTET, A. C., ZWAHLEN M. C., ROUVET, M., ALTERMANN, E., BARRANGOU., *et al.* The genome sequence of the probiotic intestinal bacterium *Lactobacillus johnsonii* NCC 533. **PNAS**, 101:2512-2517, 2004.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. **Molecular cloning a laboratory manual**, 3. Cold Spring Harbor: Laboratory Press, 1989.

SANTOS, N. S. **Isolamento e caracterização de *Lactobacillus acidophilus* de fezes de crianças alimentadas ao seio e de bezerros, visando sua utilização como adjunto dietético**. Viçosa, 69p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, 1984.

SCHLEIFER, K.H., LUDWIG, W. Phylogeny of the genus *Lactobacillus* and related genera. **Systematic and Applied Microbiology**, 14:461-467, 1995.

VAN DE GUCHTE, M., PENAUD, S., GRIMALDI, C., BARBE, V., BRYSON, K., NICOLAS, P., ROBERT, C., *et al.* The complete genome sequence of *Lactobacillus bulgaricus* reveals extensive and ongoing reductive evolution. **PNAS**, 103:9275-9279, 2006.

ZHU, Y., ZHANG, Y., LI, Y. Understanding the industrial application potential of lactic acid bacteria through genomics. **Applied Microbiology Biotechnology**, 83:597-610, 2009.

Tabela 1. Sequências dos *primers* e temperatura de anelamento utilizados na amplificação dos genes que codificam proteínas envolvidas na descarboxilação de aminoácidos de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20

Gene	Primer (5'-3') <sup>a</sup>	Temperatura de anelamento
Ornitina descarboxilase	Ornf - CGCCTCTGTGACTACATCC	57,1 °C
	Omr - GACATTTACTCCCGCTTGCTT	
Ornitina descarboxilase	Ornf1 - GCAAAGATAGACCCAGAAC	50,3 °C
	Omr1 - CCAGGAGCGACAATAAATAC	
permease	permf- TCATCGGGGCCGCCCTCT	47 °C
	permr- GGCAGGCCCAGGAGGGTGAT	

<sup>a</sup>*Primers* selecionados com base nas sequências de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842.

Tabela 2. Sequências de *primers* utilizados no estudo de expressão de genes por qRT-PCR em *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 exposto ao estresse ácido

Gene alvo	<i>Primer</i> (5'-3')	Tamanho do amplicon
<i>sigA</i>	Ldb1245f - AGCCAAGAACCAGGAAAC Ldb1245r - GTCAGGAACTCACCCATC	147
ornitina descarboxilase	qOrnf - AGCCCCTCGTTCCCCCACTG qOrnr - GGGCAACTTCACCCGGAGCA	124
permease de aminoácido	qpermf - CGGCGTGGTTCTTTTGCTCTTTT qpermr - AGACTGACGGAGACTTGCGGG	146

<sup>a</sup> Os *primers* foram selecionados com base nas sequências parciais dos genes de *L. delbrueckii* UFV H2b20 obtidas por sequenciamento.

Tabela 3. Tamanho das sequências parciais dos genes que codificam as proteínas ornitina descarboxilase e permease de aminoácidos de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 e valores de identidades em relação aos genes de *Lactobacillus delbrueckii* ATCC 11842

<b>Gene</b>	<b>Sequência obtida <sup>a</sup></b>	<b>Tamanho da sequência <sup>b</sup></b>	<b>Identidade (BlastN)</b>
Ornitina descarboxilase	1143pb	2088pb	96%
permease de aminoácido	808pb	1293pb	98%

<sup>a</sup>Sequências parciais em pares de bases(pb) obtidas do sequenciamento dos genes de *L. delbrueckii* UFV H2b20

<sup>b</sup>Sequências dos genes em pares de bases (pb) de *L.delbrueckii* ATCC 11842, disponíveis no banco de dados NCBI

Tabela 4. Anotação funcional de genes envolvidos na descarboxilação de aminoácidos e seus ortólogos em Bactérias do Ácido Lático

Genes <sup>a</sup>	Ortólogos <sup>b</sup>	COG <sup>c</sup>	Anotação Funcional	
			Categoria	Descrição
		<b>Ornitina descarboxilase</b>		
Ldb0547	FI9785_1797; LJ1843; LSL_0138; lhv_1093; LBUL_0489; LBA0996; LGAS_1881; LCABL_18700; LC705_01682; BSU00270	1982E	Transporte e metabolismo de aminoácido	Metabolismo
		<b>Permease de aminoácido</b>		
Ldb0539	LBA0729; LCABL_30760; LJ0809; LSL_1942; lhv_2036; LAR_0437; lp_2799; LMOF2365_2442; SMU.16	0531E	Transporte e metabolismo de aminoácido	Metabolismo

<sup>a</sup> Genes de *L. delbrueckii* ATCC 11842, disponíveis no banco de Dados NCBI

<sup>b</sup> Nomenclatura conforme NCBI

<sup>c</sup> Códigos das categorias funcionais conforme o banco de dados *Cluster Orthologous of Groups* (COG)

