

FERNANDA ARRUDA FLORESTA

**CARACTERÍSTICAS DE SUPERFÍCIE DE *Lactobacillus delbrueckii*  
UFV H2b20 PROBIÓTICO**

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*.

VICOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2008

FERNANDA ARRUDA FLORESTA

**CARACTERÍSTICAS DE SUPERFÍCIE DE *Lactobacillus delbrueckii*  
UFV H2B20 PROBIÓTICO**

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: 26 de fevereiro de 2008.

---

Prof. Arnaldo Chaer Borges  
(Co-Orientador)

---

Prof. Marcos Rogério Tótola  
(Co-Orientador)

---

Prof. Nélio José de Andrade

---

Dra. Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto

---

Prof. Celia Alencar de Moraes  
(Orientadora)

*Às pessoas essenciais na minha vida, minha  
família: Antônio, Carminha, Flávia, Antônio José,  
Lucas, Luiz Eduardo e Roberta.*

**- Dedicó -**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por ter me concedido, durante esse período de quatro anos, a coragem e a perseverança necessárias para realizar este trabalho. Ele realmente foi o meu sustento nessa longa caminhada.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade de realização do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, em nível de Doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo financiamento.

Aos meus pais, Antônio e Carminha, pelo amor, pela dedicação com que sempre me educaram, pelo apoio incondicional a todos os meus sonhos, e, principalmente, por serem o terreno firme que me sustenta em todos os momentos de minha vida. A vocês, meu amor, meu carinho e minha eterna gratidão.

Aos meus irmãos, Flávia e Antônio José, pelo harmonioso convívio, por terem assumido minhas responsabilidades nos momentos em que estive ausente e por sempre tornarem minha vida mais especial e feliz.

Ao meu sobrinho mais lindo, o Lucas, por ser o sol que ilumina os meus dias tristes de chuva, pelas brincadeiras durante os períodos de estresse e por ser a alegria ambulante da minha casa.

À minha cunhada, Roberta, pela convivência agradável e pelo incentivo nos momentos difíceis.

Ao querido Luiz Eduardo, meu futuro esposo, pelo amor, pelo incentivo, pelo apoio e pela enorme compreensão durante os momentos em que estive ausente, especialmente, quando estive em Ithaca.

À Profa. Célia Alencar de Moraes, minha orientadora, pela confiança em mim depositada ao longo desses dez anos de convivência, pelas conversas, pelos conselhos e por me ensinar o que é ciência e como fazê-la.

Ao Prof. Arnaldo Chaer Borges, pela contribuição em meu trabalho, pelo desafio a mim apresentado de me aventurar em outras áreas do conhecimento e pela confiança em mim depositada.

Ao Dr. Carl A. Batt, pela competente orientação durante o Programa Sanduíche na Universidade de Cornell.

Aos conselheiros, Prof. Marcos Rogério Tótola, Prof. Marisa Vieira de Queiroz e Prof. Arnaldo Chaer Borges, pelas sugestões ao longo do trabalho.

À Dra. Cláudia Lúcia de Oliveira Pinto e ao Prof. Nélio José de Andrade, pelas sugestões.

A todos os professores do Departamento de Microbiologia que muito contribuíram para meu aprendizado e minha formação profissional.

Ao amigo Thiago Monteiro Araújo dos Santos, pela amizade que será para sempre, pela partilha dos esforços e multiplicação dos resultados, pelas discussões científicas e pelas conversas pessoais.

Ao casal, Leonardo e Alessandra, pelo convívio agradável e por terem sido minha família em Ithaca.

Aos amigos Dani, Fabiano, Cynthia, Leonardo, Grazie, Juan, Bruno, Malia, Esther, Natália, André e Uelinton que tornaram os finais de semana em Ithaca muito mais agradáveis.

Aos amigos da MIND que se foram e aos que ainda estão presentes.

Aos funcionários Danilo, Evandro, Sr. Paulo e Sr. Toninho, pela boa vontade em me ajudar.

Às secretárias Nilcéa, Laura e Rejane e ao Sr. Custódio.

Enfim, a todos os que contribuíram de alguma forma para que este trabalho fosse realizado.

## **BIOGRAFIA**

FERNANDA ARRUDA FLORESTA, filha de Antônio Nogueira Floresta e de Maria do Carmo Arruda Floresta, nasceu em Viçosa, no Estado de Minas Gerais, em 27 de agosto de 1977.

Em março de 2001, tornou-se bacharela em Ciência e Tecnologia de Laticínios pela Universidade Federal de Viçosa.

Em abril de 2001, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, obtendo o título de Mestre em março de 2003.

Neste mesmo ano foi contemplada com uma bolsa de Desenvolvimento Tecnológico e Industrial do Projeto Petróleo CT-Petro na Universidade Federal de Viçosa.

Em março de 2004, iniciou o Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola.

Em junho de 2006, foi para a Universidade de Cornell realizar parte de seus experimentos no *Food Science Department*.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1. Tolerância a condições de baixo pH e a sais biliares.....	2
1.2. Colonização e aderência ao epitélio intestinal.....	3
1.3. Estabilidade da cultura.....	4
1.4. Controle de infecções intestinais.....	5
1.5. Redução da intolerância à lactose.....	5
1.6. Redução dos níveis de colesterol.....	6
1.7. Atividade anticarcinogênica.....	7
1.8. Função imune.....	7
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	9
Estudos comparativos da linhagem selvagem de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> UFV H2b20 e da linhagem mutante desprovida de capacidade de imunoestimulação	14
Resumo.....	14
Abstract.....	15
1. Introdução.....	16
2. Material e Métodos.....	21
2.1. Sequenciamento de rDNA 16S.....	21
2.2. PCR – DGGE.....	21
2.3. Extração de plasmídeo.....	22
2.4. Eletroforese em gel em campo pulsado (PFGE).....	22
2.5. Análise de morfologia celular por microscopia eletrônica de varredura (SEM).....	23

	<b>Página</b>
2.6. Análise de morfologia celular por microscopia eletrônica de transmissão (TEM).....	24
2.7. Experimentos de <i>Surface Plasmon Resonance</i> (SPR).....	24
2.7.1. Preparação das células.....	24
2.7.2. Preparação do <i>chip</i> sensor.....	24
2.7.3. Condições de análise por <i>Surface Plasmon Resonance</i> (SPR).....	25
2.8. Extração de proteínas de superfície.....	25
2.9. SDS-PAGE.....	25
2.10. Eletroforese em gel de duas dimensões.....	26
2.11. Seqüenciamento do gene codificador de proteína da camada S.....	26
3. Resultados e Discussão.....	26
3.1. Identidade das linhagens selvagem e mutante de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20.....	26
3.2. Análise de plasmídeos.....	28
3.3. Análise de morfologia celular por microscopia eletrônica de varredura (SEM).....	30
3.4. Análise de morfologia celular por microscopia eletrônica de transmissão (TEM).....	30
3.5. Experimentos de <i>Surface Plasmon Resonance</i> (SPR).....	31
3.6. Perfil de proteínas de superfície das linhagens selvagem e mutante de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20.....	33
3.7. Seqüenciamento do gene codificador da proteína S.....	37
4. Referências Bibliográficas.....	38
Produção de linhagem recombinante de <i>Lactobacillus delbrueckii</i> UFV H2b20.....	44
Resumo.....	44
Abstract.....	44
1. Introdução.....	45
2. Material e Métodos.....	47
2.1. Microrganismos.....	48
2.2. Estratégia para obter a fusão dos genes de interesse.....	48
2.3. Eletrotransformação de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20 com o plasmídeo recombinante.....	49
3. Resultados e Discussão.....	50
3.1. Fusão dos genes de interesse.....	50
3.2. Eletrotransformação de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20 com o plasmídeo recombinante.....	52
4. Conclusões e Perspectivas.....	53
5. Referências Bibliográficas.....	53

## RESUMO

FLORESTA, Fernanda Arruda, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2008. **Características de superfície de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 probiótico.** Orientadora: Célia Alencar de Moraes. Co-Orientadores: Arnaldo Chaer Borges, Marcos Rogério Tótola e Marisa Vieira de Queiroz.

*Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 tem demonstrado alto potencial de colonizar o intestino de camundongos livres de germes e, também, de imunestimulação. Essa bactéria possui características fisiológicas e genéticas que a qualificam como probiótica. Um mutante espontâneo desprovido da capacidade de imunestimulação foi obtido após transferências sucessivas em meio de cultura. A investigação das possíveis causas dessa instabilidade é um dos objetivos desse trabalho. A existência de identidade entre as bactérias foi comprovada por sequenciamento do rDNA 16S e por Eletroforese em Gel com Gradiente (DGGE), tendo as seqüências apresentado com 99% de identidade e o perfil de bandas no gel sido semelhante. A instabilidade não se deve a um processo de cura de plasmídeo, uma vez que em ambas inexistem DNA plasmidial, como demonstrado por extração convencional de DNA plasmidial e por Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE). As duas bactérias exibiram o mesmo perfil de bandas de proteínas de superfície (SDS-PAGE), porém, diferiram quanto à expressão de proteínas de tamanho correspondente ao de proteínas S. No entanto, por se ter obtido apenas o fragmento amplificado correspondente à porção da âncora do gene codificador de proteína da camada S, inferiu-se que o *L. delbrueckii* UFV H2b20 não expressa tais proteínas. As micrografias em microscopia eletrônica de

transmissão mostram a inexistência de camada S em *L. delbrueckii* UFV H2b20, selvagem e mutante. Nessas bactérias, a eletroforese em duas dimensões revelou 769 proteínas no extrato de proteínas de superfície da selvagem e 860 na mutante. Desses totais, 323 estavam presentes apenas no selvagem e 414 no mutante. A espectroscopia de massa das proteínas de maior expressão na selvagem e o seqüenciamento de C-terminal em MALDI-TOF/TOF revelaram similaridade com proteínas intracelulares, uma evidência de que ocorreu dano no envelope celular durante o processo de extração de proteínas de superfície. Assim, a hipótese da existência de diferenças entre as duas linhagens, no que se refere às superfícies, não pôde ser comprovada com a metodologia utilizada. A capacidade de adesão de *L. delbrueckii* UFV H2b20 mutante a um dos mais abundantes carboidratos da mucosa intestinal, N-acetilglicosamina (GlcNAc), mostrou-se 27% menor que a selvagem, por medição em *Surface Plasmon Resonance* (SPR). O estudo de utilização de *L. delbrueckii* UFV H2b20, como veículo de apresentação de antígeno foi proposto como resultado do trabalho de desenvolvimento de um plasmídeo recombinante que contém o peptídeo sinal da proteína S fundido à proteína anticâncer, NY-ESO-1, e à região ancoradora de proteína S. A seqüência resultante apresenta todos os fragmentos clonados no mesmo quadro de leitura, favorecendo a expressão de NY-ESO-1 na superfície de *L. delbrueckii* UFV H2b20 e a ampliação da utilidade dessa bactéria.

## ABSTRACT

FLORESTA, Fernanda Arruda, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February 2008.  
**Surface characteristics of the probiotic *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20.**  
Adviser: Célia Alencar de Moraes. Co-Advisers: Arnaldo Chaer Borges, Marcos Rogério Tótola and Marisa Vieira de Queiroz.

*Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 has been demonstrating a high potential to colonize bowels of mice free of germs and also for immunostimulation. This bacterium has physiologic and genetic characteristics that qualify it as a probiotic. A spontaneous mutant without the immunostimulation ability was obtained after successive transferences in growth medium. One of the objectives of this work is to investigate the possible causes of this instability. The existence of identity between the bacteria was proved by the rDNA 16S sequencing and by *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)*, and the sequences showed 99% of identity an the profile of gel bands was similar. The instability is not due to a plasmid curing process, since none of them have plasmidial DNA, as was demonstrated by the conventional extraction of plasmidial DNA and by *Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)*. The two bacteria showed the same profile of bands of surface proteins (SDS-PAGE), but differed as to the expression of the proteins with the size corresponding to the S proteins. Nevertheless, because only the amplified fragment corresponding to the anchor part of the codifier gene of the protein of the S layer was obtained, it was inferred that the *L. delbrueckii* UFV H2b20 does not express these proteins. The micrographies from transmission eletronic microscopy show the non existence of the S layer in

*L. delbrueckii* UFV H2b20, both in the wild type and the mutant. In these bacteria, the eletrophoresis in two dimensions showed 769 proteins in the extract of surface proteins from the wild bacterium and 860 from the mutant one. From these totals, 323 were present only in the wild type and 414 in the mutant bacterium. The mass spectroscopy of the proteins with greater expression in the wild bacterium and the sequencing of the terminal-C in the MALDI-TOF/TOF showed similarity with intracellular proteins, an evidence that damage occurred on the cellular envelope during the extraction process of the surface proteins. Thus, the hypothesis of differences between the two strains, related to the surfaces, could not be proved with methodology used. The adhesion ability of the mutant *L. delbrueckii* UFV H2b20 to one of the most abundant carbohydrate of the intestinal mucosa, the N-acetylghucosamine (GlcNac), showed to be 27% less than that of the wild bacterium, by messurements in Surface Plasmon Resonance (SPR). The study of the use of *L. delbrueckii* UFV H2b20 antigen delivery vehicle was proposed as a result of the work of the development of a recombinant plasmid that contains the signal peptide of the S protein fused to the anticancer NY-ESO-1, and to the anchorage region of the S protein. The resulting sequence shows all of the cloned fragments in the same reading frame, which favours the expression of NY-ESO-1 on the *L. delbrueckii* UFV H2b20 and a broader use of this bacterium.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O trato gastrintestinal humano é um dos mais complexos ecossistemas microbianos conhecidos. A microbiota intestinal humana é composta por cerca de  $10^{13}$  a  $10^{14}$  microrganismos cujo genoma coletivo, metagenoma, contém pelo menos 100 vezes mais genes que o próprio genoma humano. Esse microbioma tem enriquecido o metabolismo de vários compostos, inclusive vitaminas e isoprenóides. Dessa forma, o metabolismo humano é um amálgama dos atributos humanos e microbianos (GILL *et al.*, 2006).

O interesse no impacto da atividade microbiana intestinal na saúde humana está se expandindo rapidamente e muitas associações entre microrganismos e mamíferos, positivas ou negativas, têm sido estudadas (NICHOLSON *et al.*, 2005; GILL *et al.*, 2006; LEY *et al.*, 2006). A simbiose microorganismo-mamífero pode desempenhar um papel importante no metabolismo de compostos endógenos e exógenos e também influenciar a etiologia e o desenvolvimento de várias doenças (MARTIN *et al.*, 2008). Como o microbioma interage fortemente com o hospedeiro para determinar o fenótipo metabólico, o qual influencia no resultado de intervenções com drogas, há uma necessidade de entendimento dessas interações para desenvolver tratamentos de saúde personalizados (NICHOLSON, 2006). Uma das abordagens utilizadas para regular o balanço da microbiota intestinal é baseada na administração oral de probióticos (MARTIN *et al.*, 2008).

Probióticos são microrganismos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem efeitos benéficos à saúde do hospedeiro (REID *et al.*, 2003).

Originalmente usados como suplementos alimentares, a maioria é administrada oralmente e oferece uma alternativa atraente para o tratamento de distúrbios intestinais. O melhor entendimento dos mecanismos pelos quais esses microrganismos atuam tem aberto novas possibilidades para a engenharia de linhagens probióticas (STEIDLER, 2003).

O entendimento de que alimentos probióticos podem exercer efeitos benéficos para a saúde do hospedeiro tem levado a um aumento na demanda do consumidor por tais produtos, aumentando, dessa forma, seu valor comercial. O consumo diário de microrganismos probióticos como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* contribui para a manutenção e o melhoramento do balanço das populações intestinais, e sua presença em número elevado previne distúrbio gastrointestinal e aumenta a sensação de bem-estar do organismo, reforçando sua defesa natural (LAVERNICOCCA, 2006).

Durante a fermentação, vários produtos metabólicos aparecem no alimento, incluindo o ácido láctico e o ácido acético, o pH do produto é abaixado e possivelmente aparecem bacteriocinas. Tais alterações podem afetar a estabilidade das bactérias probióticas, bem como alterar suas propriedades funcionais (TUOMOLA *et al.*, 2001).

Importantes propriedades de controle de qualidade têm que ser controladas e otimizadas para a seleção de linhagens probióticas, dentre elas, tolerância a condições de baixo pH e a sais biliares, colonização e aderência ao epitélio intestinal e estabilidade da cultura.

*Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 é dos isolado de fezes de recém nascidos, alimentados exclusivamente com leite materno, que apresentou ótimas características probióticas (SANTOS, 1984). A partir do seu isolamento, seus aspectos fisiológicos, tecnológicos, imunológicos e genéticos vêm sendo estudados.

### **1.1. Tolerância a condições de baixo pH e a sais biliares**

Os probióticos devem ser capazes de sobreviver à passagem pelo estômago e pelo intestino e estar presentes em quantidade suficiente para exercer seus efeitos benéficos no hospedeiro. Isto significa que eles têm que tolerar as condições acídicas e ricas em proteases do estômago e sobreviver e crescer na presença de sais biliares (DEL PIANO *et al.*, 2006).

Linhagens de *Lactobacillus rhamnosus* isoladas de queijo do tipo Parmigiano Reggiano foram analisadas quanto a dois pré-requisitos importantes para a

caracterização de uma linhagem probiótica: tolerância a pH baixo e a sais biliares. O comportamento de quase todas as linhagens mostrou-se análogo ao da bactéria *Lactobacillus* GG, linhagem probiótica comercial (SUCCI *et al.*, 2005).

O potencial de resistência ao suco gástrico e a sais biliares de linhagens de *Lactobacillus fermentum* isoladas de suínos e aves também foi analisado para a seleção de linhagens probióticas (LIN *et al.*, 2007).

A capacidade de *L. delbrueckii* UFV H2b20 resistir às condições adversas do trato gastrointestinal *in vitro* foi investigada. Ele mostrou resistência, sobreviveu e pôde multiplicar-se em ambientes com antibióticos e quimioterápicos, mostrando potencial para se instalar em condições de desequilíbrio da microbiota intestinal (AGOSTINHO, 1988).

Esses testes *in vitro* para a seleção de linhagens também podem ser utilizados para assegurar a qualidade das culturas probióticas durante a fabricação, a estocagem e a vida de prateleira dos produtos (LEE *et al.*, 1995).

