

MARTA CRISTINA TEIXEIRA LEITE

**IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE DA
EXPRESSÃO DE GENES DE RESPOSTA AO ESTRESSE
OXIDATIVO EM *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20**

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

VIÇOSA

MINAS GERAIS – BRASIL

2008

MARTA CRISTINA TEIXEIRA LEITE

**IDENTIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ANÁLISE DA
EXPRESSÃO DE GENES DE RESPOSTA AO ESTRESSE
OXIDATIVO EM *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20**

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: 31 de outubro de 2008.

Prof. Arnaldo Chaer Borges

Prof. Hilário Cuquetto Mantovani

Prof. Antônio Fernandes de Carvalho

Prof^a Tânia Maria Fernandes Salomão

Prof^a Célia Alencar de Moraes

(Orientadora)

A Deus,

Aos meus pais, Luiz Mário e Neuza Maria,

Ao meu amado esposo Robson,

Aos meus irmãos e cunhadas, Luiz Mário e Cristina, Luiz Fernando e

Mônica, Luiz Gustavo e Jaqueline e ao meu querido sobrinho Lucas.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pela presença constante em minha vida, por ser meu sustento e minha fortaleza e me guiar sempre por um caminho seguro.

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

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

À professora Célia Alencar de Moraes, pela orientação e confiança em meu trabalho.

Ao professor Hosni M. Hassan pela oportunidade, pelo carinho com que me recebeu em seu laboratório e pela relevante participação em meu trabalho.

Aos professores Arnaldo Chaer Borges, Hilário Cuquetto Mantovani, Antônio Fernandes de Carvalho e Tânia Maria Fernandes Salomão pelas valiosas contribuições e conselhos.

À professora Marisa Vieira de Queiroz, pela contribuição para realização deste trabalho.

A todos os professores do Departamento de Microbiologia, pelos ensinamentos.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia Industrial, pela amizade e pelo apoio.

Aos amigos dos Laboratórios de Fisiologia de Microrganismos, Microbiologia de Alimentos, Anaeróbios, Micorrizas, Genética de Microrganismos, Biotecnologia Ambiental e Biodiversidade pela convivência agradável.

Aos amigos Thiago, José Carlos, Alessandra e Ana Paula, pelo apoio nessa etapa importante da minha vida.

Aos amigos Brian, Trent, Matt e Qiaen pelo agradável convívio no laboratório e por todo o conhecimento compartilhado.

À minha querida família Milligan, Corey, Cathy e Clara, pela inesquecível convivência e amizade e por tantos momentos de alegria.

Ao meu esposo Robson, pelo carinho e compreensão, pelo constante incentivo e companheirismo.

Aos funcionários Sr. Toninho, Danilo, Evandro, Laura, Aparecida e Nilcéa, pela amizade, pelo respeito, pela dedicação e eficiência.

Aos meus queridos irmãos e pais, pelo amor e pela torcida para que eu atingisse esse objetivo importante.

BIOGRAFIA

MARTA CRISTINA TEIXEIRA LEITE, filha de Luiz Mário Leite e Neuza Maria Teixeira Leite, nasceu em Aimorés, Estado de Minas Gerais, no dia 24 de fevereiro de 1981.

Em março de 1999, ingressou na Universidade Federal de Viçosa-UFV, onde, em agosto de 2003, graduou-se em Nutrição.

No período de agosto de 2000 a julho de 2001, foi bolsista do PIBIC/CNPq.

Em agosto de 2003, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, em nível de Mestrado, na Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, sendo que em janeiro de 2005, obteve a mudança para nível de Doutorado sem defesa de tese.

No período de março de 2007 a março de 2008 foi bolsista CAPES pelo Programa de Doutorado no País com Estágio no Exterior (PDÉE), tendo sido o estágio desenvolvido no laboratório sob coordenação do Dr. Hosni M. Hassan vinculado ao *Microbiology Department, North Carolina State University at Raleigh, NC, USA*. Em 31 de outubro de 2008 foi realizada a defesa da tese de Doutorado.