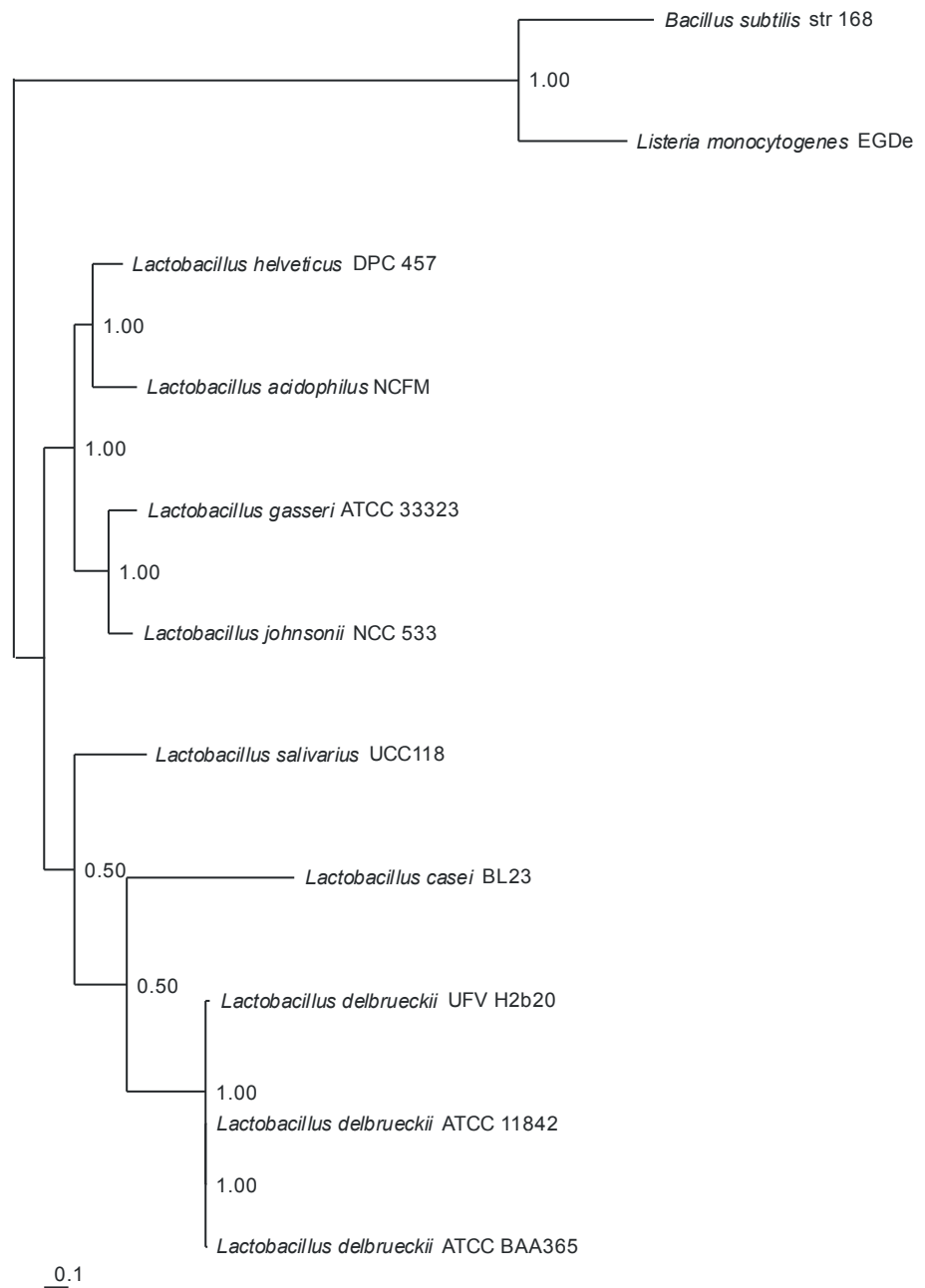


Figura 1. Árvore filogenética reconstruída por Inferência Bayesiana com ortólogos do gene que codifica a ornitina descarboxilase. *Bacillus subtilis* str168 e *Listeria monocytogenes* EGDe foram utilizados como grupo externo.