## **1.2. Colonização e aderência ao epitélio intestinal**

A habilidade de aderir à mucosa intestinal é considerada um dos principais critérios na seleção de bactérias probióticas, visto que a adesão prolonga a permanência desses microrganismos no intestino e assim os favorece ao exercer efeitos benéficos no hospedeiro (APOSTOLOU *et al.*, 2001). Além disso, a adesão ao epitélio intestinal é o primeiro passo para a modulação do sistema imune pelas bactérias probióticas (FALK *et al.*, 1994). São pouco conhecidos os mecanismos utilizados pelos probióticos para a colonização da mucosa intestinal quando comparado com o conhecimento detalhado disponível sobre a adesão de microrganismos patogênicos como *Yersinia* e *Listeria* (FINLAY, 1997).

A colonização do trato gastrointestinal é um processo hospedeiro-específico e, possivelmente, tecido-específico mediado por vários componentes associados à parede celular (TANNOCK, 1999).

Microrganismos isolados de alimentos foram avaliados quanto à capacidade de adesão a células Caco-2. Dentre os isolados, *L. fermentum* aderiu com alta eficiência às células Caco-2 quando comparado à linhagem indicadora *L.GG* (BACCIGALUPI *et al.*, 2005).

A adesão de 12 linhagens de *Lactobacillus* foi estudada usando células Caco-2 como um modelo *in vitro* para o epitélio intestinal. As linhagens mostraram potencial para ser usadas como probióticas, uma vez que apresentaram boa adesão às células Caco-2 (TUOMOLA *et al.*, 1998).

A identificação e a caracterização dos fatores de aderência tornaram-se tópicos de interesse. A estrutura e as propriedades das proteínas de adesão devem ser consideradas para a seleção de linhagens com características particulares como a capacidade de colonizar regiões específicas do trato gastrointestinal. Bactérias que possuem fatores de adesão podem também ser usadas para construção de veículos de apresentação de antígenos em locais pré-determinados (CARIN *et al.*, 2002).

Vários relatos foram feitos da perda ou diminuição da capacidade de adesão de linhagens de *Lactobacillus* quando submetidos a transferências sucessivas em meio de cultura em laboratório, durante a produção industrial ou em produtos lácteos (ELO *et al.*, 1991; SAXELIN *et al.*, 1991; TUOMOLA *et al.*, 2001).

Se a adesão é modificada durante processos industriais, os procedimentos operacionais devem ser alterados. As propriedades de adesão às células do intestino (por exemplo, Caco-2) e às preparações do muco intestinal humano devem ser monitoradas cuidadosamente. Esse controle é a base para a colonização intestinal humana, efeitos benéficos e monitoramento futuro de procedimentos de produção (TUOMOLA *et al.*, 2001).

### **1.3. Estabilidade da cultura**

A estabilidade da cultura é crítica para garantir a eficácia de um probiótico, isto é, sua habilidade de exercer os efeitos benéficos no hospedeiro no produto final. Deste modo, os microrganismos probióticos devem reter suas propriedades após o processamento e sobreviver em número suficiente durante a estocagem e a vida de prateleira do produto (DEL PIANO *et al.*, 2006).

O conhecimento de processos de cultivo, conservação e manutenção de viabilidade das células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 acumulado ao longo dos anos em estudos tecnológicos possibilitou delinear rotas de produção de produtos lácteos probióticos como leite UHT, leite fermentado, queijo, sorvete, em escala piloto, bem como um sistema de produção de culturas prontas para uso em indústrias de fermentação (LEITE, 2005; DO CARMO, 2006).

As características necessárias para a seleção de microrganismos probióticos são muito importantes, pois elas determinam se esses microrganismos exercerão efeito benéfico no hospedeiro.

Os efeitos benéficos causados pela ingestão de probióticos têm sido estudados, e, dentre eles, podem ser citados o controle de infecções intestinais, a redução da intolerância à lactose, a redução dos níveis de colesterol, a atividade anticarcinogênica e a função imune.

#### **1.4. Controle de infecções intestinais**

Bactérias probióticas produzem substâncias antimicrobianas como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas que suprimem a multiplicação de bactérias patogênicas e putrefativas (SHAH, 1999).

*Lactobacillus* GG (ATCC53103) foi administrado a pacientes hospitalizados com diarreia aguda causada por rotavírus em formulações de leite fermentado e em pó. Esse microrganismo reduziu significativamente a duração da diarreia quando comparado com o grupo ao qual foi administrado placebo de iogurte (ISOLAURI *et al.*, 1991).

Os sobrenadantes de culturas de diferentes *Lactobacillus* foram avaliados quanto à habilidade de inibir, *in vitro*, *Giardia intestinalis*. Os resultados indicaram que tais sobrenadantes inibiram a proliferação de *G. intestinalis* (PÉREZ *et al.*, 2001).

*L. delbrueckii* UFV H2b20 demonstrou capacidade de produzir concentrações de peróxido de hidrogênio suficientes para inibir microrganismos patogênicos e deterioradores de alimentos (RIBEIRO, 1995). Além disso, *L. delbrueckii* UFV H2b20 exerceu efeito antagônico contra infecções experimentais com *Shigella flexneri* e *Salmonella enteritidis* subsp. *typhimurium* (FILHO-LIMA *et al.*, 2000) e se mostrou capaz de exercer antagonismo e reduzir as conseqüências patológicas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Typhimurium em camundongos livres de germes e em camundongos convencionais (MOURA *et al.*, 2001).

#### **1.5. Redução da intolerância à lactose**

A má absorção da lactose, principal carboidrato do leite, é a condição na qual esse componente não é completamente hidrolisado em seus monossacarídeos, glicose e

galactose. Algumas pessoas não têm capacidade de digerir lactose adequadamente devido à ausência da  $\beta$ -D-galactosidase no intestino e isso causa desconforto abdominal, flatulência excessiva e/ou diarreia (KIM *et al.*, 1993). Mais de metade da população mundial é incapaz de utilizar a lactose efetivamente. O alívio dos sintomas de má absorção da lactose é um dos benefícios atribuídos às linhagens probióticas (FOOKS *et al.*, 1999).

Existem algumas possíveis razões para explicar como as bactérias atuam na utilização da lactose. Primeiro, a  $\beta$ -galactosidase, nas bactérias presentes em produtos lácteos fermentados ou não, sobrevive à passagem gástrica e é liberada no intestino delgado, onde ocorre a digestão da lactose. Segundo, a diminuição do trânsito intestinal prolonga a ação da  $\beta$ -galactosidase e diminui a carga osmótica da lactose. Terceiro, a ingestão da lactose e de bactérias contidas em produtos lácteos fermentados pode afetar o pH intestinal, a microbiota intestinal, a fermentação da lactose ou a sensibilidade do indivíduo, aliviando os sintomas da intolerância à lactose ou outras desordens gastrintestinais (VRESE *et al.*, 2001).

### **1.6. Redução dos níveis de colesterol**

Altos níveis de colesterol são um fator de risco para a ocorrência de doenças cardiovasculares. *L. fermentum* KC5, uma linhagem potencialmente probiótica, foi avaliada quanto à capacidade de reduzir os níveis de colesterol e mostrou habilidade para tal (PEREIRA *et al.*, 2003).

A linhagem potencialmente probiótica, *Lactobacillus plantarum* PH04, foi administrada a camundongos com altos níveis de colesterol. Quando comparados com o grupo controle, os camundongos que receberam *L. plantarum* PH04 tiveram seus níveis de colesterol e triglicérides reduzidos em 7 e 10%, respectivamente (NGUYEN *et al.*, 2007).

A redução dos níveis de colesterol pode ser devida à desconjugação enzimática de sais biliares pelas bactérias probióticas que possuem a enzima *Bile Salt Hidrolase*, BSH. Sais biliares desconjugados são menos solúveis e menos eficientemente absorvidos no lúmen intestinal que os seus conjugados, sendo excretados nas fezes. A desconjugação de sais biliares pelos probióticos leva à redução dos níveis de colesterol tanto pelo aumento da demanda de colesterol para a síntese *de novo* de sais biliares para

repor aqueles perdidos nas fezes, quanto pela redução da solubilidade do colesterol, causando diminuição de sua absorção no lúmen intestinal (PEREIRA *et al.*, 2003).

### **1.7. Atividade anticarcinogênica**

Algumas linhagens de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium* spp. são capazes de diminuir os níveis de enzimas como  $\beta$ -glucuronidase, azoredutase e nitroredutase, responsáveis pela ativação de pró-carcinogênicos e, conseqüentemente, redução do risco de desenvolvimento de tumores (YOON *et al.*, 2000).

A atividade inibitória de tumor de cólon por *Bifidobacterium longum* foi avaliada e revelou que a administração desse microrganismo a camundongos resultou em significativa supressão da incidência e da multiplicação de tumor no cólon, bem como na redução do seu volume (SINGH *et al.*, 1997).

O efeito anticarcinogênico de bactérias probióticas não está completamente elucidado. Uma variedade de mecanismos pode ocorrer, dentre eles, a remoção de compostos pró-carcinogênicos ou das enzimas que levam à sua formação, melhoramento do balanço da microbiota intestinal e o aumento da resposta imune do hospedeiro (SHAH, 2007).

### **1.8. Função imune**

O principal mecanismo de proteção contra infecções mediado por bactérias probióticas é a imunostimulação não específica do intestino, porém, as moléculas e os mecanismos envolvidos nesse processo não estão completamente elucidados (MORELLI, 2002).

Vários microrganismos probióticos foram estudados e mostraram exercer influência sobre o sistema imune do hospedeiro, dentre eles *Bifidobacterium bifidum* (DE SIMONE *et al.*, 1992), *L. GG* (PELTO *et al.*, 1998), *L. acidophilus* e *Lactobacillus casei* strain Shirota (MATSUZAKI, 1998), *B. longum* KN29 (BIEDRZYCKA *et al.*, 2003), *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. (CORR *et al.*, 2007).

Os estudos imunológicos com *L. delbrueckii* UFV H2b20 demonstraram que essa bactéria é capaz de estimular resposta imune não específica em camundongos livres de germes (NEUMANN *et al.*, 1998) e de estimular resposta imune do tipo 1

(CASTANHEIRA *et al.*, 2007), revelando que esta linhagem probiótica pode ser utilizada com adjuvante em protocolos de vacinação.

Em 2002, foi relatado por pesquisadores da Universidade Federal de Ouro Preto que culturas de *L. delbrueckii* UFV H2b20 mantidas por longo período em laboratório tinham perdido a capacidade de estimular a produção de Interleucina-12 (IL-12) e Interferon-gama (IFN- $\delta$ ) por *Peripheral Blood Mononuclear Cells* (PBMC) humanas. A origem desta alteração não é conhecida. Infere-se que as condições de cultivo (pH, meio de cultura, entre outros) tenham selecionado uma população incapaz de estimular a resposta imune resultante de alguma mutação espontânea (Prof. Luiz Afonso Crocco, UFOP, 2002 – Comunicação pessoal).

O mesmo fenômeno foi observado por Tuomola *et al.* (2001), que verificaram perda significativa de propriedades probióticas em *L. GG* quando mantido por cultivo sucessivo durante três anos e meio e também em bactérias isoladas de iogurtes comerciais após o intervalo de um ano. Essa instabilidade genética pode estar relacionada a mutações espontâneas como as provocadas por movimentação de seqüências de inserção (IS) (GERMOND *et al.*, 1995), à cura de plasmídeos durante prolongado cultivo em laboratório (GANUSOV e BRILKOV, 2002), ou ainda a alteração nas proteínas de superfície da linhagem original (JAKAVA-VILJANEN *et al.*, 2002).

O desenvolvimento de linhagens probióticas estáveis geneticamente para o uso na indústria de alimentos fermentados tem sido almejado por várias indústrias produtoras de fermentos lácteos. O isolamento de um mutante espontâneo de *L. delbrueckii* UFV H2b20, incapaz de imunoestimulação, será de grande valia para o entendimento de possíveis causas que poderão ter contribuído para tal fenômeno, por meio de comparação com a linhagem selvagem.

Este trabalho foi dividido em dois capítulos. No primeiro capítulo, propôs-se estudar as possíveis causas da alteração genotípica que ocasionou a perda da capacidade de imunoestimulação na linhagem mutante e no segundo iniciou-se a construção de uma linhagem recombinante de *L. delbrueckii* UFV H2b20 que veicule em sua superfície a proteína anticâncer NY-ESO-1.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINHO, S. M. M. **Comportamento do *Lactobacillus acidophilus* H2b20 sob condições do trato digestivo “in vitro” e efeito de métodos de preservação de sua atividade.** 1988. 70 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1988.

APOSTOLOU, E. Good adhesion properties of probiotic as a potential risk for bacteremia? **FEMS Immunology and Medicine Microbiology**, v. 31, p. 35-39, 2001.

BACCIGALUPI, L. Small surface-associated factors mediate adhesion of food-isolated strain *Lactobacillus fermentum* to Caco-2 cells. **Research in Microbiology**, v. 156, p. 830-836, 2005.

BIEDRZYCKA, E. M. Immunostimulative activity of probiotic Bifidobacterium strains determined in vivo using ELISA method. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 12, p. 20-23, 2003.

CARIN, E. G. H.; SEEGER, J. F. M. L.; POWWELS, P. H. Gut-associated lactobacilli for oral immunization. **Food Research International**, v. 35, p. 151-163, 2002.

CASTANHEIRA, L. G. *et al.* *Lactobacillus delbrueckii* as a potential skin adjuvant for induction of type 1 immune responses. **Frontiers in Bioscience**, v. 12, p. 1300-1307, 2007.

CORR, S. C.; GAHAN, C. G. M.; HILL, C. Impact of selected *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species on *Listeria monocytogenes* infection and the mucosal immune response. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 50, p. 380-388, 2007.

DE SIMONE, C. Effect of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* on gut mucosa and peripheral blood B lymphocytes. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 14, p. 331-340, 1992.

DEL PIANO, M. Probiotics: from research to consumer. **Digestive and Liver Disease**, v. 38, p. S248-S255, 2006.

DO CARMO, A. P. **Produção de cultura DVS (Direct Vat Set) para *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 cultivado em soro de queijo minas frescal**. 2006. 66 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

ELO, S.; SAXELIN, M.; SALMINEN, S. Attachment of *Lactobacillus casei* strain GG to human colon carcinoma cell line Caco-2: comparison with other dairy strains. **Letters in Applied Microbiology**, v. 13, p. 154-156, 1991.

FALK, P.; ROTH, K. A.; GORDON, J. I. Lectins are sensitive tools for defining the differentiation programs of mouse gut epithelial cell lineages. **American Journal of Physiology**, v. 266, p. 987-1003, 1994.

FILHO-LIMA, J. V.; VIEIRA, E. C.; NICOLI, J. R. Antagonistic effect of *Lactobacillus acidophilus*, *Saccharomyces boulardii* and *Escherichia coli* combinations against experimental infections with *Shigella flexneri* and *Salmonella enteritidis* subsp. *typhimurium* in gnotobiotic mice. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 365-360, 2000.

FINLAY, B. B., COSSART, P. Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. **Science**, v. 276, p. 718-725, 1997.

FOOKS, L. J.; FULLER, R.; GIBSON, G. R. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. **International Dairy Journal**, v. 9, p. 53-61, 1999.

GANUSOV, V. V.; BRILKOV, A. V. Estimating the instability parameters of plasmid-bearing cells in chemostat culture. **Journal Theoretical Biology**, v. 219, p. 193-205, 2002.

GERMOND, J. E. *et al.* A new mobile genetic element in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. **Molecular and General Genetics**, v. 248, p. 407-416, 1995.

GILL, S. R. *et al.* Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. **Science**, v. 312, p. 1355-1359, 2006.

ISOLAURI, E.; JUNTUNEN, M.; RAUTANEN, T. A human *Lactobacillus* strain (*Lactobacillus* GG) promotes recovery from acute diarrhea in children. **Pediatrics**, v. 88, p. 90-97, 1991.

JAKAVA-VILJANEN, M. *et al.* Isolation of three new surface layer protein genes (*slp*) from *Lactobacillus brevis* ATCC14869 and characterization of the change in their expression under aerated and anaerobic conditions. **Journal of Applied Microbiology**, v. 184, p. 6786-6795, 2002.

KIM, E. R. *et al.* The study of lactic acid bacteria in yogurt during delivery and storage. **Korean Journal of Dairy Science**, v. 14, p. 260-268, 1993.

- LAVERNICOCCA, P. Highlights on new food research. **Digestive and Liver Disease**, v. 38, p. S295-S299, 2006.
- LEE, Y. K.; SALMINEN, S. The coming age of probiotics. **Trends in Food Science and Technology**, v. 6, p. 241-245, 1995.
- LEITE, M. O. **Processos para desenvolvimento de produtos lácteos probióticos com *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20**. 2005. 76 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005.
- LEY, R. *et al.* Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. **Nature**, v. 444, p. 1022-1023, 2006.
- LIN, W.-W. *et al.* Different probiotic properties for *Lactobacillus fermentum* strains isolated from swine and poultry. **Anaerobe**, v. 13, p. 107-113, 2007.
- MARTIN, F.-P. J. *et al.* Probiotic modulation of symbiotic gut microbial-host metabolic interactions in a humanized microbiome mouse mouse. **Molecular Systems Biology**, v. 4, 2008. 157 p.
- MATSUZAKI, T. Immunomodulation by treatment with *Lactobacillus casei* strain Shirota. **International Journal of Food Microbiology**, v. 41, p. 133-140, 1998.
- MORELLI, L. Probiotics: clinics and/or nutrition. **Digestive and Liver Disease**, v. 34, p. S8-S11, 2002.
- MOURA, L. N. *et al.* Protection by *Lactobacillus acidophilus* UFV H2b20 against experimental oral infection with *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser, Typhimurium in gnotobiotic and conventional mice. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, p. 66-69, 2001.
- NEUMANN, E. *et al.* Q. Monoassociation with *Lactobacillus acidophilus* UFV H2b20 stimulates the immune defense mechanisms of germfree mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, p. 1565-1573, 1998.
- NGUYEN, T. D. T.; KANG, J. H.; LEE; M. S. Characterization of *Lactobacillus plantarum* PH04, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. **International Journal of Food Microbiology**, v. 113, p. 358-361, 2007.
- NICHOLSON, J. K.; HOLMES, E.; WILSON, I. D. Gut microorganisms, mammalian metabolism and personalized health care. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 431-438, 2005.
- NICHOLSON, J. K. Global systems biology, personalized medicine and molecular epidemiology. **Molecular Systems Biology**, v. 2, 2006. 52 p.
- PELTO, L. *et al.* Probiotic bacteria down-regulate the milk-induced inflammatory response in milk-hypersensitive subjects but have an immunostimulatory effect in healthy subjects. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 28, p. 1474-1479, 1998.