CONTEÚDO

	Página
RESUMO	ix
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Ecologia do Trato Gastrointestinal.....	4
2.2. Bactérias do ácido láctico	8
2.3. Bactérias do ácido láctico probióticas.....	10
2.4. Estresse oxidativo e efeito do oxigênio no metabolismo de bactérias láticas	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1. Microrganismo	26
3.2 Extração de DNA Total.....	26
3.2.1. Preparo das células.....	26
3.2.2. Extração de DNA	27
3.2.3. Quantificação de DNA.....	27
3.3 Seleção dos genes a serem identificados e caracterizados em <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20.....	28

	Página
3.4 Detecção dos genes <i>spx</i> , <i>ptsI</i> e <i>mecA</i> de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20	29
3.4.1. Construção dos primers.....	29
3.4.2. Reações de Amplificação	32
3.5 Detecção do gene <i>pox</i> de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20.....	32
3.5.1. Construção dos primers.....	32
3.5.2. Reações de Amplificação	34
3.6 Detecção do gene <i>pox</i> de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20.....	35
3.6.1. Construção dos primers.....	35
3.6.2. Reações de Amplificação	36
3.7 Detecção de gene homólogo a <i>sigA</i> em <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20	37
3.7.1. Construção dos primers.....	37
3.7.2. Reação de Amplificação	37
3.8 Sequenciamento e análise das sequências	38
3.9 PCR inversa	38
3.10 Análise filogenética.....	39
3.11 Análise da expressão dos genes <i>spx</i> , <i>dps</i> e <i>pox</i> por PCR em tempo real .	40
3.11.1 Condições de cultivo: transferência da condição de anaerobiose para aerobiose	40
3.11.2 Condições de cultivo: transferência da condição de aerobiose para anaerobiose.....	41
3.11.3 Condições de cultivo: efeito da concentração de glicose sobre a expressão do gene <i>pox</i> de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20.....	42
3.11.4 Condições de cultivo: efeito da concentração de peróxido de hidrogênio sobre a expressão do gene <i>dps</i> de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20	42
3.11.5 Extração de RNA	46
3.11.6 PCR em tempo real	46
3.12 Avaliação da atividade da enzima piruvato oxidase de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20.....	48

	Página
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1. Caracterização das Sequências e Análise Filogenética dos genes <i>spx</i> , <i>dps</i> e <i>pox</i>	50
4.1.1. Sequência nucleotídica e organização gênica parcial do operon que codifica o gene <i>spx</i> de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20	50
4.1.2. Caracterização dos domínios conservados da proteína Spx de <i>L.</i> <i>delbrueckii</i> UFV H2b20.....	56
4.1.3. Relacionamento Filogenético de Spx de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20 com homólogos de outras bactérias gram-positivas.....	60
4.1.4. Sequência do gene <i>dps</i> de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20	63
4.1.5. Caracterização da proteína Dps de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20.....	67
4.1.6. Relacionamento Filogenético de Dps de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20 com homólogos de outras bactérias gram-positivas.....	70
4.1.7. Caracterização parcial do gene <i>pox</i> que codifica a enzima piruvato oxidase de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20.....	73
4.1.8. Caracterização parcial da enzima piruvato oxidase de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20.....	76
4.1.9. Relacionamento Filogenético da enzima piruvato oxidase de <i>L.</i> <i>delbrueckii</i> UFV H2b20 com homólogos de outras bactérias gram-positivas....	80
4.1.10. Sequência de gene homólogo a <i>sigA</i> de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20.....	83
4.2. Análise da expressão dos genes <i>spx</i> , <i>dps</i> e <i>pox</i> e da atividade da enzima piruvato oxidase de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2b20	86
4.2.1. Avaliação da expressão do gene <i>spx</i> por PCR em tempo real em condições de estresse oxidativo	86
4.2.2. Avaliação da expressão do gene <i>dps</i> por PCR em tempo real em condições de estresse oxidativo	95
4.2.3. Avaliação da expressão do gene <i>pox</i> por PCR em tempo real em condições de estresse oxidativo	99
4.2.4. Avaliação da atividade enzimática de piruvato oxidase em <i>L.</i> <i>delbrueckii</i> UFV H2b20.....	109

	Página
5. CONCLUSÕES	114
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	115

RESUMO

LEITE, Marta Cristina Teixeira, Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2008. **Identificação, Caracterização e Análise da Expressão de Genes de Resposta ao Estresse Oxidativo em *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20.** Orientadora: Célia Alencar de Moraes. Conselheiros: Marisa Vieira Queiroz e Juraci Alves de Oliveira