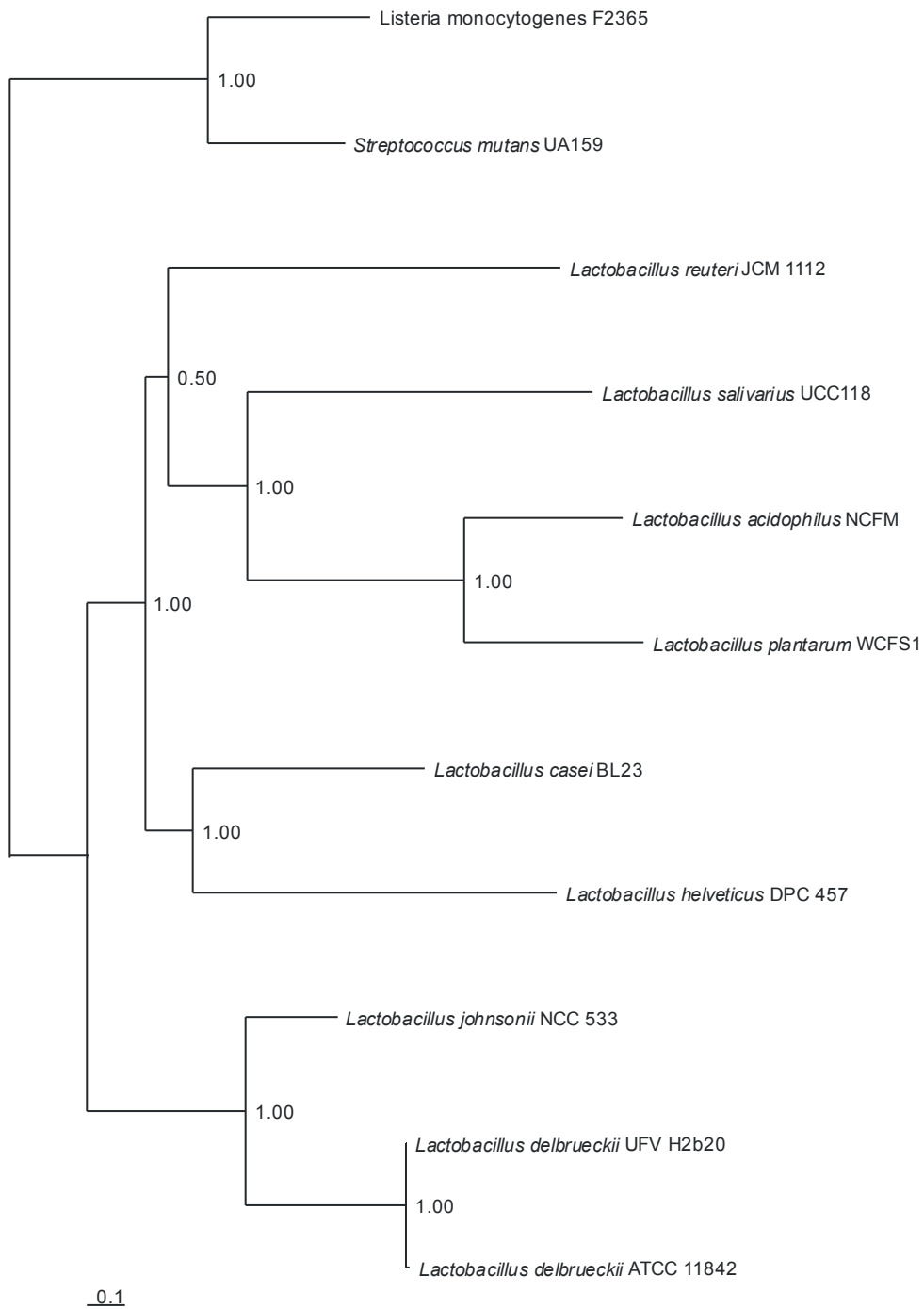


Figura 2. Árvore filogenética reconstruída por Inferência Bayesiana com ortólogos do gene que codifica a permease de aminoácido. *Streptococcus mutans* UA159 e *Listeria monocytogenes* F2365 foram utilizados como grupo externo.

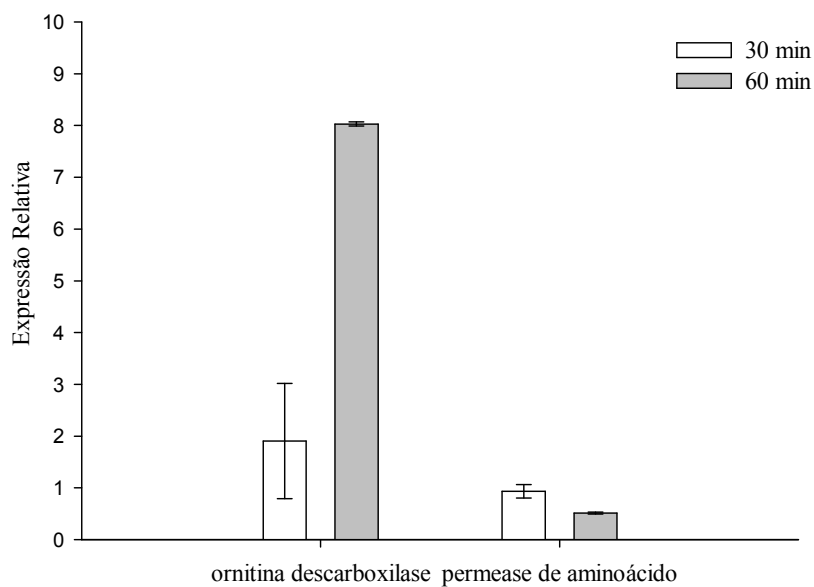


Figura 3. Expressão relativa normalizada dos genes que codificam as proteínas ornitina descarboxilase e permease de aminoácidos de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 exposto ao estresse ácido (pH 3,5) por 30 e 60 minutos. As barras correspondem ao nível de expressão relativa em relação ao tratamento controle, cujo valor é igual a 1. As barras de erro correspondem aos desvios-padrão.

**Capítulo 5 - EXPRESSÃO DOS GENES *spx*, *dps* e *pox* EM *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 EXPOSTO AOS ESTRESSES ÁCIDOS E POR SAIS BILIARES**

## **EXPRESSÃO DOS GENES *spx*, *dps* e *pox* EM *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 EXPOSTO AOS ESTRESSES ÁCIDOS E POR SAIS BILIARES**

### **RESUMO**

O fenômeno de proteção cruzada, no qual a adaptação a uma condição de estresse também protege contra outro estresse é bem caracterizado e é de importância para a sobrevivência de espécies de *Lactobacillus* no trato gastrointestinal (TGI). Em *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 os genes *spx*, *dps* e *pox* estão envolvidos na resposta da bactéria ao estresse oxidativo. Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar a base molecular envolvida no fenômeno de proteção cruzada com o envolvimento dos genes *spx*, *dps* e *pox* às respostas aos estresses ácidos e por presença de sais biliares em *L. delbrueckii* UFV H2b20. A exposição das células em meio MRS, pH 3,5 por 30 e 60 minutos provocou o aumento da expressão dos genes *spx*, *dps* e *pox*, comparado ao tratamento controle. Em concentração de 0,1 % de sais biliares mistos em MRS, a expressão do gene *spx* aumentou após a exposição das células por 30 minutos e o aumento da expressão de *pox* ocorreu somente após 60 minutos. Por outro lado, em meio MRS contendo 0,1 % de ácido taurodeoxicólico o aumento da expressão do gene *pox* ocorre, comparado ao tratamento controle, após a exposição das células por 30 e 60 minutos. A expressão dos genes *dps* e *pox* aumentou na presença de 0,1 % de ácido glicodeoxicólico em meio MRS após exposição por 30 minutos. A expressão diferencial dos genes *spx*, *dps* e *pox* em células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 em MRS expostas aos estresses ácido e por presença de sais biliares mostrou a sobreposição e a inespecificidade desses genes nas respostas aos estresses e evidencia base molecular envolvida no fenômeno de proteção cruzada e existência de mecanismo para sobrevivência de *L. delbrueckii* UFV H2b20 no TGI de humanos.

Palavras-chave: *Lactobacillus*, estresse, proteção cruzada, PCR em tempo real

## 1. INTRODUÇÃO

Os micro-organismos devem possuir mecanismos para proteger e reparar suas proteínas, membranas e ácidos nucleicos para viver sob condições de estresse. Os estresses ambientais ativam a expressão de diversos genes que codificam produtos que tanto protegem as células do estresse como participam no reparo de danos celulares. Desta forma, é possível que a exposição de células a um tipo de estresse possa levar a proteção contra outro estresse, fenômeno conhecido como proteção cruzada (RANGEL, 2010).

As espécies de *Lactobacillus* probióticas frequentemente são submetidas a condições de estresse, como a acidez do estômago, a presença de sais biliares no intestino e o estresse oxidativo durante a passagem pelo trato gastrointestinal (TGI). A capacidade de sobreviverem nessas condições é um dos critérios utilizados na seleção de micro-organismos probióticos (GOH e KLAENHAMMER, 2009).