- PEREIRA, D. I. A.; MCCARTNEY, A. L.; GIBSON, G. R. An in vitro study of the probiotic potential of a bile-salt-hydrolysing *Lactobacillus fermentum* strain, and determination of its cholesterol-lowering properties. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 4743-4752, 2003.
- PÉREZ, P. F. *et al.* Inhibition of *Giardia intestinalis* by extracellular factors from *Lactobacillus*: An in vitro study. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 5037-5042, 2001.
- REID, G. *et al.* New scientific paradigms for probiotics and prebiotics. **Journal Clinical Gastroenterology**, v. 37, p. 105-118, 2003.
- RIBEIRO, M. A. **Aspectos da produção de peróxido de hidrogênio e inibição de bactérias por *Lactobacillus acidophilus* UFV H2b20.** 1995. 60 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1995.
- SANTOS, N. S. **Isolamento e caracterização de *Lactobacillus acidophilus* de fezes de crianças alimentadas ao seio e de bezerros, visando à sua utilização como adjuvante dietético.** 1984. 69 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1984.
- SAXELIN, M. *et al.* Dose response colonization of faeces after oral administration of *Lactobacillus casei* strain GG. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 4, p. 209-214, 1991.
- SHAH, N. P. Probiotic bacteria: antimicrobial and antimutagenic properties. **Probiotica**, v. 6, p. 1-3, 1999.
- SHAH, N. P. Functional cultures and health benefits. **International Journal of Food Microbiology**, v. 17, p. 1262-1277, 2007.
- SINGH, J. *et al.* *Bifidobacterium longum*, a lactic acid-producing intestinal bacterium inhibits colon cancer and modulates the intermediate biomarkers of colon carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 18, p. 833-841, 1997.
- STEIDLER, L. Genetically and engineered probiotics. **Best Practice e Research Clinical Gastroenterology**, v. 17, p. 861-876, 2003.
- SUCCI, M. *et al.* Bile salt and acid tolerance of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. **FEMS Microbiology Letters**, v. 244, p. 129-137, 2005.
- TANNOCK, G. W. Analysis of the intestinal microflora: a renaissance. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 76, p. 265-278, 1999.
- TUOMOLA, E. *et al.* Quality assurance criteria for probiotic bacteria. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, p. 393S-398S, 2001.

TUOMOLA, E. M.; SALMINEN, S. J. Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures. **International Journal of Food Microbiology**, v. 41, p. 45-51, 1998.

VRESE, M. *et al.* Probiotics compensation for lactase insufficiency. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, p. 421S-429S, 2001.

YOON, H. *et al.* Systematic review of epidemiological studies on meat, dairy products, and egg consumption and risk of colorectal adenomas. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 9, p. 151-164, 2000.

## **Estudos comparativos da linhagem selvagem de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 e da linhagem mutante desprovida de capacidade de imunoestimulação**

**Resumo:** Bactérias probióticas são utilizadas na indústria de fermentados com o objetivo de exercer efeitos benéficos à saúde daqueles as consomem. *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 é uma bactéria com comprovado potencial probiótico, cujas sucessivas transferências em meio de cultura em laboratório resultaram no isolamento de um mutante espontâneo incapaz de imunoestimular camundongos livres de germes. A investigação das causas da perda dessa característica foi o objetivo desse trabalho. A identidade das duas bactérias foi demonstrada por seqüenciamento do rDNA 16S e por Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE). A instabilidade não foi atribuída ao processo de cura de plasmídeos, visto que eles se apresentaram inexistentes nas bactérias, selvagem e mutante, quando foram utilizados o método convencional de extração de DNA plasmidial e o de Eletroforese em Gel em Campo Pulsado (PFGE). A presença de proteínas de superfície em *L. delbrueckii* UFV H2b20, selvagem e mutante, foi demonstrada por Eletroforese em Gel de Poli(acrilamida) com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE). As bactérias exibiram o mesmo perfil de bandas, mas mostraram diferenças quanto à expressão de proteínas de tamanho correspondente ao de proteínas S. A seqüência resultante da porção da âncora do gene codificador de proteína S foi a única região do gene amplificada por Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) no selvagem e no mutante. Inferiu-se que o *L. delbrueckii* UFV H2b20 não expressa tais proteínas. A espectroscopia de massa das proteínas de maior expressão na selvagem e o seqüenciamento de C-terminal em MALDI-TOF/TOF revelaram similaridade com proteínas intracelulares, uma evidência de que ocorreu dano no envelope celular durante o processo de extração de proteínas de superfície. Assim, a hipótese de existência de diferenças entre as duas linhagens, no que se refere às superfícies, não pôde ser comprovada com a metodologia utilizada. A análise da morfologia celular por microscopia eletrônica de varredura (SEM) demonstrou que as células das duas linhagens são semelhantes, enquanto a análise da morfologia celular por microscopia eletrônica de transmissão (TEM) revelou que ambas não possuem arranjo do tipo camada S em sua superfície. Em experimentos de *Surface Plasmon Resonance* (SPR), as linhagens apresentaram diferença quanto à capacidade de ligação ao carboidrato N-acetilglicosamina (N-GlcNAc), porém, estatisticamente, os valores não foram significativos. Os resultados encontrados demonstram que a perda da capacidade de imunoestimulação se relaciona à superfície celular de *L. delbrueckii* UFV H2b20, embora esta característica possa não ser a única explicação para tal evidência. Uma posterior caracterização da superfície da linhagem mutante poderá desvendar componentes de superfície importantes para a imunoestimulação presentes na linhagem selvagem.

**Palavras-chave:** *Lactobacillus delbrueckii*; probiótico; imunoestimulação; proteínas de superfície; microscopia eletrônica; SDS-PAGE; MALDI-TOF/TOF; *Surface Plasmon Resonance* (SPR).

## Comparative studies of the wild type strain of *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 and of the mutant strain without the immunostimulation ability

**Abstract:** Probiotic bacteria are used in the industry of fermented products with the objective of obtaining beneficial effects for the health of their consumers. *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 is a bacterium with a proved probiotic potential, whose successive transferences on growth medium in laboratory resulted in the isolation of a spontaneous mutant unable to immunostimulate mice free germs. The objective of this work was to investigate the causes of the loss of this characteristic. The identity of the two bacteria was demonstrated by the rDNA 16S sequencing and by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). The instability was not attributed to the plasmid curing process, because they do not exist in the bacteria, both wild and mutant, when the conventional method of extraction of the plasmidial DNA and the Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) were used. The presence of surface proteins in *L. delbrueckii* UFV H2b20, both on the wild type the mutant, was demonstrated by Gel Electrophoresis of Polyacrylamide with Sodium Dodecyl Sulphate (SDS-PAGE). The bacteria showed the same profile of bands, but showed differences as to the expression of proteins with corresponding size to the S proteins. The sequence resulting of the anchor portion of the codifier gene of the S protein was the only region of the gene amplified by the Polymerase Reaction (PCR) in the wild type and in the mutant. It was inferred that the *L. delbrueckii* UFV H2b20 does not express such proteins. The Mass Spectroscopy of the proteins with the greatest expression in the wild type and the sequencing of C-terminal in MALDI-TOF/TOF showed similarity with intracellular proteins, which is an evidence that damage on the cellular envelope during the extraction process of the surface proteins occurred. Thus, the hypothesis of the existence of differences between the two strains, in relation to the surface, could not be proved with the methodology used. The analysis of the cellular morphology by the Scanning Electronic Microscopy (SEM) showed that the cells of the two strains are similar, while the analysis of the cellular morphology by Transmission Electronic Microscopy (TEM) showed that both do not have an arrangement of the S layer type on their surface. In experiments with Surface Plasmon Resonance (SPR), the strains showed difference as to the ability of binding on the carbohydrate N-acetylglucosamine (N-GlcNac), but, statistically, the values were not significant. The results found show that the loss of the ability of immunostimulation is related to the cellular characteristic of *L. delbrueckii* UFV H2b20, although this surface could not be the only explanation for this evidence. A further characterization of the surface of the mutant strain can discover surface components that are important for the immunostimulation of the wild type.

**Keywords:** *Lactobacillus delbrueckii*, probiotic, immunostimulation, surface proteins, electronic microscopy, SDS-PAGE, MALDI-TOF/TOF, Surface Plasmon Resonance (SPR).

## 1. Introdução

Bactérias do ácido láctico são historicamente definidas como um grupo de bactérias microaerofílicas, Gram-positivas, que fermentam açúcares do tipo hexose para produzir ácido láctico como principal produto de fermentação. Atualmente, as bactérias do ácido láctico desempenham papel importante na fabricação de produtos fermentados de leite, vegetais e carnes, bem como no processamento de outros produtos como o vinho. Os gêneros mais utilizados industrialmente são *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Lactobacillus* (BOLOTIN *et al.*, 1999).

Bactérias do ácido láctico têm sido amplamente estudadas e estão entre os microrganismos mais bem caracterizados, considerando aspectos genéticos, fisiológicos e possíveis aplicações. O conhecimento dos genomas dessas bactérias levará a um melhor entendimento da fisiologia das bactérias do ácido láctico, em particular por meio da aplicação de ferramentas como genômica, proteômica, análise global de transcrição e genômica comparativa (RENAULT, 2002). Genomas de várias bactérias do ácido láctico foram seqüenciados, como *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus salivarius* e *Streptococcus thermophilus* (MAKAROVA *et al.*, 2006).

*Lactobacillus* é um dos maiores e mais heterogêneos gêneros bacterianos, atestado pela grande variação no conteúdo G+C entre as espécies (33 a 55%), possuindo 135 espécies e 27 subespécies (BERNARDEAU *et al.*, 2007). Tradicionalmente, *Lactobacillus* está dividido em três grupos de acordo com o tipo de fermentação de açúcar. Lactobacilos homofermentativos obrigatórios fermentam açúcares hexoses pela glicólise e produzem principalmente ácido láctico, enquanto os lactobacilos heterofermentativos obrigatórios usam a via 6-fosfogluconato/fosfocetolase (6PG/PK) e produzem outros produtos além de ácido láctico, como CO<sub>2</sub> e etanol. O terceiro grupo inclui os heterofermentativos facultativos que fermentam hexoses via glicólise e pentoses via 6PG/PK. A classificação tem sido baseada em características fenotípicas e, em muitos casos, ela é confirmada por análises genotípicas como comparação DNA-DNA ou rDNA 16S (GAVINI *et al.*, 1991; KLEIN *et al.*, 1998).

A Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE) é um dos métodos mais discriminatórios e reproduzíveis para a diferenciação de linhagens de lactobacilos e tem

sido utilizada com sucesso em análises genéticas de linhagens originais de produtos lácteos (BERNARDEAU *et al.*, 2007). Na última década, a técnica da eletroforese foi utilizada para a genotipagem de vários lactobacilos como *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus rhamnosus* (LORTAL *et al.*, 1997).

A diversidade genética de linhagens de *L. helveticus* foi estimada por PFGE e revelou dois *clusters* diferentes para isolados de iogurte e queijo (DIMITROV *et al.*, 2005). A mesma técnica foi utilizada para analisar a diversidade genética de linhagens de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* isoladas de queijos, mostrando-se eficiente para uma ampla discriminação dessas linhagens (GIRAFFA *et al.*, 2004).

O genoma de *Lactobacillus gasserii* ATCC33323 foi analisado por PFGE aliado a técnicas de hibridização. A análise por PFGE do DNA cromossomal da linhagem permitiu a estimativa do tamanho do genoma em 1,96 Mpb e revelou a presença de um plasmídeo linear de 48,5 kpb (EL-OSTA *et al.*, 2002).

Outra ferramenta molecular utilizada na análise de comunidade de *Lactobacillus* e outras bactérias lácticas é a Eletroforese em Gel com Gradiente de Temperatura ou com Gradiente Desnaturante (T/DGGE). Na prática, DNA ou RNA são extraídos a partir da amostra e um fragmento do rDNA ou rRNA é amplificado usando *primers* específicos para *Bacteria* ou para outros grupos filogenéticos. Os amplicons de tamanho igual, mas com variação de seqüência, são separados pelo uso de técnicas eletroforéticas específicas como TGGE ou DGGE. Após a coloração do gel, os amplicons com diferentes seqüências são visualizados como fragmentos separados no gel formando uma impressão digital (*fingerprint*) da comunidade microbiana (MUYZER e SMALLA, 1998).

O monitoramento de *L. plantarum* e *Oenococcus oeni* em vinho tinto após o início da fermentação alcoólica foi realizado pela técnica de PCR-DGGE. A ferramenta molecular mostrou-se reproduzível e adequada, podendo ser utilizada com grande valia para monitorar microrganismos deterioradores durante a fermentação de vinho (SPANNO *et al.*, 2007).

A técnica de PCR-DGGE confirmou que as populações de *Bifidobacterium* em fezes de adultos são hospedeiras específicas e estáveis ao longo do tempo. PCR-DGGE ainda revelou heterogeneidade intragenômica na seqüência de rDNA 16S em *Bifidobacterium adolescentis* E-981074. Esta linhagem possui cinco cópias de rDNA

16S , duas das quais foram seqüenciadas e diferem entre si em oito posições (SATOKARI *et al.*, 2001).

A técnica de PCR-DGGE foi utilizada com sucesso para analisar o número de cópias polimórficas do rDNA 16S em linhagens de *Lactobacillus*, tendo sido verificado que ela é capaz de discriminar linhagens em nível de subespécie (FLORESTA, 2003).

Além de contribuir com a textura e o sabor em produtos fermentados, algumas bactérias do ácido láctico podem encontrar-se associadas ao trato gastrointestinal de humanos e animais (LOURENS-HATTINGH e VILJOEN, 2001). Dentre os gêneros bacterianos mais utilizados como probióticos, encontra-se o *Lactobacillus* (FULER, 1989). Efeitos benéficos como manutenção da microbiota normal, aderência ao tecido epitelial do hospedeiro, eliminação de patógenos ou redução da sua aderência ao epitélio intestinal, imunomodulação, imunostimulação e atividade anticarcinogênica e antimutagênica são atribuídos aos probióticos (KLAENHAMMER, 1998; ISHIBASHI e YAMAZAKI, 2001; KAUR *et al.*, 2002; OUWEHAND *et al.*, 2002).

Dentre os critérios para a seleção de linhagens probióticas, estão a estabilidade fenotípica e genotípica, incluindo-se a estabilidade de plasmídeos, os padrões de utilização de carboidratos e proteínas, a total segurança para o hospedeiro, a habilidade de resistir às condições encontradas no trato gastrointestinal (baixo pH gástrico e sais biliares), a capacidade de adesão a células epiteliais do intestino, a atividade antimicrobiana, a resistência a antibióticos, a imunogenicidade, a tolerância a aditivos presentes em alimentos e a estabilidade na matriz do alimento (HAVENAAR e HUIS IN'T VELD, 1992; TUOMOLA *et al.*, 2001).

A adesão das bactérias probióticas ao epitélio intestinal é umas das características mais importantes, pois ela é um pré-requisito para a colonização inicial do trato gastrointestinal humano e posterior proliferação (WESTERLUND e KORHONEN, 1993; KAUR *et al.*, 2002). A adesão das bactérias probióticas à mucosa intestinal pode prolongar os efeitos probióticos no balanço da microbiota intestinal (KALLIOMAKI e ISOLAURI, 2004).

As funções da mucosa intestinal são proteger o hospedeiro contra infecções por bactérias patogênicas e promover um ambiente adequado para as bactérias intestinais. O muco intestinal consiste de uma cadeia de peptídeos que contém domínios glicosilados e não-glicosilados alternados. N-acetilglicosamina (GlcNAc), N-acetilgalactosamina, fucose e galactose são os quatro oligossacarídeos primários presentes no muco intestinal (FORSTNES *et al.*, 1995). Embora desempenhe importante papel nas interações entre o

microbioma intestinal e o hospedeiro, são pouco conhecidos os mecanismos de adesão de bactérias probióticas (UCHIDA *et al.*, 2004; NICHOLSON, 2006).

Em *Lactobacillus*, a adesão ao epitélio intestinal tem sido relacionada a proteínas de superfície, entretanto, poucas delas foram identificadas até o presente (AVALL-JAASKELAINEN *et al.*, 2003).

Proteínas da camada S são proteínas de superfície formadas por arranjos cristalinos monomoleculares encontrados em vários organismos dos domínios *Bacteria* e *Archaea* (SÁRA e SLEYTR, 2000). As proteínas da camada S estão organizadas em arranjos que podem exibir simetria oblíqua (p1 e p2), quadrada (p4) ou hexagonal (p3 e p6). A simetria hexagonal é predominantemente encontrada em *Archaea*; e, em *Bacteria*, as simetrias quadrada e oblíqua são as mais frequentemente encontradas (SLEYTR e BEVERIDGE, 1999).

As proteínas da camada S estão ligadas não - covalentemente umas às outras e à membrana ou parede celular que as suportam. As proteínas da camada S estão ligadas ao peptídeoglicano em bactérias Gram-positivas, em arqueas, à pseudomureína e em bactérias Gram-negativas em componentes da membrana externa, como os lipopolissacarídeos. Em arqueas que não possuem parede celular rígida, as proteínas da camada S apresentam-se associadas à membrana plasmática (ENGELHARDT e PETERS, 1998).

A camada S pode ser desintegrada por altas concentrações de agentes que quebram ligações de hidrogênio, como uréia e hidrócloro de guanidina, ou detergentes em pH<4, ou por substituição de cátion, como substituição de Ca<sup>+2</sup> por Na<sup>+</sup> ou Li<sup>+</sup> (SÁRA e SLEYTR, 2000).

Dentre as funções que têm sido atribuídas à camada S, destacam-se determinante da forma celular, proteção da célula, sítio de adesão para exoenzimas, envolvimento na adesão da célula e reconhecimento celular, entre outras (SLEYTR e BEVERIDGE, 1999; SÁRA e SLEYTR, 2000). Em algumas bactérias patogênicas como *Campylobacter fetus* (BLASER e PEI, 1993), *Aeromonas salmonicida* (CHU *et al.*, 1993) e *Bacteroides forsythus* (SABET *et al.*, 2003), a camada S tem contribuído para a virulência.