O estresse oxidativo é uma importante causa de perda de viabilidade de culturas lácticas utilizadas na indústria de alimentos, bem como as com propósitos probióticos. O presente trabalho teve por objetivo identificar e caracterizar genes de resposta ao estresse oxidativo em *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20, uma bactéria com características potenciais para probiose. Assim, foram identificados e seqüenciados os genes *dps*, que codifica uma proteína pertencente a família das ferritinas, e *pox*, que codifica a enzima piruvato oxidase, bem como feita a caracterização parcial do operon que contém o gene *spx*, um fator transcricional envolvido na resposta ao estresse oxidativo. A análise das seqüências demonstra que o operon que codifica o gene *spx* é bastante conservado em seqüência e também com relação a sua organização em *L. delbrueckii* UFV H2b20. Esse operon apresenta 98% de identidade de seqüência com os de *L. delbrueckii* ATCC 11842 e *L. delbrueckii* ATCC BAA-365. De forma similar, o gene *pox* também apresenta 98% de identidade de seqüência com os genes correspondentes dessas bactérias. O gene *dps*, ausente no genoma dessas duas estirpes, apresenta alta identidade de seqüência (99%) com os genes correspondentes de *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus sakei*, três espécies probióticas que não fazem parte do grupo de *L. delbrueckii*. As análises filogenéticas realizadas com base nos genes *spx* e *pox* confirmam a classificação de *L. delbrueckii*

UFV H2b20, embora possua características que a distinguem de outras bactérias da mesma espécie. Demonstra-se também por análise filogenética, com base no gene *dps* e análise das sequências, que esse gene foi provavelmente adquirido por transferência horizontal a partir de bactérias com características probióticas, sendo o mesmo, portanto, possivelmente relacionado à característica probiótica dessa bactéria. Neste trabalho, também foi avaliada a expressão desses genes em resposta ao estresse oxidativo. Demonstrou-se que a transcrição de todos os genes foi induzida em resposta à presença de oxigênio e que *dps* é induzido pela presença de peróxido de hidrogênio de forma dose-dependente. A constatação de que *spx* e *dps* foram induzidos no início da fase estacionária de crescimento, foi interpretada como resultado da regulação desses genes por fatores que independem da presença ou ausência de oxigênio nessa fase do crescimento. O gene *pox* apresenta extrema sensibilidade à presença ou ausência de oxigênio sendo rapidamente induzido ou reprimido, respectivamente. O gene *pox* é reprimido em condições de excesso de glicose, em razão de ser regulado pelo mecanismo de repressão catabólica. Estes resultados também foram observados ao se analisar a atividade dessa enzima quando do cultivo de *L. delbrueckii* UFV H2b20 na presença de excesso ou restrição de glicose, bem como na presença de galactose. Demonstrou-se, portanto, o papel desses genes na resposta ao estresse oxidativo em *L. delbrueckii* UFV H2b20. A demonstração do papel desses genes na resposta ao estresse oxidativo é de grande interesse para o desenvolvimento do processo industrial.

ABSTRACT

LEITE, Marta Cristina Teixeira, Universidade Federal de Viçosa, October of 2008. **Identification, Characterization and Expression Analysis of Oxidative Stress Response Genes in *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20.** Adviser: Célia Alencar de Moraes. Co-advisers: Marisa Vieira de Queiroz, Juraci Alves de Oliveira

Oxidative stress is an important cause of viability loss in lactic acid bacteria used in food industry and as probiotics. This work aimed at identifying and characterize genes involved in the oxidative stress response in *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20, a potencial probiotic strain. Therefore, *dps*, which encodes a ferritin-like protein, and *pox*, which encodes the pyruvate oxidase enzyme, were identified in *L. delbrueckii* UFV H2b20 and sequenced. The operon bearing the *spx* gene, encoding a transcriptional factor, was also identified and partially characterized. The operon bearing *spx* is conserved in sequence and organization in *L. delbrueckii* UFV H2b20. A high sequence identity (98%) was found between the *spx* operon and its homologs of *L. delbrueckii* ATCC 11842 and *L. delbrueckii* ATCC BAA-365, as well as between *pox* of *L. delbrueckii* UFV H2b20 and its homologs of those bacteria. The *dps* gene is absent in the genome of *L. delbrueckii* ATCC 11842 and *L. delbrueckii* ATCC BAA-365, but it is present in *L. delbrueckii* UFV H2b20 bearing 99% identity with its homologs of *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus sakei*, three probiotic bacteria that belong to a group different from *L. delbrueckii*. Phylogenetic analyses based on *spx* and *pox* demonstrate that *L. delbrueckii* UFV H2b20 is always related to *L. delbrueckii* ATCC 11842 and *L. delbrueckii* ATCC BAA-365, confirming that *L. delbrueckii* UFV H2b20 belongs to this species, although it has some unique characteristics. Phylogenetic analyses based on *dps* sequences demonstrate that *L. delbrueckii* UFV H2b20 is always related to *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. reuteri* e *L. sakei*, indicating the possible aquisition of this gene by horizontal gene transfer. Besides, these results indicate the possible involvement of *dps* with the probiotic features of this strain. In this work, the expression of those three genes in response to