O estresse oxidativo se refere a condições em que a produção de espécies reativas de oxigênio resulta em efeitos negativos no desempenho celular. A toxicidade do oxigênio é geralmente atribuída aos intermediários reativos de oxigênio, como ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxil que danificam as proteínas, os lipídeos e os ácidos nucleicos, constituindo uma das principais causas de morte celular. Os mecanismos de resistência ao estresse oxidativo se baseiam principalmente na prevenção da formação das espécies reativas de oxigênio, na eliminação das mesmas, na proteção dos possíveis alvos ou no reparo dos danos causados (VAN DE GUCHTE *et al.*, 2002; SERRAZANETTI *et al.*, 2009).

A enzima piruvato oxidase (Pox) participa da oxidação de piruvato produzindo CO<sub>2</sub>, acetil-fosfato e peróxido de hidrogênio, um dos mecanismos da célula para eliminar o oxigênio (GOFFIN *et al.*, 2006). Entretanto, bactérias do ácido láctico, como *L. delbrueckii* ATCC 11842, não possuem a enzima catalase para destoxificar o peróxido de hidrogênio produzido nesta reação (VAN DE GUCHTE *et al.*, 2006).

Outro gene envolvido na resistência ao estresse oxidativo é o *spx*. A proteína Spx é um regulador transcricional global que exerce tanto controle positivo como negativo sobre o início do processo da transcrição em *Bacillus subtilis*, podendo ativar genes requeridos para combater o estresse oxidativo ou reprimir genes cujos produtos são desnecessários nesta condição (ZUBER, 2004). Em *L. delbrueckii* UFV H2b20 a transcrição do gene *spx* é induzida em resposta à presença de oxigênio (LEITE, 2008).

Análises genômica e filogenética indicam a perda e o ganho de genes durante a evolução das bactérias do ácido láctico. Dentre os genes perdidos, estão os que codificam proteínas envolvidas na resposta ao estresse oxidativo, como a catalase. Entretanto, algumas espécies de *Lactobacillus* mostraram um aumento na resistência ao estresse oxidativo (MAKAROVA *et al.*, 2006; VAN DE GUCHTE *et al.*, 2006). Os autores atribuem esta resistência como mediada, em parte, pelo baixo conteúdo de ferro, um oxidante potente.

O ferro é um nutriente essencial para a maioria dos organismos, sendo utilizado como cofator de várias enzimas. Entretanto, pode reagir com o peróxido de hidrogênio e produzir o radical hidroxil, que danifica DNA, lipídeos e outras moléculas nas células (VAN DE GUCHTE *et al.*, 2002; SMITH *et al.*, 2004). A concentração intracelular de ferro livre é controlada, principalmente, por ferritinas, uma superfamília de proteínas que estoca ferro na sua forma oxidada e que não é tóxica para as células (SMITH *et al.*, 2004). A proteína Dps de *Listeria innocua* é capaz de se ligar a aproximadamente 500 átomos de ferro (BOZZI *et al.*, 1997) e evitar a geração de radical hidroxil (VAN DE GUCHTE *et al.*, 2002).

Em *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730, 0,5 % de sais biliares em MRS provocou aumento de 2,1 vezes na expressão de *dps*, comparado ao controle, entretanto a sobrevivência do mutante *dps* no mesmo meio não foi significativamente afetada (WHITEHEAD *et al.*, 2008), o que evidencia a presença de outros mecanismos envolvidos na adaptação ao estresse por presença de sais biliares. Estudo com *Escherichia coli* O157:H7 mostrou que em condições de estresse ácido (pH 2,0) a proteína Dps se liga ao DNA e protege o mesmo de possíveis danos causados pela acidez (JEONG *et al.*, 2008). Os autores destacam que em mutantes *dps* o estresse ácido resultou em danos ao DNA que foram mais pronunciados.

Assim, este trabalho teve por objetivo estudar a base molecular envolvida no fenômeno de proteção cruzada com o envolvimento dos genes *spx*, *dps* e *pox* às respostas aos estresses ácidos e por presença de sais biliares em *L. delbrueckii* UFV H2b20.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Linhagem**

Culturas estoque de *L. delbrueckii* UFV H2b20, isolado a partir de material fecal de crianças recém-nascidas (SANTOS, 1984) foram preparadas, congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -80 °C em caldo MRS, contendo 20 % de glicerol.

### **2.2. Preparação das células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 para extração de RNA**

Células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 congeladas foram reativadas em LDR 10% (p/v) e, transferidas para placa contendo MRS ágar. Para cada tratamento foram preparados 10 tubos contendo 3 mL de MRS. Em cada tubo foram transferidas três colônias que foram cultivadas até atingir D.O.<sub>600</sub> de 0,5. Aliquota de 1 mL de cada uma das culturas crescidas foram transferidas para um microtubo de 1,5 mL, totalizando 10 microtubos. Em seguida, as células foram centrifugadas, ressuspendidas em 1 mL de MRS de acordo com cada tratamento. Aliquotas de 100 µL da suspensão de cada um dos 10 microtubos foram transferidas para um tubo de 1,5 mL, com volume final de 1 mL, e centrifugadas. O sedimento nos tubos foi congelado no próprio microtubo em nitrogênio líquido e estocado a -80 °C para posterior extração de RNA. Foram realizados os seguintes tratamentos: 1. Controle (MRS pH 6,7); 2. Estresse ácido (MRS pH 3,5); 3. Estresse por presença de sais biliares (MRS contendo 0,1 % de sais biliares); 4. Estresse por presença de ácido taurodeoxicólico (MRS contendo 0,1 % de taurodeoxicólico); 5. Estresse por presença de ácido glicodeoxicólico (MRS contendo 0,1 % de glicodeoxicólico). As amostras foram mantidas em cada uma destas condições por 30 e 60 minutos.