Muitas espécies de *Lactobacillus* possuem camada S e, em alguns casos, os genes codificadores para as proteínas da camada S foram clonados e seqüenciados (AVALL-JAASKELAINEN e PALVA, 2005). As proteínas da camada S do gênero

*Lactobacillus* estão entre as menores conhecidas tendo uma média de 25 a 71 kDa e apresentando pI entre 9,35 e 10,4 (SÁRA e SLEYTR, 2000).

Em *L. acidophilus* foi proposto que a camada S medeia a ligação às células do epitélio intestinal de aves (SCHNEITZ *et al.*, 1993). A camada S de *Lactobacillus crispatus* medeia a ligação ao colágeno (TOBA *et al.*, 1995), e a proteína SlpA de *Lactobacillus brevis* ATCC 8287 medeia a adesão às células intestinais e à fibronectina *in vitro* via região N-terminal da proteína SlpA (HYNONEN *et al.*, 2002). Proteínas da camada S de *L. crispatus* ZJ001 estão envolvidas na adesão e na exclusão competitiva de patógenos a células HeLa (CHEN *et al.*, 2007). O pré-tratamento de células epiteliais do hospedeiro com extrato de proteínas da camada S de *Lactobacillus helveticus* R0052, linhagem probiótica, antes de infecção com *E. coli* O157:O7 diminuiu a aderência do patógeno, indicando que constituintes não viáveis de bactéria probiótica devem atuar na interrupção do processo infeccioso de um patógeno intestinal (JOHNSON-HENRY *et al.*, 2007).

*Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 é uma linhagem probiótica que vem sendo estudada há mais de vinte anos (SANTOS, 1984; AGOSTINHO, 1988; RIBEIRO, 1995; NEVES, 1998; UETANABARO, 1999; MONTEIRO, 1999; FILHO-LIMA *et al.*, 2000; MOURA *et al.*, 2001; NEVES, 2003; FLORESTA, 2003; TEIXEIRA, 2004; MAGALHÃES, 2005; FERREIRA, 2006). Os resultados obtidos ao longo desses anos demonstram que essa linhagem tem alto potencial de colonizar e imunoestimular o trato gastrintestinal humano (NEUMANN *et al.*, 1998; CASTANHEIRA *et al.*, 2007). Processos de produção em escala piloto foram desenvolvidos para vários produtos, nos quais a linhagem *L. delbrueckii* UFV H2b20 se apresentou viável durante o monitoramento do produto ao longo do processo de estocagem (LEITE, 2005; DO CARMO, 2006).

A estabilidade genética das linhagens probióticas é uma característica importante para a manutenção de sua funcionalidade.

Uma linhagem mutante desprovida da capacidade de imunoestimulação foi isolada e utilizada para estudos de elucidação dos fatores que podem causar a instabilidade de tal característica por comparação com a linhagem selvagem. Neste capítulo, propôs-se estudar as possíveis causas da alteração genotípica que ocasionou a perda da capacidade de imunoestimulação na linhagem mutante.

## 2. Material e Métodos

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia Industrial e Biotecnologia do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária – BIOAGRO, na Universidade Federal de Viçosa e no Laboratório do *Food Science Department*, em *Cornell University*.

Todos os experimentos foram realizados utilizando-se culturas de células de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 selvagem e mutante para que se pudessem estabelecer comparações.

### 2.1. Seqüenciamento de rDNA 16S

O rDNA 16S foi amplificado tendo como molde o DNA genômico das duas linhagens de *L. delbrueckii* UFV H2b20. Os *primers* utilizados foram FD (5'-CCG AAT TCG TCG ACA ACA GAG TTT GAT CCT GGC TCA G-3') e MD (5'- CCC GGG ATC CAA GCT TAA GGA GGT GAT CCA GCC-3') (WEISBURG *et al.*, 1991). O programa utilizado para a Reação de Polimerização em Cadeia (PCR) foi composto de 1 minuto a 94 °C, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos, 72 °C por 1 minuto e 30 segundos e uma extensão final de 72 °C por 7 minutos. Os produtos da reação de PCR foram clonados em *Escherichia coli*, usando TOPO-TA *Cloning System* (Invitrogen). Os clones positivos tiveram o DNA plasmidial extraído, purificado e seqüenciado. As seqüências obtidas foram comparadas pelo programa NTI *Vector Advance*<sup>®</sup> *Software* (Invitrogen - Disponível em: <<http://www.invitrogen.com>>).

### 2.2. PCR – DGGE

Fragmentos do gene codificador do rRNA 16S das linhagens selvagem e mutante de *L. delbrueckii* UFV H2b20 foram amplificados por PCR. O molde utilizado para as reações de amplificação foi o DNA total de cada microrganismo.

A análise de DGGE dos fragmentos amplificados por PCR foi realizada de acordo com Muyzer *et al.* (1993), utilizando o sistema DCode (Bio-Rad, Hercules, Califórnia).

O gel de poliacrilamida utilizado foi 8% (p/vol) acrilamida-bisacrilamida (37,5:1) em Tampão TAE 1X (40 mM Tris-HCl, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA)

com um gradiente linear de desnaturantes de 45 a 60%. Um desnaturante a 100% corresponde a 7 M de uréia e 40% (v/v) de formamida. O gel foi preparado segundo instruções do fabricante (Bio-Rad, Hercules, Califórnia).

Os fragmentos amplificados por PCR foram separados por eletroforese a uma voltagem constante de 50 V a 60 °C, por 14 a 16 horas. Transcorrido o tempo da eletroforese, o gel foi corado com *Syber Gold IX (Invitrogen)* e visualizado no sistema de digitalização de imagem *EagleEye System (Stratagene<sup>TM</sup>)*.

### **2.3. Extração de plasmídeo**

DNA plasmidial foi extraído de acordo com O'Sullivan e Klaenhammer (1993), com modificações.

As células foram cultivadas por 16 a 18 horas em meio MRS a 37 °C, coletadas por centrifugação a 7.000 g por 5 minutos e ressuspensas em 200 µL de sacarose 25% (p/v), contendo 30 mg mL<sup>-1</sup> de lisozima. A solução foi incubada a 37 °C por 15 minutos. Adicionaram-se 400 µL da solução de lise alcalina (SDS 3%, 0,2N NaOH) e incubou-se a mistura em temperatura ambiente por 7 minutos. Um volume de 300 µL de acetato de sódio 3 M (pH 4,8) foi adicionado. Misturou-se imediatamente e centrifugou-se a 12.000 g por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi completamente removido e o sedimento foi ressuspensado em 320 µL de água deionizada. Adicionaram-se 200 µL de acetato de amônio 7,5 M e 350 µL de fenol:clorofórmio. Centrifugação a 12.000 g por 10 minutos a 4 °C foi feita para separar a fase aquosa da fase orgânica. A fase superior foi transferida para um tubo novo e 1 mL de etanol absoluto foi adicionado. Novamente, a solução foi centrifugada sob as mesmas condições. O sobrenadante foi removido e o sedimento foi lavado com etanol 70%, seco em temperatura ambiente e ressuspensado em TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) (pH 8,0). As preparações foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 0,8%. A imagem foi digitalizada pelo *EagleEye System (Stratagene<sup>TM</sup>)*.

### **2.4. Eletroforese em gel em campo pulsado (PFGE)**

A eletroforese em gel em campo pulsado foi realizada segundo Giraffa *et al.* (2004), com modificações.

As células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 selvagem e mutante foram cultivadas em meio MRS (*Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA*) a 37 °C, por 16-18 horas. Para preparação dos *plugs*, 3 mL da cultura foram centrifugados a 7.000 g por 5 minutos. As células foram lavadas por três vezes em tampão SE (75 mM NaCl; 25 mM EDTA). As células foram então ressuspensas em 100 µL de tampão SE, misturadas com 900 µL de agarose *Low Melting Point, LMP (Bio-Rad Laboratories)*. Após a homogeneização, a solução foi colocada nos moldes para confecção dos *plugs*. Quando os *plugs* adquiriram consistência adequada, eles foram colocados em tubos de 15 mL e tratados com tampão SE suplementado com 3 mg mL<sup>-1</sup> de lisozima por 2 horas a 37 °C. Após esse período, a solução foi descartada e os *plugs* foram lavados três vezes com o tampão SE e, em seguida três vezes com água autoclavada pré-aquecida. Todas as lavagens duraram 30 minutos e eram feitas sob agitação. Os *plugs* foram tratados com tampão ES (500 mM EDTA; 1% (p/v) N-laurilsarcosina) (pH 9,5) acrescido de 0,4 mg mL<sup>-1</sup> de proteinase K a 37 °C, por 16-18 horas. Novamente, o tampão foi descartado e os *plugs* foram lavados três vezes com água autoclavada pré-aquecida e três vezes com TE (tris EDTA, pH 8,0). Um *plug* de cada amostra foi aplicado em gel de agarose 1% e submetido à eletroforese no aparelho *Chef-DRIII® System (Bio-Rad)*. A condição da corrida foi pulso inicial, 1 segundo; pulso final, 50 segundos; duração da corrida, 24 horas; ângulo 120°; 6 V/segundo e temperatura de 14 °C. Após a eletroforese, o gel foi corado com solução de brometo de etídio. A imagem foi digitalizada pelo *EagleEye System (Stratagene™)*.

## **2.5. Análise de morfologia celular por microscopia eletrônica de varredura (SEM)**

As células foram cultivadas em 10 mL de meio MRS até atingir a fase estacionária de crescimento, coletadas por centrifugação (3.000 g, 4 °C por 10 minutos) e lavadas duas vezes com tampão salina fosfato (PBS 0,05 M pH = 7,4). As células foram fixadas com glutaraldeído 2% (v/v) e incubadas em banho de gelo por 2 horas. Depois, foram lavadas com tampão salina fosfato PBS e pós-fixadas com tetróxido de ósmio por 1 hora em banho de gelo. Finalmente, foram desidratadas com séries crescentes de etanol, que variaram de 25 a 100%. As células desidratadas foram colocadas sobre a superfície de um *grid* de ouro e, então, observadas ao microscópio de varredura LEO (*Zeiss*) 1550 no *Cornell Center for Materials Research*, na Universidade de Cornell.

## **2.6. Análise de morfologia celular por microscopia eletrônica de transmissão (TEM)**

As células que cresceram em meio MRS por 18 horas foram centrifugadas (3.000 g por 10 min a 4 °C) e lavadas duas vezes com PBS (tampão salina fosfato 0,05 M, pH 7,4). As células foram fixadas com glutaraldeído 2% (v/v) e incubadas em banho de gelo 2 horas. Depois, foram lavadas com tampão salina fosfato e pós-fixadas com tetróxido de ósmio por 1 hora em banho de gelo. Finalmente, foram desidratadas com séries crescentes de etanol, que variaram de 25 a 100%. As células desidratadas foram embebidas em resina epoxi (Quetol 1651), cortadas com o ultramicrotomo (*MT 5000 Sorval<sup>®</sup> Ultramicrotome Dupont*) e colocadas sobre a superfície de um *grid* de ouro. As amostras foram coradas com acetato de uranila e observadas ao microscópio de transmissão (120 kV FEI *Tecnai 12 microscope*), no *Cornell Center for Materials Research*, na Universidade de Cornell.

## **2.7. Experimentos de *Surface Plasmon Resonance* (SPR)**

### **2.7.1. Preparação das células**

Uma alíquota de 5 mL de células bacterianas cultivadas por 18 horas em meio MRS foram centrifugadas (3.000 g, 4 °C, 10 min) e lavadas duas vezes com a solução tampão HBS-EP (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3.4 mM EDTA, 0.005% surfactante P20 – Tween 20; pH 7.4). As células foram ressuspensas no mesmo tampão e utilizadas para o ensaio de ligação no Leica SP7000 *Surface Plasmon Resonance Refractometer* (*Reichert Analytical Instruments*).

### **2.7.2. Preparação do *chip* sensor**

Superfícies de ouro (Au) foram modificadas com monocamadas automontáveis (*Self-Assembled Monolayers* – SAMs) de forma a apresentar unidades de carboidrato (N-Acetilglicosamina – GlcNAc) em sua superfície. Os açúcares foram ligados às SAMs via reação “click”, catalisada por cobre. Dois tipos de precursores dissulfetos foram utilizados para formar as SAMs modificadas (LOVE *et al.*, 2005). O carboidrato

GlcNAc foi escolhido para ser ligado à superfície do *chip* por ser um dos componentes mais abundantes no muco intestinal humano.

### **2.7.3. Condições de análise por *Surface Plasmon Resonance* (SPR)**

Testes para a ligação entre as células bacterianas e o *chip* com carboidrato ligado à sua superfície foram feitos com três repetições. *Chips* contendo 50% de carboidrato na superfície foram analisados e comparados com *chips* sem carboidratos utilizados como controle para comparar a adesão. As células foram injetadas na superfície do *chip* com uma taxa de fluxo de  $10 \mu\text{L min}^{-1}$  por 20 min a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , permitindo sua interação com o carboidrato presente na superfície do *chip*. Após a injeção das bactérias, o *chip* foi lavado com o tampão HBS-EP para remover as células não-ligadas. Então, a Unidade de Índice de Refração (RIU) combinada com pixels foi medida.

### **2.8. Extração de proteínas de superfície**

As células foram cultivadas por um período de 18 horas em 100 mL de MRS, foram coletadas por centrifugação e lavadas três vezes com tampão salina fosfato PBS 0,01 M (pH = 7,4). O sedimento de células foi ressuscitado em cloreto de lítio 6 M e deixado à temperatura ambiente por uma hora. A mistura foi centrifugada a 15.000 g por 15 minutos. O sobrenadante foi dialisado contra água a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  por 16-18 horas. Os extratos dialisados foram centrifugados a 20.000 g por 20 minutos a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Os extratos protéicos foram mantidos a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  para uso posterior. No momento do uso, os extratos foram quantificados por *Bradford* (*Coomassie Bradford Protein Assay Kit – Pierce*).

### **2.9. SDS-PAGE**

Os extratos protéicos foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 10% a uma voltagem constante de 200 V por 50 minutos, conforme indicação do fabricante (*Invitrogen Nu-Page kit*). A coloração do gel foi feita por coomassie também como recomendado pelo fabricante (*Invitrogen Nu-Page kit*).

## 2.10. Eletroforese em gel de duas dimensões

Foram testadas duas faixas de pH para a focalização da primeira dimensão: 3-10 e 4-7. Os extratos protéicos originários da linhagem selvagem e da linhagem mutante de *L. delbrueckii* UFV H2b20 foram submetidos à análise no *Biotechnology Resource Center*, na Universidade de Cornell. Dez proteínas que apresentaram maior expressão na linhagem selvagem foram submetidas à espectrofotometria de massa e tiveram seus terminais seqüenciados em *MALDI-TOF/TOF 4700 Analyzer (Applied Biosystems)*.

## 2.11. Seqüenciamento do gene codificador de proteína da camada S

Para o seqüenciamento do gene codificador da proteína da camada das linhagens selvagem e mutante de *L. delbrueckii* UFV H2b20 foram necessários dois conjuntos de *primers*:

S-layerF (5'–GCGCTGCTGCTGCTGCTTTA–3');

S-layerR (5'–GCGTTGTGCTTCAAAGTACG–3') e

FW\_Anchor (5'–CACAACGCATACTACTACGACAAGGACGCT–3');

RV\_Anchor (5'–GCCGTTCTTGAATGTGTATGAAGCACC–3').

Os produtos da reação de PCR foram clonados em *Escherichia coli*, usando *TOPO-TA Cloning System (Invitrogen)*. Os clones positivos tiveram o DNA plasmidial extraído, purificado e seqüenciado. As seqüências obtidas foram comparadas pelo programa *NTI Vector Advance® Software (Invitrogen – Disponível em: <<http://www.invitrogen.com>>)*.

## 3. Resultados e Discussão

### 3.1. Identidade das linhagens selvagem e mutante de *L. delbrueckii* UFV H2b20

A seqüência do rDNA 16S da linhagem mutante de *L. delbrueckii* UFV H2b20 revelou 99% de identidade com a mesma seqüência da linhagem selvagem (número de acesso no GenBank EF015468.1) quando submetida à comparação no programa BLAST (Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.gov/blast>>).

Uma similaridade entre seqüências de rDNA 16S menor que 97% indica linhagens de diferentes espécies (ROSSELÓ-MORA *et al.*, 2001). As variações intra-

específicas nas seqüências de rDNA são causadas pela variação entre as cópias de operons ribossomais de um mesmo microrganismo (CLAYTON *et al.*, 1995). Polimorfismos entre as cópias de rDNA 16S de *L. delbrueckii* UFV H2b20 foram relatados pela análise de restrição amplicons obtidos pela amplificação de rDNA 16S (NEVES, 1998; UETANABARO, 1999) e confirmados por seqüenciamento de operons ribossomais (NEVES, 2003).

Com relação às bandas apresentadas na DGGE (Figura 1), as linhagens mostraram perfil semelhante.

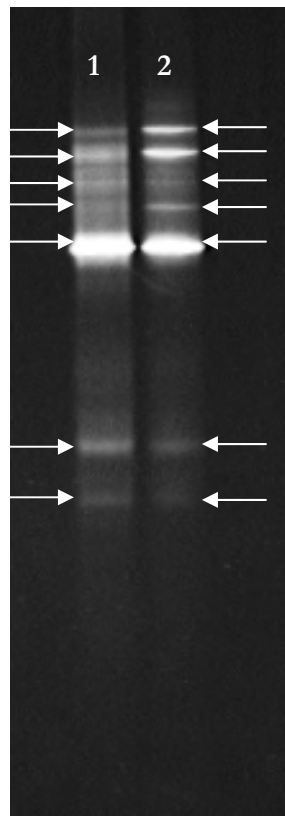


Figura 1 – Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE) do produto da amplificação por PCR do DNA total das linhagens de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 selvagem e mutante amplificado com *primers* específicos para o rDNA 16S. Canaleta 1, *L. delbrueckii* UFV H2b20 selvagem; Canaleta 2, *L. delbrueckii* UFV H2b20. Setas indicam presença de bandas semelhantes nas linhagens.