oxidative stress was also evaluated. Transcription of all genes was induced in response to oxygen and *dps* is induced by hydrogen peroxide in a dose-dependent way. The *spx* and *dps* genes were induced at the beginning of stationary phase demonstrating that some regulatory factors that control the expression of these genes are independent of oxygen, during this growth phase. The *pox* gene displays extreme sensibility to the presence or absence of oxygen, being fastly induced or repressed, respectively. This gene is also repressed by excess of glucose, since it is regulated by catabolite repression. These results were also observed when the enzyme activity was evaluated in excess of glucose or under restriction of this sugar and in the presence of galactose as well. The involvement of *spx*, *dps* and *pox* in the oxidative stress response of *L. delbrueckii* UFV H2b20 was clearly demonstrated. The demonstration of the role of these genes in the oxidative stress response is important for the development of the industrial process.

1. INTRODUÇÃO

Probióticos são descritos como “microrganismos vivos que quando administrados em quantidade adequada conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2001). Alimentos contendo probióticos podem ser denominados alimentos funcionais e representam um crescente mercado para a indústria de alimentos e produtos lácteos (STANTON et al., 2001).

Dentre as bactérias lácticas, espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são as mais comumente utilizadas como probióticos devido aos significantes benefícios à saúde, como: manutenção da resistência da mucosa intestinal a doenças infecciosas, produção de metabólitos com ação antimicrobiana, tendo ação sobre patógenos entéricos, estimulação do sistema imunológico, redução da intolerância a lactose, redução dos níveis de colesterol e atividade anticarcinogênica (HELLER, 2001; PERDIGON et al., 2002; STANTON et al., 2003; ADOLFSSON et al., 2004).

A utilização de *Lactobacillus* em alimentos implica na exposição a vários tipos de estresse ambiental como extremos de temperatura, pH, pressão osmótica, oxigênio, alta pressão e escassez de nutrientes que afetam a fisiologia e as propriedades das células. Assim, para que os efeitos benéficos sejam alcançados, os probióticos devem ser capazes de sobreviver às condições adversas encontradas durante o processamento e estocagem do alimento. A sobrevivência de bactérias probióticas nos alimentos abaixo da quantidade recomendada pode limitar sua habilidade de exercer os efeitos benéficos na saúde humana (SHAH, 2000). Portanto, é essencial conhecer não apenas as condições favoráveis ou desfavoráveis para o crescimento destes microrganismos, mas também os mecanismos que permitem sua sobrevivência e as atividades metabólicas sob condições de estresse.

Dentre as razões da perda de viabilidade de probióticos nos alimentos, a morte celular devido à toxicidade do oxigênio é considerada um fator significativo (DAVE & SHAH, 1997).

O estresse oxidativo se refere a condições em que a produção de espécies reativas de oxigênio resulta em efeitos adversos no desempenho celular. A redução de 4 elétrons do O₂ para H₂O resulta na formação de intermediários reativos de oxigênio como: ânion superóxido (O₂⁻), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e radical hidroxil (HO[•]). Os radicais O₂⁻ e H₂O₂ contribuem para a formação do oxidante altamente reativo HO[•] via reações de Fenton e Haber-Weiss (MCCORMICK & BUETTNER, 1998). O ânion superóxido (O₂⁻) pode se difundir por distâncias consideráveis e alcançar alvos potenciais, sendo mais reativo com proteínas intracelulares do que peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e radical hidroxil (HO[•]) (FRIDOVICH, 1999).

Em bactérias do ácido láctico, algumas oxidases são responsáveis pela interação direta com o oxigênio, com a produção de peróxido de hidrogênio. As atividades destas oxidases podem produzir espécies reativas de oxigênio que causam estresse oxidativo na célula sendo esperado, portanto, que a presença de oxigênio induza a uma resposta celular específica. (STORZ & IMLAY, 1999; THIBESSARD et al., 2001; VAN DE GUCHTE et al., 2002).

Durante o desenvolvimento de um alimento funcional um tipo de estresse que pode ser encontrado pelos microrganismos probióticos é o estresse oxidativo. O oxigênio se dissolve facilmente no leite, de forma que a viabilidade de microrganismos em alimentos lácteos fermentados é particularmente influenciada pelo conteúdo de oxigênio no produto, além da permeabilidade da embalagem ao oxigênio (SHAH, 2000).