### **2.3. Extração de RNA e síntese de cDNA**

As células tratadas e armazenadas a -80 °C foram descongeladas, ressuspendidas em 300 µL de TE pH 7,4 acrescido de 5 µL de lisozima (50 mg mL<sup>-1</sup>) e mantidas por 35 minutos a 37 °C em banho-maria. A extração do RNA foi feita utilizando-se Trizol (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. A pureza e quantificação do RNA foram determinadas utilizando-se o espectrofotômetro Evolution Thermo Scientific™. O RNA (2 µg) foi tratado com DNase (Promega), conforme instruções do fabricante e 400 ng do RNA tratado foi utilizado para síntese do cDNA, utilizando kit

*ImProm-II<sup>TM</sup> Reverse Transcription System* (Promega), segundo instruções do fabricante.

#### 2.4. qRT -PCR

A verificação do nível de expressão dos genes *spx*, *dps* e *pox* foi realizada por qRT-PCR. Foram utilizados *primers* específicos para qRT-PCR (LEITE, 2008) (Tabela 1). O gene homólogo a *sigA* foi o utilizado como gene controle ou de referência após a verificação de que a expressão do mesmo não foi significativamente afetada sob as condições experimentais. A presença de um único amplicon foi inicialmente testada por PCR convencional, utilizando-se cDNA de *L. delbrueckii* UFV H2b20. Os resultados foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida (8 %).

As análises quantitativas foram realizadas em termociclador CFX96<sup>TM</sup> Real-Time PCR detection systems – C100<sup>TM</sup> Thermal Cyclers (Bio-Rad), utilizando *Fast SYBER Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems) para monitorar a síntese de DNA fita dupla. As reações foram montadas em volume final de 12 µL, conforme instruções do fabricante. Todas as amostras foram analisadas em triplicata. As eficiências de reação foram determinadas (PFALL, 2001; BUSTIN *et al.*, 2005) e a especificidade da amplificação foi determinada por meio da análise das curvas de dissociação. A determinação da expressão relativa foi feita pelo método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise da expressão relativa, por qRT-PCR, dos genes *spx*, *dps* e *pox* de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 expostas aos estresses ácidos e por presença de sais biliares demonstrou a expressão diferenciada dos mesmos (Figuras 1, 2, 3 e 4). Os três genes nesta bactéria encontram-se envolvidos no estresse oxidativo (LEITE, 2008). A exposição das células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 ao meio MRS pH 3,5 por 30 minutos provocou aumento de 1,5 vezes na expressão do gene *spx* e de 3,6 vezes por 60 minutos, comparado ao tratamento controle (Figura 1). Na presença de 0,1 % de sais biliares mistos em meio MRS por 30 minutos ocorreu aumento da expressão do gene *spx*, e repressão do mesmo quando as células permaneceram por 60 minutos (Figura 2). As exposições aos ácidos conjugados, taurodeoxicólico ou glicodeoxicólico, por 30 e 60 minutos resultaram em repressão do gene *spx* (Figura 3 e 4).

O aumento da expressão de *spx* em resposta à exposição das células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 ao MRS pH 3,5 e a presença de sais biliares mostra a sobreposição e a inespecificidade de genes envolvidos em diferentes tipos de estresse e evidencia base molecular de mecanismo de proteção cruzada *in vitro* nesta bactéria.

A expressão do gene *dps* foi 4,0 vezes maior quando *L. delbrueckii* UFV H2b20 foi exposto ao meio MRS pH 3,5 por 30 minutos, comparado ao tratamento controle, e de 2,3 vezes maior por 60 minutos (Figura 1). A maior expressão de *dps* em resposta ao estresse ácido pode representar mecanismo de proteção ao DNA de *L. delbrueckii* UFV H2b20 nesta condição. Estudo com *Escherichia coli* O157:H7 mostrou que em condições de estresse ácido, a proteína Dps se liga ao DNA e protege o mesmo de possíveis danos causados pela acidez (JEONG *et al.*, 2008).

A exposição das células ao meio MRS contendo 0,1 % de ácido glicodeoxicólico por 30 minutos provocou aumento da expressão de *dps*, entretanto após 60 minutos, o gene foi reprimido (Figura 4). A exposição aos sais biliares mistos provocou repressão de *dps* (Figura 2). Similarmente, o gene foi reprimido em resposta a presença de taurodeoxicólico após 30 minutos e aos 60 minutos, a expressão foi similar ao tratamento controle (Figura 3).

As diferenças encontradas nos dados de expressão de *dps* aos diferentes sais biliares testados podem estar relacionadas aos valores de pKa. O pKa do ácido taurodeoxicólico é 1,9 e em condições fisiológicas ele se encontra ionizado e não é transportado através da membrana. Já o pKa de glicodeoxicólico é de 3,9 e a sua forma não dissociada pode entrar na célula e ao dissociar-se, intracelularmente, provoca redução do pH citoplasmático e danos aos componentes celulares, como o DNA. Assim, em *L. delbrueckii* UFV H2b20 o aumento da expressão de *dps* em resposta a exposição das células por 30 minutos ao MRS contendo 0,1 % de glicodeoxicólico pode representar mecanismo de proteção ao DNA à acidez interna da célula, causada pela dissociação intracelular do ácido glicodeoxicólico.

O gene *dps*, envolvido na resposta ao estresse oxidativo em *L. delbrueckii* UFV H2b20, está ausente nos genomas de *L. delbrueckii* ATCC 11842 e *L. delbrueckii* BAA 365 e apresentou alta identidade de sequência (99 %) com os genes correspondentes aos de *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus sakei*, três espécies probióticas que não fazem parte do grupo de *L. delbrueckii*. É provável que o gene *dps* tenha sido adquirido por mecanismo de transferência horizontal de genes, possivelmente de bactérias com características probióticas (LEITE, 2008).

O gene *dps* possivelmente está envolvido em dois mecanismos distintos nas respostas aos dois estresses, oxidativo e ácido, em *L. delbrueckii* UFV H2b20. No primeiro, o acúmulo de ferro pela Dps evita a formação de radical hidroxil e protege as células do estresse oxidativo. No estresse ácido, a proteína Dps possivelmente se liga ao DNA e o protege de danos causados pela exposição ao ambiente ácido, como a despurinação e despirimidinação da molécula.