Os resultados das análises com rDNA 16S mostram que as bactérias em análise são linhagens do mesmo microrganismo e que o mutante não é uma linhagem contaminante. O retorno do *L. delbrueckii* UFV H2b20 mutante ao ambiente original da linhagem selvagem não restituiu seu fenótipo, confirmando que aquela linhagem sofreu uma alteração genotípica de origem desconhecida.

### 3.2. Análise de plasmídeos

A procura pela ocorrência de modificações genéticas que levaram à instabilidade genotípica da linhagem probiótica *L. delbrueckii* UFV H2b20 foi feita também pela análise de plasmídeos.

A primeira técnica utilizada foi descrita para extração de plasmídeos grandes ou pequenos de *Lactobacillus*. A Figura 2 apresenta o resultado da eletroforese das preparações de DNA plasmidial das linhagens de *L. delbrueckii* UFV H2b20 e de uma linhagem Gram-positiva, que possui plasmídeos, gentilmente cedida pelo Laboratório de Biodiversidade e Biotecnologia Aplicada ao Meio Ambiente (LBBMA); *E. coli* com plasmídeos – isolado 29, pertencente à bacterioteca do Laboratório de Microbiologia Industrial e Biotecnologia (MIND) e *E. coli* DH5 $\alpha$ , sem plasmídeos.

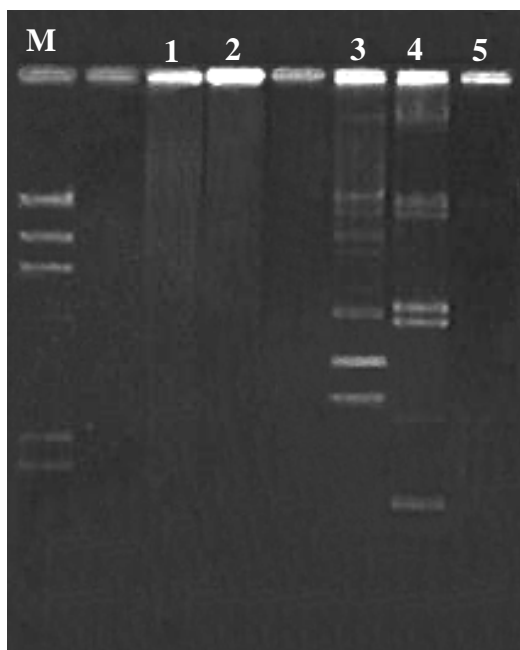


Figura 2 – Eletroforese em gel de agarose 0,8% de DNA plasmidial. M – Marcador  $\lambda$ /HindIII; 1- *L.delbrueckii* UFV H2b20 selvagem; 2- *L.delbrueckii* UFV H2b20 mutante; 3- Isolado Gram-positivo; 4- *E. coli* 29; 5- *E. coli* DH5 $\alpha$ .

As duas linhagens de *L. delbrueckii* UFV H2b20 não apresentaram plasmídeos. Esse fato pode ser explicado pela real ausência dessas estruturas ou pelo fato de os plasmídeos existirem em número reduzido de cópias, o que impossibilitaria sua visualização no gel. Por essa razão, foi realizada a técnica PFGE para verificar se o tamanho dos genomas das linhagens é o mesmo, se existem plasmídeos grandes nas linhagens ou se houve perda deles na linhagem mutante (Figura 3).



Figura 3 – Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE) de DNA total de *L. delbrueckii* UFV H2b20. Canaleta 1, Linhagem selvagem; Canaleta 2, Linhagem mutante; Canaleta M, Marcador *Saccharomyces cerevisiae*, linhagem YPH80.

A técnica de PFGE revelou ausência de plasmídeos nas duas linhagens. Elas apresentaram bandas de DNA únicas e de mesmo tamanho, indicando terem perdido ou adquirido nenhum fragmento de DNA. As linhagens apresentaram DNA cromossomal de tamanho estimado de 1640 Kpb, valor menor que o apresentado pelas duas linhagens de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, que tiveram os genomas completamente seqüenciados, 1.857 Kpb e 1.865 kpb, respectivamente. As linhagens de *L. delbrueckii* UFV H2b20 não apresentam plasmídeos como as linhagens já seqüenciadas (MAKAROVA *et al.*, 2006; van de GUCHTE *et al.*, 2006).

A linhagem mutante de *L. delbrueckii* UFV H2b20 parece não ter sofrido processo de cura de plasmídeo ao longo do período de cultivo em laboratório, uma vez que não foram observados plasmídeos na linhagem selvagem. As características relacionadas à imunomodulação/imunoestimulação, perdidas no mutante, não seriam, portanto, codificadas em plasmídeos.

### 3.3. Análise de morfologia celular por microscopia eletrônica de varredura (SEM)

A Figura 4 mostra micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura da linhagem selvagem (A) e da linhagem mutante (B) de *L. delbrueckii* UFV H2b20.

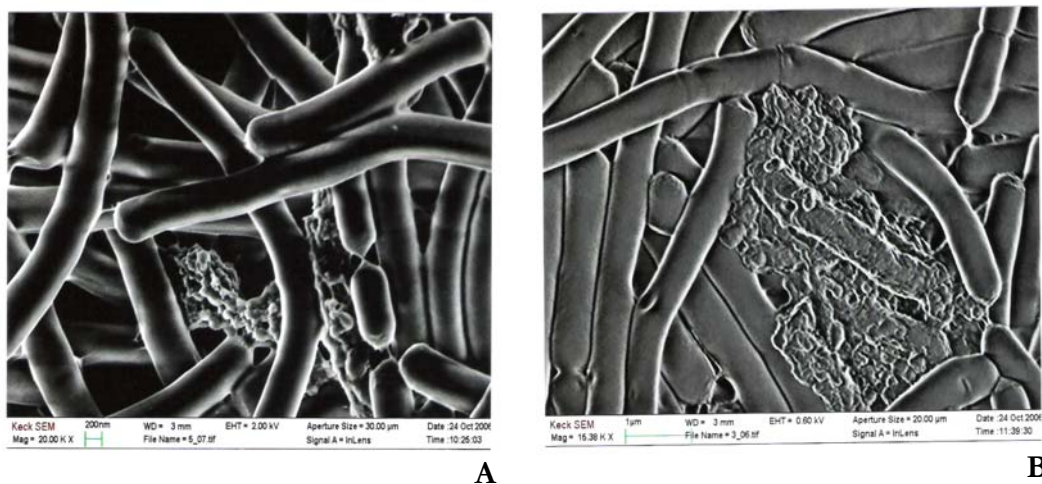


Figura 4 – Microscopia eletrônica de varredura (SEM) de células de *L. delbrueckii* UFV H2b20. (A) Células da linhagem selvagem de *L. delbrueckii* UFV H2b20; (B) Células da linhagem mutante de *L. delbrueckii* UFV H2b20.

As células apresentaram-se alongadas, uma vez que foram coletadas de culturas na fase estacionária de crescimento. Em algumas células é possível observar a divisão celular.

As duas linhagens apresentaram morfologia idêntica, reafirmando o fato de serem pertencentes à mesma espécie, confirmado pela análise de rDNA 16S.

### 3.4. Análise de morfologia celular por microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

A Figura 5 apresenta micrografias obtidas da análise por microscopia eletrônica de transmissão das linhagens selvagem e mutante de *L. delbrueckii* UFV H2b20 e de *B. sphaericus*, utilizada como controle positivo para estrutura de camada S, uma vez que tal estrutura está presente no microrganismo (ILK *et al.*, 2002).

As linhagens selvagem e mutante de *L. delbrueckii* UFV H2b20 não apresentaram arranjos do tipo camada S em sua superfície, como pode ser observado em *B. sphaericus*.

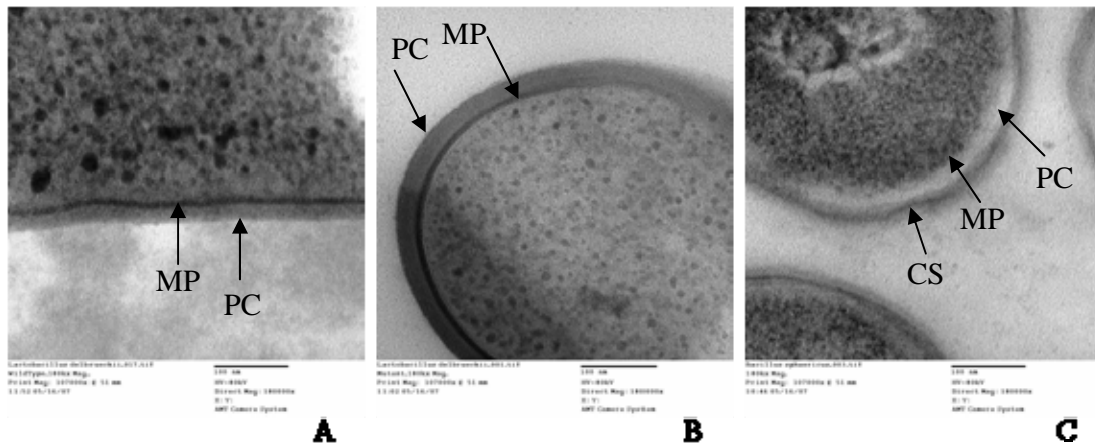


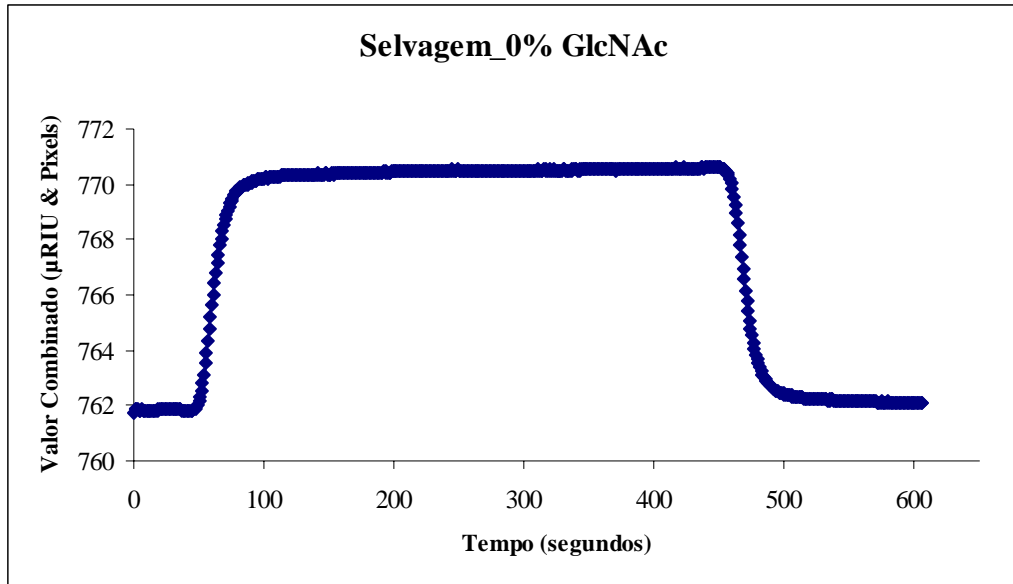
Figura 5 – Microscopia eletrônica de transmissão (TEM). (A) *L. delbrueckii* UFV H2b20 selvagem, (B) *L. delbrueckii* UFV H2b20 mutante, (C) *B. sphaericus*. MP: membrana plasmática, PC: parede celular, CS: camada S.

### 3.5. Experimentos de *Surface Plasmon Resonance* (SPR)

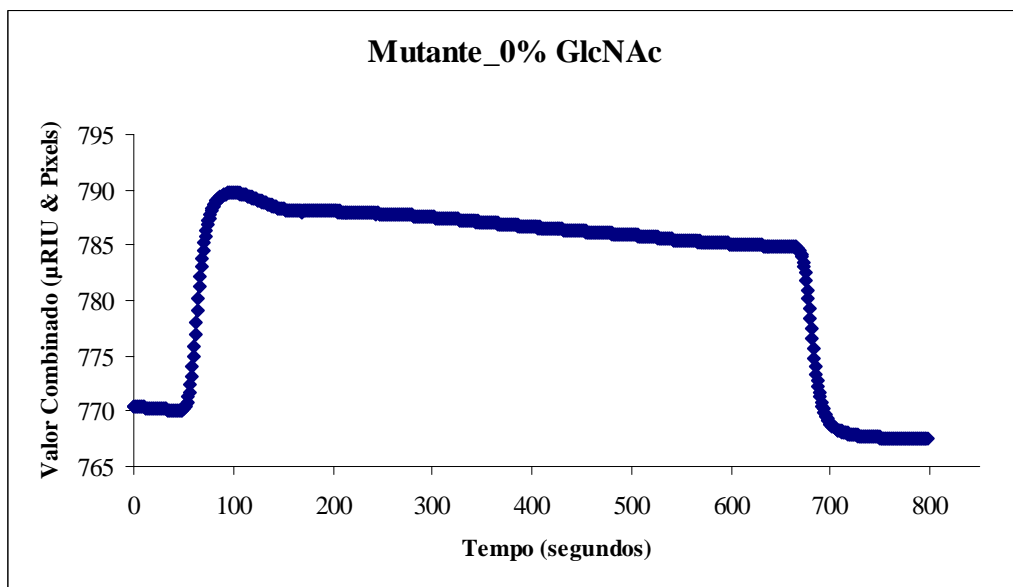
A Figura 6 apresenta sensorgramas de ligação entre as células e o carboidrato sobre a superfície do *chip* sensor. No ensaio de *Surface Plasmon Resonance* (SPR), a linhagem mutante de *L. delbrueckii* UFV H2b20 apresentou uma capacidade de adesão 27% menor que a linhagem selvagem, embora esse valor seja estatisticamente não significativo em níveis 1 e 5% de significância, pela análise de variância. A superfície sem carboidrato não apresentou nenhuma adesão de células, como pode ser verificado com o retorno da linha base para o valor inicial.

O equipamento de SPR monitora as interações baseado nas mudanças no índice de refração da solução que passa sobre a superfície de ouro do *chip* sensor. Após a adição da solução contendo as células, o valor combinado ( $\mu$ RIU e Pixels) aumenta. Quando superfície do *chip* sensor é lavada com o tampão, o valor combinado ( $\mu$ RIU e Pixels) diminui gradualmente e se torna constante. Neste estágio, é possível medir a adesão.

Embora não tenha sido detectada diferença significativa entre a adesão das duas linhagens, sabe-se que elas diferem entre si em relação à superfície como demonstrado pelo teste MATH (TEIXEIRA, 2004). Todos os testes realizados para detecção de diferenças na superfície das linhagens selvagem e mutante de *L. delbrueckii* UFV H2b20 demonstraram que existem diferenças entre elas, porém de origem não determinada. Uma posterior caracterização da superfície da linhagem mutante poderá desvendar componentes de superfície importantes para a imunoestimulação que estão presentes na linhagem selvagem.



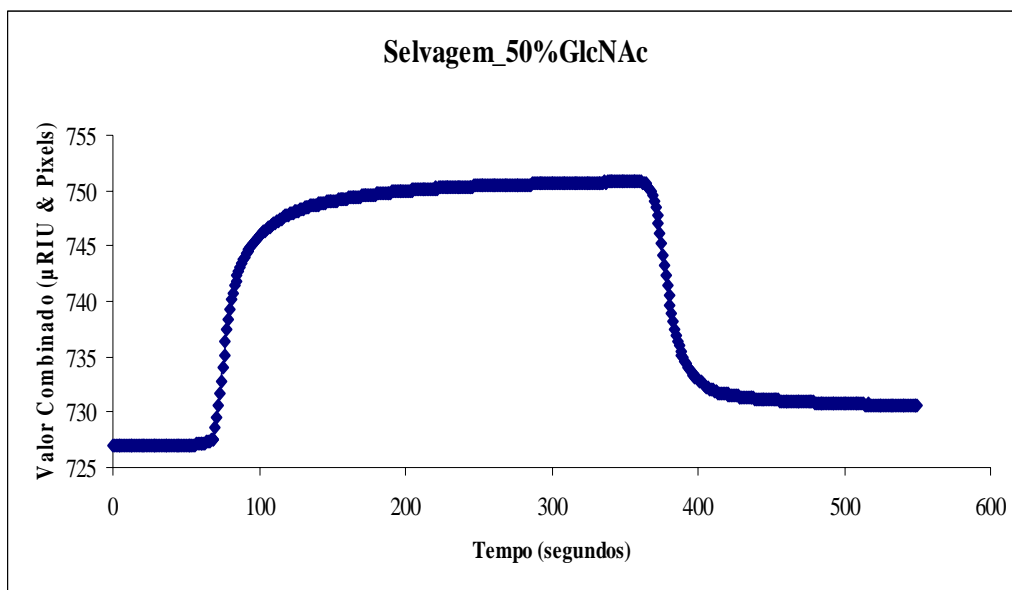
A



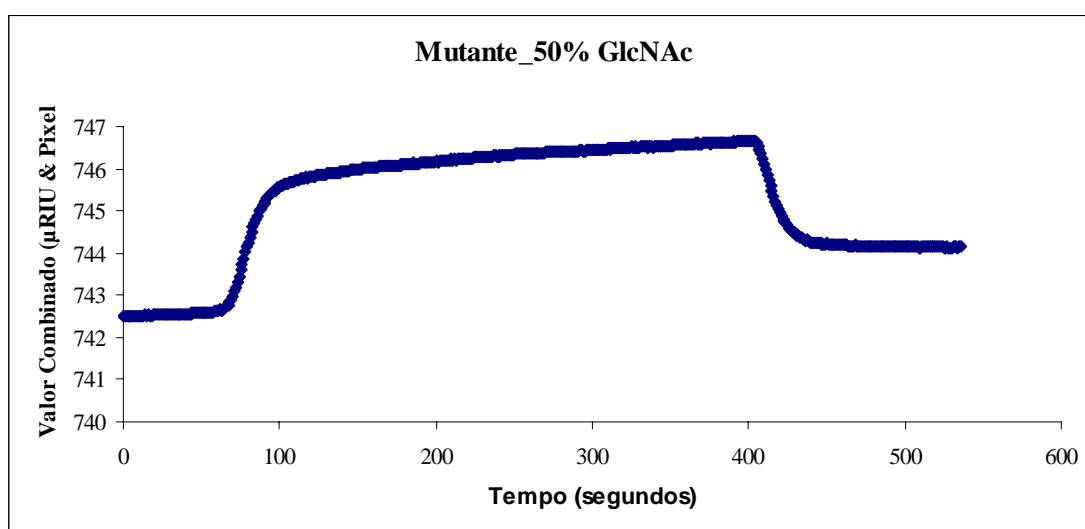
B

Figura 6 – Sensorgramas de *Surface Plasmon Resonance* (SPR) mostrando a ligação da cultura de *Lactobacillus* à superfície de ouro funcionalizada com N-acetilglicosamina. (A e B) GlcNAc; (C e D) 50% GlcNAc.