O *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20, isolado a partir de fezes de crianças alimentadas exclusivamente com leite materno, tem sido objeto de numerosos estudos em nosso laboratório no BIOAGRO – UFV e demonstrou características fisiológicas de interesse tecnológico e funcional que o tornam objeto de atenção de pesquisadores e empreendedores da área de alimentação e saúde para sua utilização como probiótico (SANTOS, 1984). Estudos realizados na UFMG, nos Departamentos de Microbiologia e de Bioquímica e Imunologia e na UFOP têm demonstrado de maneira cientificamente fundamentada a capacidade de colonização, de imunoestimulação e, em consequência à atividade protetora dessa bactéria contra microrganismos patogênicos.

Desta forma, a aplicação de *L. delbrueckii* UFV H2b20 em alimentos probióticos reforça a necessidade de maior resistência às condições adversas presentes tanto no processamento de alimentos como no trato gastrintestinal, uma vez que as bactérias devem sobreviver à passagem

pelo trato gastrintestinal, resistir a microbiota intestinal residente, colonizar a mucosa intestinal e desempenhar funções específicas em condições desfavoráveis para o crescimento (DUNNE et al., 1999; SCHIFFRIN & BLUM., 2001).

Tendo em vista a diversidade de mecanismos de resposta a estresse já encontrados em diferentes espécies e mesmo entre diferentes linhagens de *Lactobacillus* buscou-se com este trabalho adquirir o conhecimento necessário para a obtenção de uma cultura probiótica com melhores características de resistência às condições inibitórias presentes, tanto nas etapas de processamento quanto no trato gastrointestinal. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi identificar e caracterizar genes envolvidos nos mecanismos de resposta ao estresse oxidativo presentes em *L. delbrueckii* UFV H2b20.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ecologia do Trato Gastrointestinal Humano

A comunidade microbiana presente no trato gastrointestinal humano é caracterizada por sua alta densidade populacional, ampla variedade e pela complexidade de suas interações (ISOLOAURI et al., 2001). Cerca de 100 trilhões de microrganismos (10^{14}) colonizam o trato gastrointestinal, sendo que a grande maioria reside no cólon, onde a densidade alcança 10^{11} a 10^{12} células/mL (EGERT et al., 2006).

Representantes dos três grandes domínios da vida – Bacteria, Archaea e Eukarya – estão presentes no trato gastrointestinal. Archaea e Eucarya são representados por membros de apenas um filo cada, enquanto a comunidade bacteriana é excepcionalmente diversa, sendo os microrganismos predominantes. O ecossistema bacteriano intestinal é constituído por aproximadamente 1.000 espécies e mais de 7.000 estirpes. Membros de nove filios bacterianos foram detectados, dentre os quais Firmicutes, Bacteroides e Actinobacterias são os filios predominantes (XU et al., 2007; RAJILIC et al., 2007).

A colonização microbiana se inicia após o nascimento, mas o desenvolvimento da microbiota e da barreira intestinal é um processo gradual. A microbiota intestinal materna é uma fonte de microrganismos para a colonização do trato gastrointestinal do recém-nascido, porém a mesma também é determinada pelo ambiente (BRY et al., 1996). Inicialmente, o trato gastrointestinal de recém-nascidos é colonizado por anaeróbios facultativos, consistindo principalmente de *Enterobacteria*, especialmente *Escherichia coli*, e *Enterococcus*. Entretanto, diferenças existem na composição das espécies, principalmente de acordo com o tipo de dieta (ECKBURG et al., 2005; FLINT et al., 2007). Em recém-nascidos alimentados ao seio a

contagem de bifidobactérias aumenta drasticamente, enquanto lactobacilos e bacteróides aumentam em menor proporção e enterobactérias e enterococos diminuem. Nestes casos, bifidobactérias correspondem de 80 a 90% do total dos componentes da microbiota fecal, sendo as principais espécies presentes *Bifidobacterium bifidum*, *B. infantis* e *B. longum*. Em recém-nascidos alimentados com fórmulas infantis a microbiota formada é muito mais complexa composta por bifidobactérias, bacteróides, clostrídios e estreptococos (NAIDU et al., 1999; LOREAU et al., 2001; NEU et al., 2007).