A exposição das células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 ao meio MRS pH 3,5 por 30 e 60 minutos provocou aumento da expressão do gene *pox*, quando comparado a condição controle (Figura 1). A expressão de *pox* foi induzida apenas quando as células foram expostas ao meio MRS contendo 0,1 % de sais biliares mistos por 60 minutos (Figura 2). Por outro lado, em meio MRS contendo 0,1 % de ácido taurodeoxicólico, o aumento da expressão do gene ocorreu em resposta à exposição das células por 30 minutos (Figura 3). A presença de 0,1 % de glicodeoxicólico provocou aumento da expressão de *pox* após 30 minutos e repressão, após 60 minutos (Figura 4).

O envolvimento do gene *pox* nas respostas aos dois estresses, ácido e por presença de sais biliares, mostra novamente a sobreposição e a inespecificidade de genes e evidencia mecanismos moleculares envolvidos no fenômeno de proteção cruzada *in vitro* em *L. delbrueckii* UFV H2b20. A indução do gene *pox* desta bactéria, em resposta à presença de oxigênio em condições similares, foi anteriormente demonstrada (LEITE, 2008).

Em conjunto, os resultados demonstraram que os genes *spx*, *dps* e *pox* estão envolvidos na resposta ao estresse ácido e por sais biliares, o que mostra a sobreposição de genes e a não especificidade dos mesmos em diferentes condições de estresses – oxidativo, ácido e por presença de sais biliares. Os dados apresentados evidenciam ainda o fenômeno de proteção cruzada *in vitro*, no qual uma condição de estresse protege as células a outro tipo de estresse, reconhecido como de importância para a sobrevivência de bactéria. O presente trabalho demonstra a existência em *L. delbrueckii* UFV H2b20 de características necessárias à probiose, ou seja, mecanismo para sobrevivência e persistência no TGI de humanos.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOZZI, M., MIGNOGNA, G., STEFANINI, S., BARRA, D., LONGHI, C., VALENTI, P., CHIANCONE, E. A novel non-heme iron-binding ferritin related to the DNA-binding proteins of the Dps family in *Listeria innocua*. **Journal of Biology Chemistry**, 272: 3259-3265, 1997.

BUSTIN, S. A., BENES, V., NOLAN, T., PFALL, M.W. Quantitative real-time RT-PCR –a perspective. **Journal of Molecular Endocrinology**, 34:597-601, 2005.

GOFFIN, P., MUSCARIELLO, L., LORQUET, F., STUKKENS, A., PROZZI, D., SACCO, M., KLEEREBEZEM, M., HOLS, P. Involvement of pyruvate oxidase activity and acetate production in the survival of *Lactobacillus plantarum* during the stationary phase of aerobic growth. **Applied and Environmental Microbiology**, 72:7933-7940, 2006.

GOH, Y. J., KLAENHAMMER, T. R. Genomic features of *Lactobacillus* species. **Frontiers in Bioscience**, 14:1362-1386, 2009.

JEONG, K. C., HUNG, K. F., BAUMLER, D. J., BYRD, J. J., KASPAR, C. W. Acid stress damage of DNA is prevented by Dps binding in *Escherichia coli* O157:H7. **BMC Microbiology**, 8:181-194, 2008.

LEITE, M. C. T. **Identificação, caracterização, e análise da expressão e genes de resposta ao estresse oxidativo em *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20**. Viçosa, 127pg. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, 2008.

LIVAK, K. J., SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Method. **Methods**, 25:402-408, 2001.

MAKAROVA, K., SLESAREV, A., WOLF, Y., SOROKIN, A., KOONIN, E., PAVLOV, A., PAVLOVA, N., KARAMYCHEV, V., *et al.* Comparative genomics of the lactic acid bacteria. **PNAS**, 17:15611-15616, 2006.

PFALL, M. W. A new mathematic model for relative quantification in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, 29: 45-53, 2001.

RANGEL, D. E. N. Stress induced cross-protection against environmental challenges on prokaryotic and eukaryotic microbes. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 2010.

SANTOS, N. S. **Isolamento e caracterização de *Lactobacillus acidophilus* de fezes de crianças alimentadas ao seio e de bezerros, visando sua utilização como adjunto dietético**. Viçosa, 69p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, 1984.

SERRAZANETTI, D.I., GUERZONI, M.E., CORSETTI, A., VOGEL, R. Metabolic impact and potential exploitation of the stress reactions in lactobacilli. **Food Microbiology**, 26:700-711, 2009.

SMITH, J. L. The physiological role of ferritin-like compounds in bacteria. **Critical Reviews in Microbiology**, 30: 173-185, 2004.

VAN DE GUTCHE, M., SERROR, P., CHERVAUX, C., SMOKVINA, T., STANISLAV, D. Stress response in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, 82:187-216, 2002.

VAN DE GUCHTE, M., PENAUD, S., GRIMALDI, C., BARBE, V., BRYSON, K., NICOLAS, P., ROBERT, C., *et al.* The complete genome sequence of *Lactobacillus bulgaricus* reveals extensive and ongoing reductive evolution. **PNAS**, 103:9275-9279, 2006.

WHITEHEAD, K., VERSALOVIC, J., ROOS, S., BRITTON, R.A. Genomic and genetic characterization of the bile stress response of probiotic *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730. **Applied and Environmental Microbiology**, 74:1812-1819, 2008.

ZUBER, P. Spx-RNA polymerase interaction and global transcription control during oxidative stress. **J. Bacteriol**, 186:1911-1918, 2004.