Continua...



C



D

Figura 6, Cont.

### 3.6. Perfil de proteínas de superfície das linhagens selvagem e mutante de *L. delbrueckii* UFV H2b20

A Figura 7 mostra o perfil de proteínas de superfície das linhagens selvagem e mutante de *L. delbrueckii* UFV H2b20, analisado por Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE). As bandas indicadas pelas

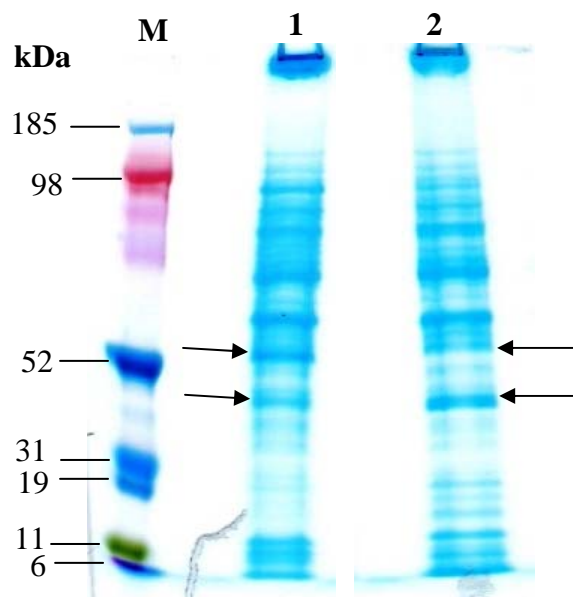


Figura 7 – Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) de extrato de proteínas de superfície extraídas com LiCl 5 M. Canaleta M, marcador de massa molecular (Invitrogen); canaleta 1, extrato de proteínas de superfície de células de *L. delbrueckii* UFV H2b20 selvagem; canaleta 2, extrato de proteínas de superfície de células *L. delbrueckii* UFV H2b20 mutante. Setas indicam mesma proteína expressa diferentemente em cada linhagem. À esquerda da figura encontram-se os valores de massa molecular (MM) do padrão de proteínas conhecidas.

setas são proteínas que estão na faixa de tamanho de proteínas de superfície de *Lactobacillus*, de 40 kDa a 60 kDa (VENTURA *et al.*, 2002). A grande abundância de proteínas dificultou a retirada de bandas de interesse para seqüenciamento. Utilizou-se a técnica de eletroforese em duas dimensões para melhor separação das proteínas. A Figura 8 representa o perfil das proteínas de superfície separadas por eletroforese em duas dimensões. A melhor faixa de pH para separação da primeira dimensão foi de 4 a 7. Essa faixa de pH é diferente daquela apresentada para proteínas de superfície,  $pI > 9$ , de *Lactobacillus* já descritas (AVALL-JAASKELAINEN e PALVA, 2005).

A análise da imagem dos géis revelou a presença de 769 proteínas no extrato de proteínas de superfície da linhagem selvagem de *L. delbrueckii* UFV H2b20 e 860 proteínas no extrato de proteínas de superfície da linhagem mutante de *L. delbrueckii* UFV H2b20. Desse total, 323 proteínas estavam presentes apenas na linhagem selvagem, 414 apenas na linhagem mutante; 168 proteínas mostraram maior expressão no selvagem e 278 proteínas apresentaram maior expressão no mutante.

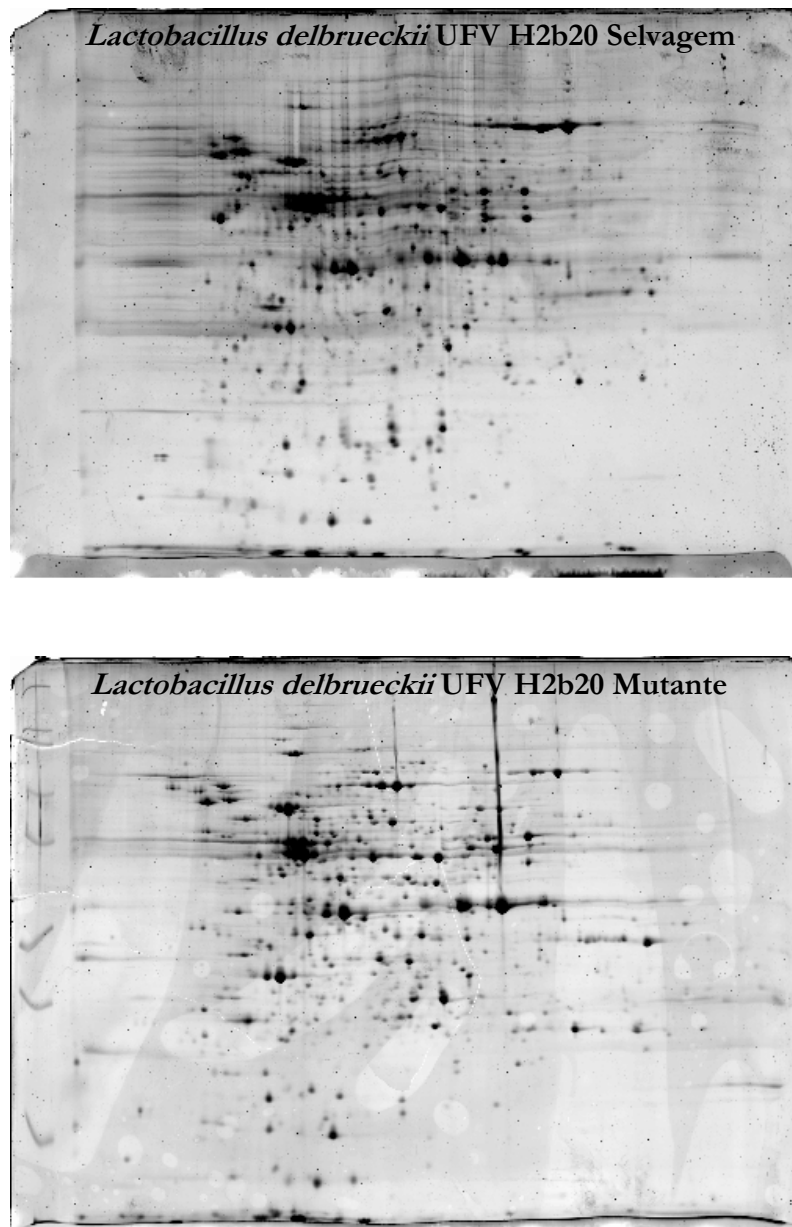


Figura 8 – Análise do perfil de extrato de proteínas de superfície de linhagens selvagem e mutante de *L. delbrueckii* UFV H2b20 por eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida 12%.

Foram escolhidas dez proteínas expressas apenas na linhagem selvagem para serem seqüenciadas por espectroscopia de massa. Todas as proteínas foram identificadas por comparação da região C-terminal com proteínas do GenBank (NCBI – [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). A Tabela 1 revela os resultados obtidos pelo seqüenciamento. Três proteínas não foram identificadas, cinco foram identificadas como gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, uma como proteína ribossomal S1 de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e uma como protease Clp dependente

Tabela 1 – Resultado da espectroscopia de massa de proteínas expressas na linhagem selvagem de *L. delbrueckii* UFV H2b20 e não expressas na linhagem mutante de *L. delbrueckii* UFV H2b20



**Analysis Information**

Report Type	Protein-Peptide Summary by Spot	Analysis Type	Combined (MS+MS/MS)
Sample Set Name	Floresta 040407	Database	NCBI nr
Analysis Name	IDs NCBI All	Creation Date	04/04/2007 12:30:36
Reported By	04/04/2007 14:30:55 - admin	Last Modified	04/04/2007 13:01:01
MS Acq. : Proc. Methods	(Unspecified) : (Unspecified)		
Interpretation Method	(Unspecified)		

Gel Idx/Pos	Plate [#] Name	Instr./Gel Origin Instrument Sample Name	Accession No.	Protein MW	Protein PI	Protein Score	Protein Score C. I. %	Total Ion Score	Total Ion C. I. %	Best Ion Score	Pep. Count
90/D4	[1] 03568	ab347000122/03568 032907	gi 104774741	76897.9	5.59	107	99.991			5	21
<b>Process Status</b> Analysis Succeeded <b>Spectra</b> 9											
Rank	Protein Name	Species	Accession No.	Protein MW	Protein PI	Protein Score	Protein Score C. I. %	Total Ion Score	Total Ion C. I. %	Best Ion Score	Pep. Count
1	ATP-dependent Clp protease, ATP-binding subunit [Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus ATCC 1		gi 104774741	76897.9	5.59	107	99.991			5	21
78/D5	[1] 03568	ab347000122/03568 032907	gi 116513917	44179	5.61	89	99.473	0	0	5	14
<b>Process Status</b> Analysis Succeeded <b>Spectra</b> 9											
Rank	Protein Name	Species	Accession No.	Protein MW	Protein PI	Protein Score	Protein Score C. I. %	Total Ion Score	Total Ion C. I. %	Best Ion Score	Pep. Count
1	Ribosomal protein S1 [Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus ATCC BAA-365]		gi 116513917	44179	5.61	89	99.473	0	0	5	14
92/D8	[1] 03568	ab347000122/03568 032907	gi 116513732	36583.6	5.51	117	100	38	0	22	10
<b>Process Status</b> Analysis Succeeded <b>Spectra</b> 9											
Rank	Protein Name	Species	Accession No.	Protein MW	Protein PI	Protein Score	Protein Score C. I. %	Total Ion Score	Total Ion C. I. %	Best Ion Score	Pep. Count
1	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus ATCC BAA-365]		gi 116513732	36583.6	5.51	117	100	38	0	22	10

de ATP, também de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Essas proteínas são intracelulares e não proteínas de superfície, como era esperado. Embora tenha sido utilizado o mesmo protocolo para extrair proteínas de superfície de *Lactobacillus* citado na literatura, as células se romperam deixando extravasar proteína intracelular. O dano causado no envelope celular parece ter atingido mais as células da linhagem selvagem, uma vez que as proteínas que foram seqüenciadas apresentavam-se em quantidade muito superior.

Esses resultados combinados levam à hipótese de que há diferenças entre as duas linhagens no que se refere às superfícies. A diferença na sensibilidade ao agente utilizado na extração das proteínas de superfície parece indicar isso.

### 3.7. Seqüenciamento do gene codificador da proteína S

Duas estratégias foram utilizadas para obter a seqüência do gene codificador da proteína S de *L. delbrueckii* UFV H2b20. Na primeira estratégia, os *primers* para a amplificação foram obtidos de seqüências conservadas das extremidades de genes putativos de proteínas S de vários *Lactobacillus*. O amplicom resultante tinha aproximadamente 1.244 pb, tamanho esperado para o gene procurado. Entretanto, a seqüência resultante não apresentou similaridade com gene codificador de qualquer proteína S depositada no banco de dados (*GenBank*) e, nos três quadros de leitura, as proteínas traduzidas também não apresentaram similaridade com proteínas S.

Na segunda estratégia, *primers* foram obtidos baseando-se na seqüência da região ancoradora da proteína S de *L. acidophilus*. O amplicom foi clonado e seqüenciado para as duas linhagens. As seqüências resultantes foram idênticas para as duas linhagens. Quando comparadas com seqüências do banco de dados, *GenBank*, utilizando-se o programa BLAST (Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>>), estas seqüências apresentaram alta percentagem de identidade com as seqüências codificadoras de proteína S de vários *Lactobacillus* como *L. acidophilus* NCFM (X71412.1), *L. helveticus* (CP000517.1) e *L. crispatus* (AJ007839.1). O genoma de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC BAA-365 (MAKAROVA *et al.*, 2006) e de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842 (van de GUCHTE *et al.*, 2006) foi completamente seqüenciado e proteínas de superfície não foram descritas em nenhuma das duas linhagens.

Esse resultado revela mais uma vez a maior proximidade de *L. delbrueckii* a *L. delbrueckii* e suas subespécies e havia sido observado em experimentos de

seqüenciamento de rDNA 16S, hibridização DNA-DNA e em análises filogenéticas (UETANABARO, 1999; NEVES, 2003; FLORESTA, 2003).

As linhagens de *L. delbrueckii* UFV H2b20 podem ter deixado de expressar a proteína S, pois quando organismos não estão em ambientes sob pressão de seleção (por exemplo, em cultura contínua sob condições ótimas de cultivo), mutantes deficientes em proteínas de superfície podem crescer mais que a linhagem selvagem, visto que há um alto gasto de energia para a célula sintetizá-la (SLEYTR e BEVERIDGE, 1999; SLEYTR, 1997).

#### 4. Referências Bibliográficas

AGOSTINHO, S. M. M. **Comportamento do *Lactobacillus acidophilus* H2b20 sob condições do trato digestivo “in vitro” e efeito de métodos de preservação de sua atividade.** 1988. 70 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1988.

AVALL-JAASKELAINEN, S.; LINDHOLM, A.; PALVA, A. Surface display of receptor-binding region of *Lactobacillus brevis* s-layer protein in *Lactococcus lactis* provides non adhesive lactococci with the ability to adhere to intestinal epithelial cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 2230-2236, 2003.

AVALL-JAASKELAINEN, S.; PALVA, A. *Lactobacillus* surface layer and their applications. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 511-529, 2005.

BERNARDEAU, M.; VERNOUX, J. P.; HENRI-DUBERNET, S.; GUÉGUEN, M. The *Lactobacillus* genus. **International Journal of Food Microbiology**, 2007 (*in press*).

BLASER, M. J.; PEI, Z. Pathogenesis of *Campylobacter fetus* infections: critical role of high-molecular-weight S-layer proteins in virulence. **Journal of Infectious Diseases**, v. 167, p. 372-377, 1993.

BOLOTIM, A. *et al.* Low redundancy sequencing of the entire *Lactococcus lactis* IL1403 genome. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 76, p. 27-76, 1999.

CASTANHEIRA, L. G. *et al.* *Bacillus delbrueckii* as a potential skin adjuvant for induction of type 1 immune responses. **Frontiers in Bioscience**, v. 12, p. 1300-1307, 2007.

CHEN, X. *et al.* S-layer proteins of *Lactobacillus crispatus* strain ZJ001 is responsible for competitive exclusion against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium*. **International Journal of Food Microbiology**, p. 307-312, 2007.

CHU, S. *et al.* Criptional analysis of the *Aeromonas salmonicida* S-layer protein gene *vapA*. **Journal of Bacteriology**, v. 175, p. 7968-7975, 1993.

CLAYTON, R. A. *et al.* Specific variation in small-subunit rRNA sequences in genbank: why single sequences may not adequately represent prokaryotic taxa. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 45, p. 595-599, 1995.

DIMITROV, Z.; MICHAYLOVA, M.; MINCOVA, S. Characterization of *Lactobacillus helveticus* strains isolated from Bulgarian yoghurt, cheese, plants and human faecal samples by sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis of cell-wall proteins, ribotyping and pulsed field gel fingerprinting. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 998-1005, 2005.

DO CARMO, A. P. **Produção de cultura DVS (Direct Vat Set) para *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 cultivado em soro de queijo minas frescal.** 2006. 66 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, 2006.

EL-OSTA, Y. G. *et al.* D-field gel electrophoretic analysis of the genome of *Lactobacillus gasseri* ATCC33323, and construction of a physical map. **Electrophoresis**, v. 23, p. 3321-3331, 2002.

ENGELHARDT, H.; PETERS, J. Structural research on surface layers: a focus on stability, surface layer homology domains, and surface layer-cell wall interactions. **Journal of Structural Biology**, v. 178, p. 5602-5609, 1998.

FERREIRA, A. B. **Estudo da resistência a antimicrobianos em *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 submetido a condições de estresse.** 2006. 53 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

FILHO-LIMA, J. V.; VIEIRA, E. C.; NICOLI, J. R. Antagonistic effect of *Lactobacillus acidophilus*, *Saccharomyces boulardii* and *Escherichia coli* combinations against experimental infections with *Shigella flexneri* and *Salmonella enteritidis* subsp. *typhimurium* in gnotobiotic mice. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 365-360, 2000.

FLORESTA, F. A. **Análise de região codificadora de rRNA de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20: filogenia e presença de seqüência de inserção putativa.** 2003. 54 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2003.

FORSTNES, J. F.; OLIVER, M. G.; SYLVESTER, F. A. Production, structure and biological relevance of gastrointestinal mucins. In: BLASER, M. J.; SMITH, P. D.; RAVDIN J. I.; GREENBERG, H. B.; GUERRANT, R. L. (Eds.). **Infections of the gastrointestinal tract.** New York: Raven Press, 1995, p.71-88.

FULER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Microbiology**, v. 66, p. 365-378, 1989.

GAVINI, F. *et al.* Phenotypic differentiation of bifidobacteria of human and animal origin. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 41, p. 548-557, 1991.

- GIRAFFA, G. *et al.* Genotypic and phenotypic diversity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* strains of dairy origin. **International Journal of Food Microbiology**, v. 91, p. 129-139, 2004.
- HAVENAAR, R.; HUIS IN'T VELD, M. J. H. Probiotics: a general view. In: WOOD, B. J. B. (Ed.). **The lactic acid bacteria in health and disease**. Vol. I, Amsterdam: Elsevier Applied Science, 1992. p. 151-170.
- HYNONEN, U. *et al.* Fibronectin-binding function in the SfpA surface protein of *Lactobacillus brevis*. **Journal of Bacteriology**, v. 184, p. 3360-3367, 2002.
- ISHIBASHI, N.; YAMAZAKI, S. Probiotics and safety. **American Journal of Food Nutrition**, v. 73, p. 465S-470S, 2001.
- JOHNSON-HENRY, K. C. *et al.* Surface-layer protein extracts from *Lactobacillus helveticus* inhibit enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 adhesion to epithelial cells. **Cellular Microbiology**, v. 9, p. 356-367, 2007.
- KALLIOMAKI, M. A.; AND ISOLAURI, E. Probiotics and down-regulation of the allergic response. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 24, p. 739-752, 2004.
- KAUR, I. P.; CHOPRA, K.; SAINI, A. Probiotics: potential pharmaceutical applications. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 15, p. 1-9, 2002.
- KLAENHAMMER, T. R. Functional activities of *Lactobacillus* probiotics: genetic mandate. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 497-505, 1998.
- KLEIN, G.; PACK, A.; BONAPARTE, C.; REUTER, G. Taxonomy and physiology of lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 41, p. 103-125, 1998.
- LEITE, M. O. **Processos para desenvolvimento de produtos lácteos probióticos com *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20**. 2005. 76 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005.
- LORTAL, S. *et al.* *Lactobacillus helveticus*: strain typing and genome size estimation by pulsed field gel electrophoresis. **Current Microbiology**, v. 34, p. 180-185, 1997.
- LOURENS-HATTINGH, A.; VILJOEN, B. C. Yogurt as probiotic carrier food. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 1-17, 2001.
- LOVE, J. C. *et al.* Self-Assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. **Chemical Reviews**, v. 105, p. 1103-1169, 2005.
- MAGALHÃES, J. T.; FLORESTA, F.; MORAES, C. A Partial characterization of ribosomal operons of *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 177-183, 2005.