Tradicionalmente, os estudos para caracterização da microbiota intestinal se baseavam em técnicas que requerem o cultivo de microrganismos. Entretanto, nas últimas décadas, técnicas moleculares independentes de cultivo têm sido intensivamente aplicadas para estudar a diversidade da microbiota do ecossistema intestinal (WALTER et al., 2001; HARMSEN et al., 2002). Estes estudos utilizam técnicas filogenéticas e moleculares que se baseiam no sequenciamento de genes codificadores de rRNA 16S a partir de DNA extraído de amostras intestinais. Com a utilização destas técnicas moleculares tem-se observado que a diversidade da microbiota intestinal tem sido grandemente subestimada e que mais de 75% dos filotipos detectados não correspondem a espécies conhecidas (LOREAU, et al., 2001; FLINT et al., 2007; ZOETENDAL et al., 2008).

A Figura 1 mostra a árvore filogenética reconstruída a partir das sequências de rRNA 16S dos representantes mais freqüentemente detectados em material fecal humano (ZOETENDAL et al., 2008).

No meio da atual revolução da genômica comparativa e funcional é importante considerar a contribuição da microbiota intestinal à nossa biologia. O termo microbioma foi sugerido por Ledenberg para descrever o genoma coletivo da microbiota indígena humana (HOOPER & GORDON, 2001). Estima-se que o microbioma intestinal possua um total de genes aproximadamente 10 vezes maior que o genoma humano codificando vias bioquímicas que não estão presentes no homem, as quais complementam a nossa biologia e contribuem para a saúde (KUROKAWA et al., 2007).

Um aspecto importante da microbiota intestinal é a capacidade da mesma de comunicar-se e interagir com o hospedeiro em uma relação de simbiose, exercendo efeitos marcantes na nutrição, estrutura, fisiologia, bioquímica, imunologia e na expressão gênica do hospedeiro contribuindo para o desenvolvimento e manutenção das funções de proteção e digestão do trato gastrointestinal (KUROKAWA et al., 2007; FLINT et al., 2007).

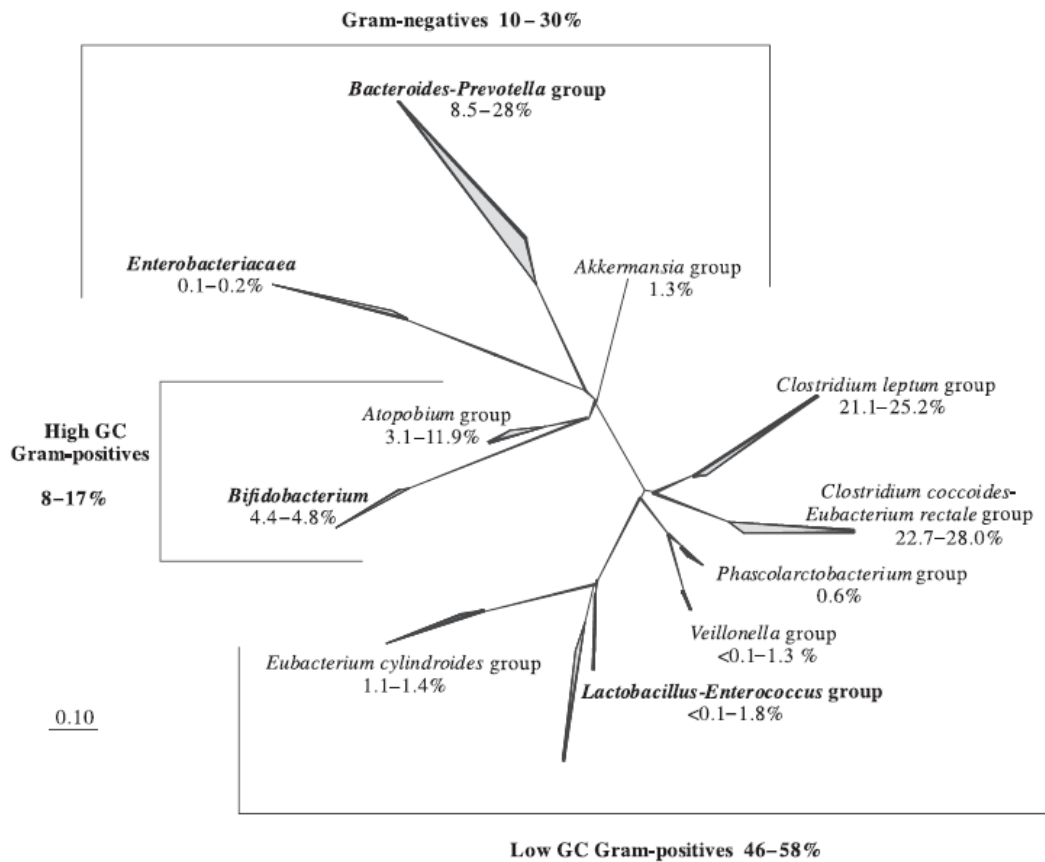


Figura 1 – Árvore filogenética construída com base nas sequências dos genes de rRNA 16S de diferentes grupos de bactérias freqüentemente detectadas no material fecal humano (ZOETENDAL et al, 2008).