Tabela 1. Sequências de *primers* utilizados no estudo de expressão de genes por qRT-PCR em *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 exposto aos estresses ácido e por presença de sais biliares

Gene alvo	Primer (5'-3')	Tamanho do amplicon
<i>sigA</i>	Ldb1245f - AGCCAAGAACCAGGAAAC Ldb1245r - GTCAGGAACTCACCCATC	147
<i>spx</i>	qspxf - GAAGAAGGCACGGAAGAA qspxr - GGCGGTCATCCAAAATAAT	150
<i>dps</i>	qdpsf - CGAATCCTTACTCGACCT qdpsr - TCAATGCCGTGTTGGTAA	128
<i>pox</i>	qpoxf - CTGGTAGTTTGGGTTGGT qpoxr - CAAGCTCTTCTTAGCGTCT	149

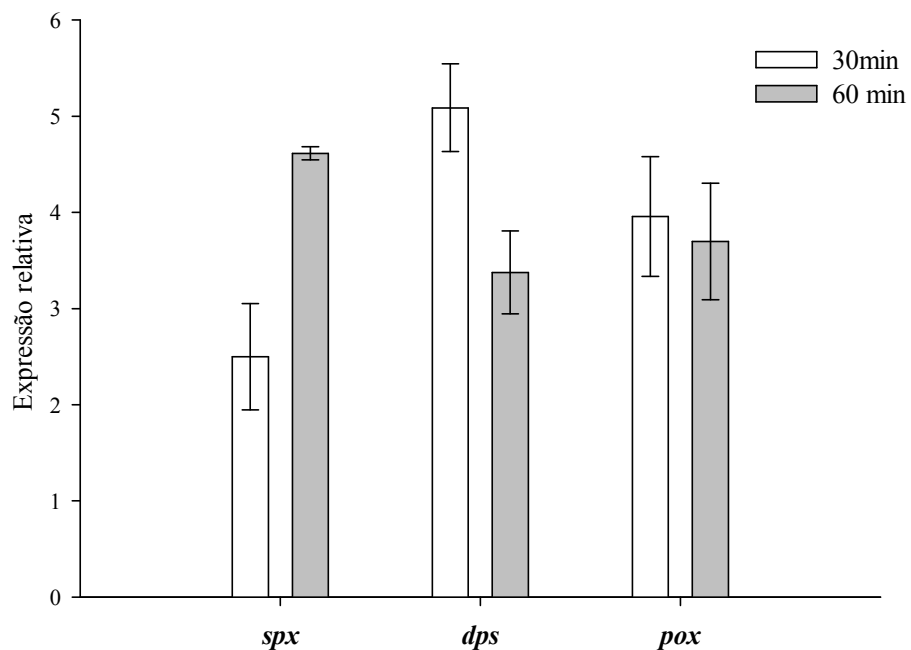


Figura 1. Expressão relativa normalizada dos genes *spx*, *dps* e *pox* de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 exposto ao meio MRS pH 3,5 por 30 e 60 minutos. As barras correspondem ao nível de expressão relativa em relação ao tratamento controle, cujo valor é igual a 1. As barras de erro correspondem aos desvios-padrão.

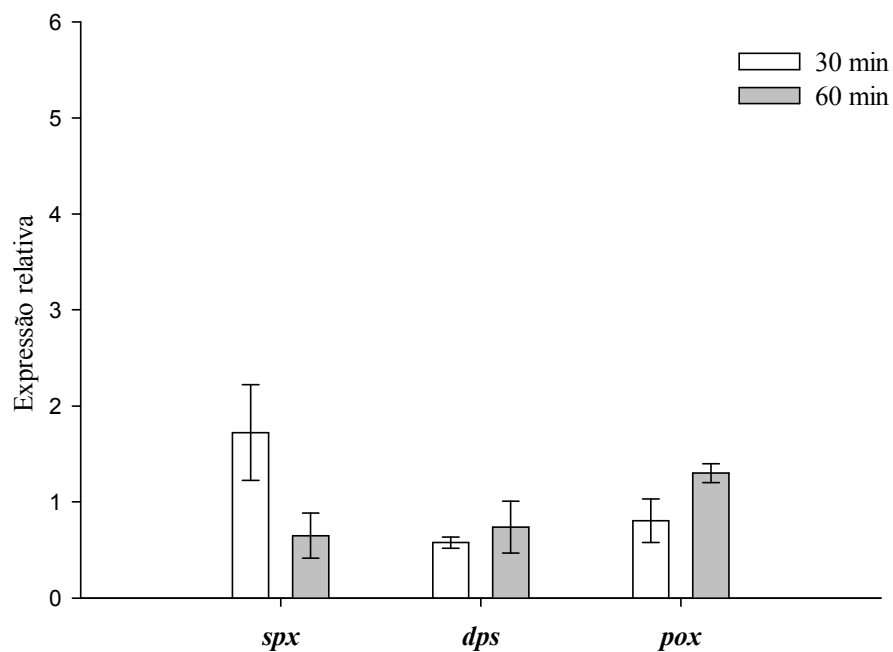


Figura 2. Expressão relativa normalizada dos genes *spx*, *dps* e *pox* de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 exposto ao meio MRS contendo 0,1 % de sais biliares mistos por 30 e 60 minutos. As barras correspondem ao nível de expressão relativa em relação ao tratamento controle, cujo valor é igual a 1. As barras de erro correspondem aos desvios-padrão.

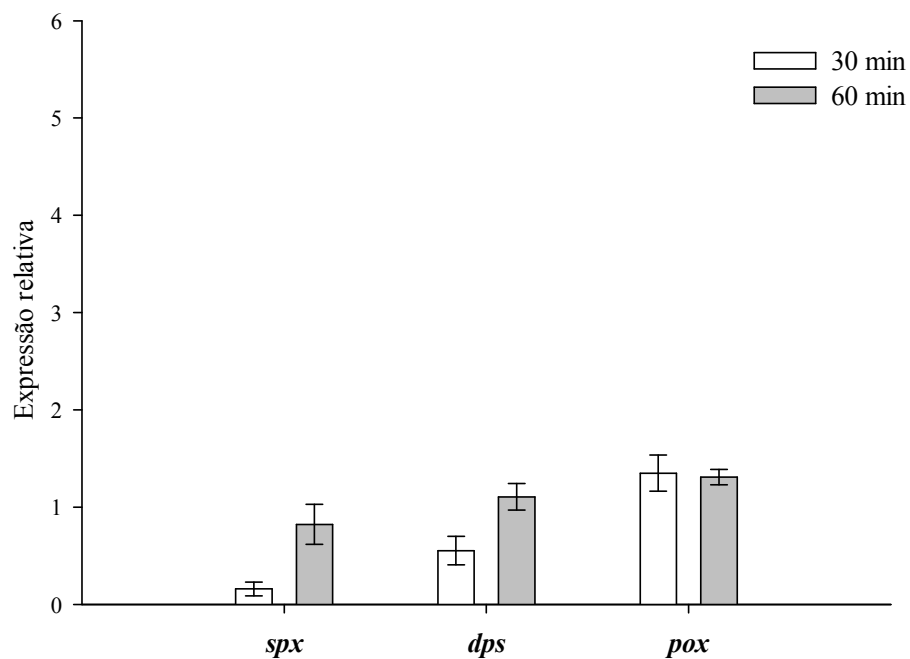


Figura 3. Expressão relativa normalizada dos genes *spx*, *dps* e *pox* de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 exposto ao meio MRS contendo 0,1 % de taurodeoxicólico por 30 e 60 minutos. As barras correspondem ao nível de expressão relativa em relação ao tratamento controle, cujo valor é igual a 1. As barras de erro correspondem aos desvios-padrão.