MAKAROVA, K. *et al.* Comparative genomics of the lactic acid bacteria. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 103, p. 15611-15616, 2006.

MONTEIRO, R. C. B. **Resposta ao estresse em *Lactobacillus acidophilus* UFV H2b20**. 1999. 59 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1999.

MOURA, L. N. *et al.* Protection by *Lactobacillus acidophilus* UFV H2b20 against experimental oral infection with *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Typhimurium in gnotobiotic and conventional mice. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, p. 66-69, 2001.

MUYZER, G.; DE WALL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction – amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 695-700, 1993.

MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 73, p. 127-141, 1998.

NEUMANN, E. *et al.* Monoassociation with *Lactobacillus acidophilus* UFV H2b20 stimulates the immune defense mechanisms of germfree mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, p. 1565-1573, 1998.

NEVES, J. T. M. **Caracterização de região codificadora de RNA ribossomal 16S de *Lactobacillus acidophilus* UFV H2b20**. 1998. 46 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1998.

NEVES, J. T. M. **Características moleculares e identificação de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20**. 2003. 151 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2003.

NICHOLSON, J. K. Global systems biology, personalized medicine and molecular epidemiology. **Molecular Systems Biology**, v. 2, 2006. 52 p.

O’SULLIVAN, D. J.; KLAENHAMMER, T. R. Rapid mini-prep isolation of high-quality plasmid DNA from *Lactococcus* and *Lactobacillus* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 2730-2733, 1993.

OUWEHAND, A. C.; SALMINEN, S.; ISOLAURI, E. Probiotics: an overview of beneficial effects. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 82, p. 279-289, 2002.

RENAULT, P. Genetically modified lactic acid bacteria: applications to food or health and risk assessment. **Biochimie**, v. 84, p. 1073-1087, 2002.

RIBEIRO, M. A. **Aspectos da produção de peróxido de hidrogênio e inibição de bactérias por *Lactobacillus acidophilus* UFV H2b20**. 1995. 60 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1995.

ROSELÓ-MORA, R.; AMANN, R. The species concept for prokaryotes. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 25, p. 39-67, 2001.

SABET, M. *et al.* The surface S-layer is a virulence factor of *Bacteroides forsythus*. **Microbiology**, v. 149, p. 3617-3627, 2003.

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

SÁRA, M., SLEYTR, U. B. S-layer proteins. **Journal of Bacteriology**, v. 182, p. 859-868, 2000.

SATOKARI, R. M. *et al.* Bifidobacterial diversity in human feces detected by genus-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 504-513, 2001.

SCHNEITZ, C.; NUOTIO, L.; LOUNATMAA, K. Adhesion of *Lactobacillus acidophilus* to avian intestinal epithelial cells mediated by crystalline bacterial cell surface layer (S-layer). **Journal of Applied Bacteriology**, v. 74, p. 290-294, 1993.

SLEYTR, U. B. Basic and applied S-layer research: an overview. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 20, p. 5-12, 1997.

SLEYTR, U. B.; BEVERIDGE, T. J. Bacterial S-layers. **Trends in Microbiology**, v. 7, p. 253-260, 1999.

SPANO, G. *et al.* *In vivo* PCR-DGGE analysis of *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* populations in red wine. **Current Microbiology**, v. 54, p. 9-13, 2007.

TEIXEIRA, L. M. **Caracterização fisiológica e genética do *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 desprovido da capacidade de imunoestimulação.** 2004. 38 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.

TOBA, T. *et al.* A collagen binding S-layer protein in *Lactobacillus crispatus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 2467-2471, 1995.

TUOMOLA, E. *et al.* Quality assurance criteria for probiotic bacteria. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, p. 393S-398S, 2001.

UCHIDA, H. *et al.* A new assay using a surface plasmon resonance (SPR) to determine binding of the *Lactobacillus acidophilus* group to human colonic mucin. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 68, p. 1004-1010, 2004.

UETANABARO, A. P. T. **Seqüência e caracterização de região codificadora de rRNA 16S de *Lactobacillus acidophilus* UFV H2b20.** 1999. 60 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1999.

van de GUCHTE, M. *et al.* The complete genome sequence of *Lactobacillus bulgaricus* reveals extensive and ongoing reductive evolution. **PNAS**, v. 103, p. 9274-9279, 2006.

VENTURA, M. *et al.* Identification and characterization of novel surface proteins in *Lactobacillus johnsonii* and *Lactobacillus gasseri*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 6172-6181, 2002.

WEISBURG, W. G. *et al.* 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v. 173, p. 679-703, 1991.

WESTERLUND, B.; KORHONEN, T. K. Bacterial proteins binding to the mammalian extra cellular matrix. **Molecular Microbiology**, v. 9, p. 687-694, 1993.

## **Produção de linhagem recombinante de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20**

**Resumo:** Bactérias do ácido láctico têm sido utilizadas como sistemas para expressar proteínas heterólogas ou como veículos para carrear antígenos de imunização. A capacidade de o *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 ser utilizado como veículo de apresentação de uma proteína anticâncer, NY-ESO-1, foi investigada neste trabalho. Um plasmídeo recombinante, resultado da fusão do peptídeo sinal de proteína de superfície com a proteína NY-ESO-1 e com a região codificadora da âncora de proteína S, foi construído e utilizado para a eletrotransformação de *L. delbrueckii* UFV H2b20. A seqüência obtida demonstra que os fragmentos de interesse foram clonados no mesmo quadro de leitura, favorecendo a expressão da proteína NY-ESO-1 na superfície de *L. delbrueckii* UFV H2b20 e a ampliação da utilidade dessa bactéria.

**Palavras-chave:** *Lactobacillus delbrueckii*; probiótico; linhagem recombinante; vacina anticâncer.

## **Production of a recombinant strain of *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20**

**Abstract:** Lactic and bacteria have been used as systems to express heterologous proteins or as vehicles to carry immunization antigens. The ability of *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 to be used as delivery vehicle of an anticancer protein, the NY-ESO-1, was investigated in this work. A recombinant plasmid, the result of the fusion of a signal peptide of a surface protein with NY-ESO-1 protein and with the codifier region of the S protein anchor was built and used for the electrotransformation of *L. delbrueckii* UFV H2b20. The sequence obtained demonstrates that the fragments of interest were cloned in the same reading frame, favouring the expression of the NY-ESO-1 protein on the surface of *L. delbrueckii* UFV H2b20 and the increase of the use of this bacterium.

**Keywords:** *Lactobacillus delbrueckii*, probiotic, recombinant strain, anticancer vaccine.

## 1. Introdução

Alimento funcional é todo alimento ou ingrediente que, além das funções nutricionais básicas, quando consumido como parte da dieta usual, produz efeitos metabólicos e, ou, fisiológicos e, ou, efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA DO MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1999). O componente que torna um alimento funcional pode ser um macronutriente ou um micronutriente essencial, um componente não essencial, como alguns oligossacarídeos, ou um componente sem valor nutritivo, a exemplo de microrganismos vivos, como bactérias do ácido lático (ROBERFROID, 1999).

Bactérias do ácido lático têm uma tradição de uso na indústria de alimentos. O número e a diversidade de suas aplicações têm aumentado consideravelmente ao longo dos anos (TEUSINK e SMID, 2006). As bactérias do ácido lático contribuem para o sabor e a textura dos produtos fermentados e inibem o crescimento de microrganismos deterioradores pela produção de substâncias inibidoras de crescimento, as bacteriocinas, e de grandes quantidades de ácido lático e peróxido de hidrogênio (van de GUCHTE *et al.*, 2001). O uso de bactérias do ácido lático como sistemas bacterianos para expressar proteínas heterólogas ou como veículos para carrear antígenos de imunização vem se tornando uma questão promissora (POUWELS *et al.*, 1998; SEEGERS, 2002).

Bactérias que vivem no intestino humano e controlam o equilíbrio da microbiota e, finalmente, aumentam os efeitos fisiológicos e benéficos na saúde do hospedeiro são chamadas de probióticas (SAITO, 2004). A definição de probiótico foi primeiramente feita por Fuller (1989) como bactérias vivas que exercem efeito benéfico à saúde do hospedeiro mantendo adequado o balanço bacteriano no intestino. Dentre os efeitos benéficos exercidos pelos probióticos, podem-se citar o controle de infecções intestinais (PÉREZ *et al.*, 2001), a imunoestimulação e a imunomodulação (MEDICE *et al.*, 2004), a redução dos níveis de colesterol (PEREIRA *et al.*, 2003) e a atividade anticarcinogênica (ASO *et al.*, 1992). O gênero *Lactobacillus* tem fornecido espécies amplamente utilizadas como probióticas (LOURENS-HATTINGH *et al.*, 2001). *Lactobacillus* pode exercer diferentes efeitos sobre o sistema imune do hospedeiro e essa característica tem aumentado o interesse no seu uso em vacinação. A utilização de *Lactobacillus* foi relatada em protótipos de vacina contra antraz (ZEGERS *et al.*, 1998),

rotavirose (ISOLAURI *et al.*, 1995) e tétano (SHAW *et al.*, 2000, GRANGETTE *et al.*, 2001). Atualmente, a atenção tem sido focalizada no desenvolvimento de lactobacilos como veículos vivos de apresentação de antígenos (SEEGERS, 2002).

*Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 é a denominação de um dos isolados de fezes de crianças recém-nascidas alimentadas exclusivamente com leite materno (SANTOS, 1984). Esse microrganismo foi obtido e conservado no laboratório de Microbiologia Industrial e Biotecnologia, na Universidade Federal de Viçosa. *L. delbrueckii* UFV H2b20 foi submetido, *in vitro*, a condições semelhantes às do trato gastrintestinal e se mostrou resistente a sais biliares, ácido clorídrico, presença de lisozima e também apresentou resistência a diversos antimicrobianos (AGOSTINHO, 1988; FERREIRA, 2006). Há uma vasta experiência acumulada com o cultivo e a biotecnologia dessa bactéria, inclusive para sua conservação e tecnologia para produção, ampliando seu potencial biotecnológico imediato. O desenvolvimento de rotas tecnológicas que utilizam *L. delbrueckii* UFV H2b20 como probiótico foi testados para leite pasteurizado, leite em pó, leite fermentado e sorvete (LEITE, 2005).

Por apresentar as características desejáveis para instalar-se no intestino como probiótico, esse microrganismo tornou-se objeto de estudos para assegurar seu emprego em humanos. É uma bactéria com status GRAS, isto é, geralmente reconhecida como segura, portanto, aceita sem restrições na alimentação humana.

Vários estudos demonstraram os efeitos potencialmente probióticos dessa linhagem em particular. Em estudo com camundongos suíços livres de germes, o *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 mostrou capacidade de colonizar o trato gastrintestinal e estimular resposta imune não específica (NEUMANN *et al.*, 1998). Foi comprovado o efeito antagônico dessa linhagem contra infecções experimentais com *Shigella flexneri* e *Salmonella enteritidis* subsp. *Typhimurium* (FILHO-LIMA *et al.*, 2000).

*L. delbrueckii* UFV H2b20 foi transformado geneticamente com o plasmídeo pLBS-GFP-EmR. As bactérias transformadas expressaram em sua superfície proteínas fluorescentes usadas como repórteres. É possível que modelo similar expressando antígenos contra patógenos possa ser usado como vacinas orais vivas para imunizar contra doenças infecciosas (MOTA *et al.*, 2005).

O câncer é a segunda maior causa de morte no Brasil e também nos Estados Unidos (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2006; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2007). Atualmente, pesquisas têm sido feitas com o objetivo de desenvolver

terapias alternativas para o tratamento do câncer, como a imunoterapia. A pesquisa por moléculas-alvo nas células tumorais que induzem a uma forte resposta imune em pacientes com câncer tem crescido nas últimas décadas. O antígeno alvo ideal deve ser altamente imunogênico, isto é, deve ser expresso em alto nível em células do tecido canceroso, mas não deve ser expresso ou deve ser expresso em um baixo nível em células de tecidos normais (JAGER *et al.*, 2005).

NY-ESO-1 é um antígeno câncer-teste (CT) que tem feito uma das mais rápidas transições desde sua descrição molecular, celular e imunológica até candidato a vacina e imunoterapia. A etimologia de NY-ESO-1 relata a história de sua origem: NY está relacionado à cidade na qual ele foi descoberto por Chen *et al.* (1997), no *Ludwig Institute for Cancer Research* e no *Weill Medical College of Cornell University* em Nova Iorque, no ano de 1997; ESO é para câncer esofágico, onde ele foi originalmente encontrado. O dígito 1 refere-se ao primeiro membro de uma nova família de genes (GNJATIC *et al.*, 2006). O gene que codifica NY-ESO-1 exibe características comuns dessa família: genes com expressão limitada em células germinativas e nenhuma expressão em células somáticas, mas com freqüente expressão em células cancerosas, por isso, os produtos são nomeados CT (SCANLAN *et al.*, 2004). Embora originalmente NY-ESO-1 tenha sido encontrada em células de tumor esofágico, ela tem se mostrado amplamente distribuída em um grande número de outros tipos de tumores, bexiga (SHARMA *et al.*, 2003), mama (MASHINO *et al.*, 2001), ovário (BOLLI *et al.*, 2005), pâncreas (ODUNSI *et al.*, 2003) e próstata (NAKADA *et al.*, 2003).

Tendo em vista a importância de NY-ESO-1 no tratamento imunoterapêutico do câncer, bem como a possibilidade da utilização de bactérias do ácido láctico como veículos de apresentação, propôs-se a funcionalização da superfície celular de *L. delbrueckii* UFV H2b20, pela construção de uma linhagem recombinante que expressasse em sua superfície a proteína anticâncer NY-ESO-1.

## 2. Material e Métodos

Este trabalho foi realizado no Departamento de *Food Science* na Universidade de Cornell.

## 2.1. Microrganismos

Células de *L. delbrueckii* UFV H2b20, microrganismo probiótico, foram conservadas em meio *Man-Rogosa-Sharp* (MRS) e 20% de glicerol, a -80 °C.

Linhagens de *Escherichia coli* TOP10 (*Invitrogen*), transformadas com o gene codificador da proteína NY-ESO-1 e com a região codificadora da âncora do gene da proteína S, foram utilizadas como fonte desses genes. Elas foram conservadas em meio Luria-Bertani (LB) e 20% de glicerol, a -80 °C.

## 2.2. Estratégia para obter a fusão dos genes de interesse

A Figura 1 representa esquematicamente a estratégia para a obtenção da fusão do gene codificador da região ancoradora da proteína S de *L. delbrueckii* UFV H2b20 à proteína NY-ESO-1 anticâncer.

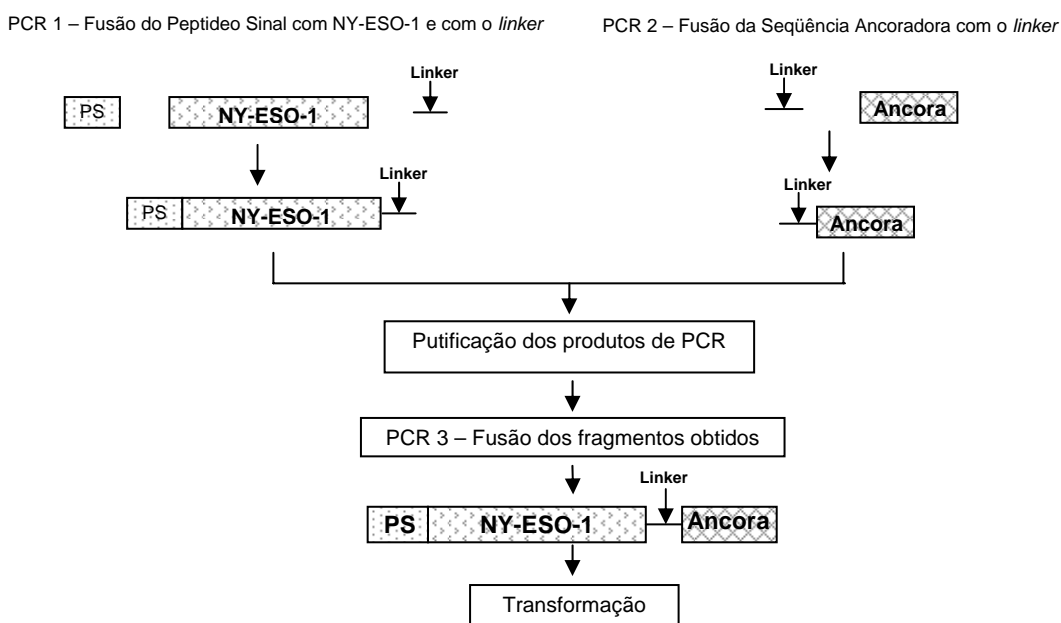


Figura 1 – Estratégia para fusão do peptídeo sinal (PS) do gene codificador da proteína S de *L. delbrueckii* UFV H2b20 com a o gene codificador da proteína anticâncer NY-ESO-1 e da região codificadora da âncora da proteína S de *L. delbrueckii* UFV H2b20.