Uma importante função da microbiota é o aproveitamento de energia por meio da fermentação de carboidratos não digeridos no intestino delgado, levando a produção de ácidos orgânicos de cadeia curta como acetato, propionato e butirato. Estes são utilizados pelo hospedeiro como fonte de energia ou em processos biossintéticos, sendo os mesmos absorvidos no cólon por difusão passiva através do epitélio intestinal. O butirato é principalmente metabolizado no epitélio intestinal onde é convertido a corpos cetônicos ou a CO₂. O epitélio do cólon supre 60 a 70% de sua necessidade energética pela utilização do butirato. Já o acetato é utilizado por tecidos periféricos como esqueleto e músculo cardíaco e também pelos adipócitos no processo de lipogênese. Além do valor nutricional, os ácidos orgânicos de cadeia curta exercem importantes efeitos em outros aspectos da fisiologia intestinal, estimulando o fluxo

sangüíneo, afetando a proliferação e diferenciação epitelial e alterando as junções interepiteliais intestinais (HOOPER & GORDON, 2001; HOOPER, 2004).

Outras funções benéficas exercidas pela microbiota intestinal incluem a hidrólise de lipídeos, a degradação de proteínas em aminoácidos e o metabolismo de xenobióticos. Além disso, o desenvolvimento da microbiota intestinal forma uma barreira que previne o estabelecimento de bactérias patogênicas. A redução da microbiota intestinal devido a infecções ou após o tratamento com antibióticos pode interferir com a disponibilidade de nutrientes críticos e impedir a estimulação e o desenvolvimento adequado da mucosa intestinal e da resposta imune inata e adaptativa (FLINT et al., 2007).

Estudos com camundongos isentos de germes revelaram que a comunidade microbiana desempenha um importante papel na saúde do trato gastrointestinal, sendo que o intestino desses camundongos possui várias diferenças fisiológicas e um sistema imune menos desenvolvido, quando comparado ao de um camundongo normal (HOOPER et al., 2002). Apesar disso, apenas recentemente os mecanismos moleculares envolvidos nessas interações começaram a ser elucidados. BRY e colaboradores (1996) demonstraram que *Bacteroides thetaiotaomicron* induz a produção de glicanos fucosilados no intestino de camundongos. Interessantemente, uma estirpe de *B. thetaiotaomicron* mutante para a via de utilização de fucose, não foi capaz de induzir a produção de glicanos, indicando que esta comunicação entre microrganismo e hospedeiro ocorre no intestino.

Após esta descoberta, HOOPER e colaboradores (2001) estudaram a resposta transcricional global de camundongos livres de germes como resultado da colonização por *B. thetaiotaomicron* utilizando microarranjo de DNA e PCR em Tempo Real. Os resultados desse trabalho demonstraram que *B. thetaiotaomicron* é capaz de modular a expressão de genes relacionados a uma variedade de funções fisiológicas, incluindo absorção de nutrientes e resposta imune. Além disso, observou-se que o hospedeiro reage de maneiras diferentes a colonização por *Escherichia coli* e *Bifidobacterium infantis*, o que indica que as interações com as células do hospedeiro no trato gastrointestinal podem ser específicas para cada microrganismo. Em outro estudo relacionado HOOPER et al., 2002 observou que células de Paneth presentes no intestino de camundongos secretavam uma angiogenina, Ang4, após a colonização por *B. thetaiotaomicron*. Este peptídeo possui atividade bactericida contra microrganismos intestinais e faz parte da resposta imune inata. Além disso, as células de Paneth induzem o desenvolvimento da rede vascular presente nas vilosidades após a colonização bacteriana.

Esses estudos indicam que uma comunicação específica entre hospedeiro e microrganismos pode moldar a imunidade e a maturação do trato gastrointestinal do hospedeiro e conseqüentemente, exercem um grande impacto sobre a ecologia do trato gastrointestinal. Assim, um maior conhecimento sobre o ecossistema intestinal e suas interações com o hospedeiro pode ser útil para a prevenção de doenças importantes, o que tem aumentado o interesse científico em desvendar as bases moleculares desta relação (DE VOS et al., 2004; ZOETENDAL et al., 2006; ZOETENDAL et al., 2008;).