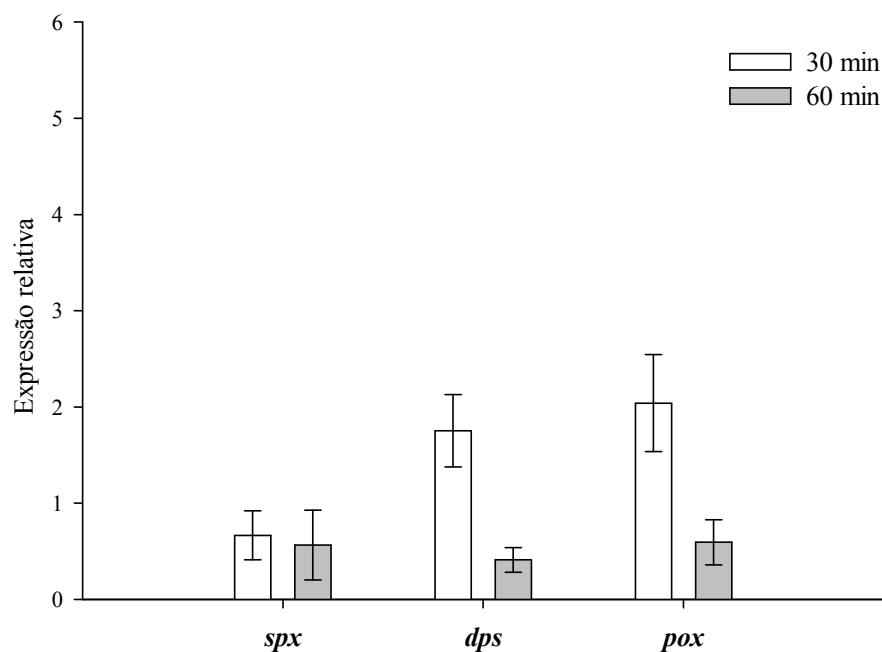


Figura 4. Expressão relativa normalizada dos genes *spx*, *dps* e *pox* de *Lactobacillus delbrueckii* UFW H2b20 exposto ao meio MRS contendo 0,1 % de glicodeoxicólico por 30 e 60 minutos. As barras correspondem ao nível de expressão relativa em relação ao tratamento controle, cujo valor é igual a 1. As barras de erro correspondem aos desvios-padrão.

## CONCLUSÕES GERAIS

*Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 apresenta características de respostas fisiológicas aos estresses ácido e por sais biliares, desejáveis e necessárias em bactéria probiótica, ou seja, resistir e sobreviver em condições similares às prevalentes no trato gastrointestinal (TGI) de humanos.

A filogenia molecular e a análise comparativa dos genes *clpP*, *clpE*, *clpL* e *clpX* de *L. delbrueckii* UFV H2b20 confirmaram a identidade da linhagem. Os genes *clpP*, *clpL*, *clpE* e *clpX* estão envolvidos nas respostas aos estresses ácido e por sais biliares em *L. delbrueckii* UFV H2b20. A atividade das proteínas do complexo proteolítico Clp possivelmente representa mecanismo de reparo e/ou degradação de proteínas danificadas pelas condições de estresse analisadas neste estudo e pode contribuir para a sobrevivência e persistência de *L. delbrueckii* UFV H2b20 no TGI de humanos.

A filogenia e a análise comparativa dos genes que codificam a ornitina descarboxilase e a permease de aminoácidos de *L. delbrueckii* UFV H2b20 confirmaram a identidade da linhagem. O gene que codifica a ornitina descarboxilase está envolvido na resposta ao estresse ácido em *L. delbrueckii* UFV H2b20. A ornitina descarboxilase codificada pelo gene identificado em *L. delbrueckii* UFV H2b20 possivelmente é envolvida na regulação do pH intracelular. A descarboxilação de aminoácidos é possivelmente um mecanismo de adaptação à acidez do meio, característica necessária para culturas probióticas e naturalmente de importância para a sobrevivência e persistência de *L. delbrueckii* UFV H2b20 no TGI de humanos.

A maior expressão de *dps* em resposta ao estresse ácido e por glicodeoxicólico pode caracterizar mecanismo de proteção ao DNA de *L. delbrueckii* UFV H2b20 nesta condição. O mecanismo de proteção conferido por Dps ao estresse ácido é possivelmente o de ligação ao DNA. Os genes *spx*, *dps* e *pox* de *L. delbrueckii* UFV H2b20 estão envolvidos nas respostas aos estresses ácido e por sais biliares, o que mostra a sobreposição de genes e a inespecificidade dos mesmos em diferentes condições de estresses – oxidativo, ácido e por sais biliares. Caracterizou-se base molecular envolvida no fenômeno de proteção cruzada *in vitro*, com envolvimento dos genes *spx*, *dps* e *pox* às respostas ao estresse ácido e por sais biliares em *L. delbrueckii* UFV H2b20 que se constitui em demonstração da existência de mecanismo para sobrevivência da bactéria no TGI de humanos.

No presente estudo, bases fisiológicas e moleculares que possibilitam a probiose por *L. delbrueckii* UFV H2b20 ficam esclarecidas no que tange à existência de mecanismos para sobrevivência e persistência em condições presentes no TGI de humanos.