Essa estratégia foi baseada na mesma utilizada por Mota *et al.* (2006), quando fundiram uma região do gene codificador da proteína S com o gene repórter GFP.



ressuspendidas em volume necessário do tampão EB para se obter uma D.O.<sub>600</sub> = 50. A suspensão foi incubada a 45 °C por 20 minutos e colocada em gelo por 10 minutos. Para a eletroporação, foram misturadas 80 µL de células competentes com 2-3 µg de DNA plasmidial. A suspensão foi submetida a um pulso elétrico de 1 kV, 800 Ω e 25 µF em uma cubeta de 0,2 centímetros em um *Gene Pulse and Pulse Controller Apparatus* (BioRad). Após esse tratamento, 2 mL de meio leite (0,2 M sacarose, 5% leite desnatado, 0,1% extrato de levedura, 1% casoaminoácidos) foram adicionados e a suspensão incubada por 3 horas a 37 °C. Transcorrido esse período, as células foram plaqueadas em ágar MRS e incubadas a 37 °C por 2 a 3 dias em condições de microaerofilia. Os clones foram, então, triados utilizando-se a técnica de *Western Blot – WesternBreeze Chromogenic Western Blot Immunodetection Kit* (Invitrogen). O anticorpo utilizado foi contra a proteína anticâncer NY-ESO-1.

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1. Fusão dos genes de interesse

A Figura 2 apresenta o alinhamento da seqüência deduzida e da seqüência obtida pelo seqüenciamento do fragmento clonado no clone 1. O alinhamento foi feito pelo programa ClustalW2 (Disponível em: <<http://www.ebi.ac.uk/Tools>>).

A maioria das aplicações das proteínas S é baseada na fusão entre a molécula funcional desejada com a proteína S ou com parte dela. Essa estratégia é utilizada porque as propriedades intrínsecas específicas das proteínas S não são afetadas pela fusão da molécula desejada, enquanto as seqüências funcionais são representadas na superfície do arranjo das proteínas S (TRUPPE *et al.*, 1997).

A fusão dos genes de interesse alcançou resultado satisfatório. As seqüências foram clonadas no mesmo quadro de leitura, o que não alterará a expressão da proteína anticâncer NY-ESO-1. Os clones intermediários, bem como o clone com o gene recombinante estão mantidos no Laboratório do Dr. Carl A. Batt e poderão ser utilizados para estudos posteriores.

A região C-terminal da proteína S foi escolhida para a fusão com a proteína NY-ESO-1 porque ela é o domínio de ligação da proteína S à parede celular (SMIT *et al.*, 2001). Assim, fica assegurado que, se houver expressão dessa proteína em *L. delbrueckii* UFV H2b20, ela estará expressa na superfície dessa linhagem.

```

Deduzida ATGTTTATATTTCAAGGAGGAAAAGACCAGGCCGAAGGCCGGGGCACAGGGGGTTCGACG 60
Clone1  ATGTTTATATTTCAAGGAGGAAAAGACCAGGCCGAAGGCCGGGGCACAGGGGGTTCGACG 60
*****

Deduzida GGCGATGCTGATGGCCCAGGAGGCCCTGGCATTCTGATGGCCCAGGGGGCAATGCTGGC 120
Clone1  GGCGATGCTGATGGCCCAGGAGGCCCTGGCATTCTGATGGCCCAGGGGGCAATGCTGGC 120
*****

Deduzida GGCCAGGAGAGGCGGGTGCCACGGGCGGCAGAGGTCCCCGGGGCGCAGGGGCAGCAAGG 180
Clone1  GGCCAGGAGAGGCGGGTGCCACGGGCGGCAGAGGTCCCCGGGGCGCAGGGGCAGCAAGG 180
*****

Deduzida GCCTCGGGCCGGGAGGAGGCGCCCCGGGGTCCGCATGGCGCGCGGCTTCAGGGCTG 240
Clone1  GCCTCGGGCCGGGAGGAGGCGCCCCGGGGTCCGCATGGCGCGCGGCTTCAGGGCTG 240
*****

Deduzida AATGGATGCTGCAGATGCGGGGCCAGGGGGCCGAGAGCCGCTGCTTGAATTCTACCTC 300
Clone1  AATGGATGCTGCAGATGCGGGGCCAGGGGGCCGAGAGCCGCTGCTTGAATTCTACCTC 300
*****

Deduzida GCCATGCCTTTCGCGACACCCATGGAAGCAGAGCTGGCCCGCAGGAGCCTGGCCAGGAT 360
Clone1  GCCATGCCTTTCGCGACACCCATGGAAGCAGAGCTGGCCCGCAGGAGCCTGGCCAGGAT 360
*****

Deduzida GCCCCACCGCTTCCCGTGCCAGGGGTGCTTCTGAAGGAGTTCAGTGTCCGGCAACATA 420
Clone1  GCCCCACCGCTTCCCGTGCCAGGGGTGCTTCTGAAGGAGTTCAGTGTCCGGCAACATA 420
*****

Deduzida CTGACTATCCGACTGACTGCTGCAGACCACCGCAACTGCAGCTCTCCATCAGCTCCTGT 480
Clone1  CTGACTATCCGACTGACTGCTGCAGACCACCGCAACTGCAGCTCTCCATCAGCTCCTGT 480
*****

Deduzida CTCCAGCAGCTTTCCTGTTGATGTGGATCACGCAGTGCTTCTGCCCGTGTTTTGGCT 540
Clone1  CTCCAGCAGCTTTCCTGTTGATGTGGATCACGCAGTGCTTCTGCCCGTGTTTTGGCT 540
*****

Deduzida CAGCCTCCCTCAGGGCAGAGGCGCGGTGGTGGTGGTGCACAACGCATACTACTACGAC 600
Clone1  CAGCCTCCCTCAGGGCAGAGGCGCGGTGGTGGTGGTGCACAACGCATACTACTACGAC 600
*****

Deduzida AAGGACGCTAAGCGTGTGGTACTGACAGCGTTAAGCGTTACAACCTCAGTAAGCGTATTG 660
Clone1  AAGGACGCTAAGCGTGTGGTACTGACAGCGTTAAGCGTTACAACCTCAGTAAGCGTATTG 660
*****

Deduzida CCAAACACTACTACTATCAACGGTAAGACTTACTACCAAGTAGTTGAAAACGGTAAGGCT 720
Clone1  CCAAACACTACTACTATCAACGGTAAGACTTACTACCAAGTAGTTGAAAACGGTAAGGCT 720
*****

Deduzida GTTGACAAGTACATCAACGCTGCAAACATCGATGGTACTAA-GCGTACTTTGAAGCACAA 779
Clone1  GTTGACAAGTACATCAACGCTGCAAACATCGATGGTACTAAAGCGTACTTTGAAGCACAA 780
*****

Deduzida CGCTTACGTTTACGCATCATCAAAGAAGCGTGCTAACAAGGTTGTATTGAAGAAGGGTGA 839
Clone1  CGCTTACGTTTACGCATCATCAA-GAAACGTGCTAACAAGGTTGTATTGAAGAAGGGTGA 839
*****

Deduzida AGTTGTAACACTACTTACGGTGCTTCATACACATTCAAGAACTAA 882
Clone1  AGTTGTAACACTACTTACGGTGCTTCATACACATTCAAAAATAA 882
*****

```

Figura 2 – Alinhamento da sequência deduzida e da sequência resultante da fusão, obtida pelo sequenciamento do clone 1.

### 3.2. Eletrotransformação de *L. delbrueckii* UFV H2b20 com o plasmídeo recombinante

A eletrotransformação de *L. delbrueckii* UFV H2b20 resultou em um grande número de clones. A falta de pressão de seleção dos clones provavelmente gerou tal resultado, que era esperado, uma vez que a triagem foi feita utilizando *Western Blot* das colônias. Quando os clones foram submetidos a tal procedimento, observou-se um elevado número de clones positivos para a proteína NY-ESO-1, porém, quando esses clones tiveram proteína total extraída, a banda correspondente à da proteína de interesse esteve ausente.

A eletrotransformação parece ser uma técnica eficiente para transferir DNA plasmidial para bactérias do ácido láctico (BERTHIER *et al.*, 1996). O desenvolvimento de procedimentos de eletroporação para várias espécies de *Lactobacillus*, como *Lactobacillus helveticus* (BHOWMIK e STEELE, 1993; HASHIBA *et al.*, 1990), *Lactobacillus casei* (Chassy e Flickinger, 1987), *Lactobacillus acidophilus* (LUCHANSKY *et al.*, 1988) e *Lactobacillus sakei* (BERTHIER *et al.*, 1996) demonstraram que vários parâmetros devem ser testados com o objetivo de otimizar a eficiência de eletroporação para esse grupo de microrganismos. Entre esses parâmetros podem-se citar a fase de crescimento em que as células são coletadas, o que é dependente da espécie ou ainda da linhagem utilizada (BERTHIER *et al.*, 1996; BHOWMIK e STEELE, 1993); a composição dos tampões de lavagem de células e de eletroporação que desempenham papel importante na transformação de vários *Lactobacillus* (AUKRUST *et al.*, 1995; BERTHIER *et al.*, 1996; LUCHANSKY *et al.*, 1988); os parâmetros do pulso elétrico (AUKRUST *et al.*, 1995) e a fonte do DNA usado para a transformação, uma vez que sistemas de restrição-modificação podem inibir severamente a transformação (HASHIBA *et al.*, 1990).

A falta de conhecimento sobre *L. delbrueckii* spp. está diretamente relacionada ao fato de essas bactérias serem altamente recalcitrantes à manipulação genética. Existe, entretanto, considerável interesse tanto científico quanto econômico no desenvolvimento de vetores de clonagem para *L. delbrueckii*, visto que essa linhagem é amplamente utilizada na indústria láctica (BOURNIQUEL *et al.*, 2002 ).

Outros protocolos que possibilitem a eletroporação de *L. delbrueckii* UFV H2b20 são necessários, bem como o desenvolvimento de vetores de clonagem adequados para que essa linhagem possa ser utilizada na indústria de alimentos

#### 4. Conclusões e Perspectivas

Essa etapa do trabalho foi concluída com clones em *E. coli* TOP10 que contêm plasmídeos recombinantes para a proteína anticâncer NY-ESO-1 e região ancoradora de proteína de superfície. Esses clones poderão ser utilizados para realização de experimentos de transformação em *L. delbrueckii* UFV H2b20.

Parâmetros de transformação para *L. delbrueckii* UFV H2b20 deverão ser testados, bem como um vetor de clonagem GRAS deverá ser construído para que a linhagem recombinante possa ser utilizada na alimentação.

#### 5. Referências Bibliográficas

AGOSTINHO, S. M. M. **Comportamento do *Lactobacillus acidophilus* UFV H2b20 sob condições do trato digestivo *in vitro* e efeito de métodos de preservação em sua atividade.** 1998. 70 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1998.

ASO, Y.; AKASAN, H. Prophylactic effect of a *Lactobacillus casei* preparation on the recurrence of superficial bladder cancer. BLP study group. **Urol International**, v. 49, p. 125-129, 1992.

AUKRUST, T. W.; BRURBERG, M. B.; NES, I. F. Transformation of *Lactobacillus* by electroporation. **Methods in Molecular Biology**, v. 47, p. 201-208, 1995.

BERTHIER, F. *et al.* Efficient transformation of *Lactobacillus sake* by electroporation. **Microbiology**, v. 142, p. 1273-1279, 1996.

BHOWMIK, T.; STEELE, J. L. Development of an electroporation procedure for gene disruption in *Lactobacillus helveticus* CNRZ 32. **Journal of General Microbiology**, v. 139, p. 1433-1439, 1993.

BOLLI, M. *et al.* NY-ESO-1/LAGE-1 coexpression with MAGE-A cancer/testis antigens: A tissue microarray study. **International Journal of Cancer**, v. 115, p. 960-966, 2005.

BOURNIQUEL, A. A. *et al.* DNA sequence and functional analysis of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* plasmids pN42 and pJBL2. **Plasmid**, v. 47, p. 153-157, 2002.

CHASSY, B. M.; FLICKINGER, J. L. Transformation of *Lactobacillus casei* by electroporation. **FEMS Microbiology Letters**, v. 44, p. 173-177, 1987.

CHEN, Y. -T. *et al.* A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, p. 1914-1918, 1997.

- FERREIRA, A. B. **Estudo da resistência a antimicrobianos em *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 submetido a condições de estresse.** 2006. 53 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, 2006.
- FILHO-LIMA, J. V.; VIEIRA, E. C.; NICOLI, J. R. Antagonistic effect of *Lactobacillus acidophilus*, *Saccharomyces boulardii* and *Escherichia coli* combinations against experimental infections with *Shigella flexneri* and *Salmonella enteritidis* subsp. *typhimurium* in gnotobiotic mice. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 365-370, 2000.
- FULER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Microbiology**, v. 66, p. 365-378, 1989.
- GNJATIC, S. *et al.* NY-ESO-1: Review of an immunogenic tumor antigen. **Advances in Cancer Research**, v. 95, p. 1-30, 2006.
- GRANGETTE, C. *et al.* Mucosal immune responses and protection against tetanus toxin after intranasal immunization with recombinant *Lactobacillus plantarum*. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 1547-1553, 2001.
- HASHIBA, H. *et al.* Transformation of *Lactobacillus helveticus* subsp. *jegurti* with plasmid pLHR by electroporation. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 54, p. 1537-1541, 1990.
- ISOLAURI, E. *et al.* Improved immunogenicity of oral D x RRV reassortant rotavirus vaccine by *Lactobacillus casei* GG. **Vaccine**, v. 13, p. 310-312, 1995.
- JAGER, D.; KNUTH, A. Antibodies and vaccines – hope or illusion? **The breast**, v. 14, p. 631-635, 2005.
- LEITE, M. O. **Processos para desenvolvimento de produtos lácteos probióticos com *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20.** 2005. 76 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, 2005.
- LOURENS-HATTINGH, A.; VILJOEN, B. C. Yogurt as probiotic carrier food. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 1-17, 2001.
- LUCHANSKY, J. B.; MURIANA, P. M.; KLAENHAMMER, T. R. Application of electroporation for transfer of plasmid DNA to *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Listeria*, *Pediococcus*, *Bacillus*, *Enterococcus* and *Propionibacterium*. **Molecular Microbiology**, v. 2, p. 637-646, 1988.
- MASHINO, K. *et al.* Expression of multiple cancer testis antigen genes in gastrointestinal and breast carcinomas. **British Journal of Cancer**, v. 85, p. 713-720, 2001.
- MEDICE, M.; VINDEROLA, C. G.; PERDIGÓN, G. Gut mucosal immunomodulation by probiotic fresh cheese. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 611-618, 2004.

- MOTA, R. M. *et al.* Genetic transformation of novel isolates of chicken *Lactobacillus* bearing probiotic features for expression of heterologous proteins: a tool to develop live oral vaccines. **BMC Biotechnology**, v. 6, p. 2-12, 2006.
- NAKADA, T. *et al.* NY-ESo-1 mRNA expression and immunogenicity in advanced prostate cancer. **Cancer Immunity**, v. 3. 2003. 10 p.
- NEUMANN, E. *et al.* Monoassociation with *Lactobacillus acidophilus* UFV H2b20 stimulates the immune defense mechanisms of germ free mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, p. 1565-1573, 1998.
- ODUNSI, K. *et al.* NY-ESO-1 and LAGE-1 cancer-testis antigens are potential targets for immunotherapy in epithelial ovarian cancer. **Cancer Research**, v. 63, p. 6076-6080, 2003.
- PEREIRA, D. I. A.; MCCARTTNEY, A. L.; GIBSON, G. R. An in vitro study of the probiotic potential of bile-salt-hydrolysing *Lactobacillus fermentum* strain, and determination of its cholesterol-lowering. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 4743-4752, 2003.
- PÉREZ, P. F. *et al.* Inhibition of *Giardia intestinalis* by extracellular factors from *Lactobacillus*: an in vitro study. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 5037-5042, 2001.
- PORTARIA nº 398, de 30/04/99, da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde no Brasil (Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>).
- POUWELS, P. H. *et al.* Lactic acid bacteria as antigen delivery vehicles for oral immunization purposes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 41, p. 155-167, 1998.
- ROBERFROID, M. D. Concepts in functional foods: The case of inulin and oligofructose. **The Journal of Nutrition**, v. 129, p. 1398-1401, 1999.
- SAITO, T. Selection of useful probiotic lactic acid bacteria from the *Lactobacillus acidophilus* group and their applications to functional foods. **Animal Science Journal**, v. 75, p. 1-13, 2004.
- SANTOS, N. S. **Isolamento e caracterização de *Lactobacillus acidophilus* fezes de crianças alimentadas ao seio materno e de bezerros, visando à sua utilização como adjunto dietético.** 1984. 69 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1984.
- SCANLAN, M. J.; SIMPSON, A. J.; OLD, L. J. The cancer/testis genes: review, standardization and commentary. **Cancer Immunity**, v. 4. 2004. 1 p.
- SEEGERS, J. F. Lactobacilli as live vaccine delivery vectors: progress and prospects. **Trends in Biotechnology**, v. 20, p. 508-515, 2002.

SHARMA, P. *et al.* Frequency of NY-ESO-1 and LAGE-1 expression in bladder cancer and evidence of a new NY-ESO-1 T-cell epitope in a patient with bladder cancer. **Cancer Immunity**, v. 3, 2003. 19 p.

SHAW, D. M. *et al.* Engineering the microflora to vaccinate the mucosa: Serum immunoglobulin G responses and activated responses and activated draining cervical lymph nodes following mucosal application of tetanus toxin fragment C expressing lactobacilli. **Immunology**, v.100, p. 510-518, 2000.

SMIT, E. *et al.* The S-layer protein of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356: Identification and characterization of domains responsible for s-protein assembly and cell wall binding. **Journal of Molecular Biology**, v. 305, p. 245-257, 2001.

TEUSINK, B.; SMID, E. J. Modelling strategies for the industrial exploitation of lactic acid bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, p. 46-56, 2006.

TRUPPE, M. *et al.* Biotechnological applications of recombinant S-layer proteins rSbsA and rSbsB from *Bacillus stearothermophilus* PV72. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 20, p. 88-91, 1997.

van de GUCHTE, M.; EHRLICH, S. D.; MAGUIN, E. Production of growth-inhibiting factors by *Lactobacillus delbrueckii*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 147-153, 2001.

ZEGERS, N. D. *et al.* Expression of the protective antigen of *Bacillus anthracis* by *Lactobacillus casei*: Towards the development of an oral vaccine against anthrax. **Journal of Applied Microbiology**, v. 87, p. 307-314, 1999.