2.2 Bactérias do Ácido Lático

As bactérias do ácido lático constituem um grupo heterogêneo de microrganismos que estão amplamente distribuídos no ambiente, sendo encontrados nos tratos gastrointestinal, urogenital e respiratório de humanos e animais, bem como em plantas (frutas, vegetais e grãos de cereais), leite e outros (WOOD & WARNER, 2003).

Filogeneticamente entre as bactérias gram-positivas, as bactérias do ácido lático pertencem ao ramo dos clostrídios e são caracterizadas como bastonetes ou cocos gram-positivos, não esporulantes, desprovidos de mobilidade e, normalmente, catalase negativos que produzem ácido lático como principal ou único produto da fermentação. Crescem em condições anaeróbias, porém a maioria não é sensível ao oxigênio, sendo, portanto, aerotolerantes (HOLZAPFEL et al., 2001). Membros deste grupo são geralmente subdivididos em dois grupos com base no metabolismo de carboidratos. O grupo dos homofermentativos é formado por bactérias que utilizam a via glicolítica (via Embden-Meyerhof-Parnas) para converter glicose quase que exclusivamente em ácido lático, dentre os quais se encontram os gêneros *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* e alguns *Lactobacillus*. Ao contrário dos homofermentadores, bactérias heterofermentativas utilizam a via 6-fosfogluconato/fosfocetolase pela qual, quantidades significativas de outros produtos como etanol, acetato e CO₂ são produzidas, além do ácido lático. Membros deste grupo incluem os gêneros *Leuconostoc*, *Weisella* e alguns *Lactobacillus* (FRANZ et al., 1999). As condições de crescimento podem alterar significativamente a composição dos produtos finais gerados em algumas bactérias lácticas devido a alterações no metabolismo do piruvato ou ao uso de aceptores de elétrons externos como oxigênio e compostos orgânicos (AXELSSON, 2004).

O gênero *Bifidobacterium* frequentemente considerado no mesmo contexto das bactérias lácticas por compartilhar algumas características típicas, não está filogeneticamente relacionado

a este grupo e possui um modo de fermentação único. Ao contrário das bactérias lácticas que possuem conteúdo G+C menor que 55%, as bifidobactérias apresentam um conteúdo G+C relativamente alto (57-67%) e pertencem ao ramo dos *Actinomycetes*. (VANDAMME et al., 1996; STILES & HOLZAPFEL, 1997).

A classificação das bactérias do ácido láctico em diferentes gêneros é baseada em uma variedade de características como: morfologia, modo de fermentação de glicose, crescimento em diferentes temperaturas, configuração do ácido láctico produzido, habilidade para crescer a altas concentrações de sal, além da tolerância a ambientes ácidos ou alcalinos. Marcadores quimiotaxonômicos como composição de ácidos graxos e constituição da parede celular são também utilizados para classificação. Além disso, a presente taxonomia também se baseia parcialmente em relacionamentos filogenéticos, os quais têm sido estabelecidos pelo extensivo trabalho na determinação e comparação de sequências do gene rRNA 16S (VANDAMME et al., 1996). A maioria dos gêneros das bactérias lácticas forma agrupamentos filogeneticamente distintos, mas para alguns gêneros, especialmente *Lactobacillus* e *Pediococcus*, o agrupamento filogenético não se correlaciona com a atual classificação baseada em características fenotípicas. Atualmente, novas ferramentas para classificação e identificação das bactérias do ácido láctico estão substituindo ou complementando metodologias tradicionais baseadas no fenótipo destes microrganismos, sendo as mais promissoras o seqüenciamento do gene rRNA 16S, técnicas de *fingerprint* baseadas em PCR e padrão de proteínas solúveis (AXELSSON, 2004).

As bactérias do ácido láctico são amplamente empregadas na indústria de alimentos, sendo utilizadas na fabricação de produtos lácteos e de outros alimentos fermentados como queijos, iogurtes, carnes fermentadas e vinhos. Estes microrganismos contribuem para o sabor e a textura destes produtos por produzirem proteases e peptidases, agentes aromáticos ou exopolissacarídeos. Além disso, contribuem também para a conservação dos mesmos por inibirem o crescimento de bactérias deterioradoras e/ou patogênicas pela produção de substâncias inibidoras do crescimento, tais como bacteriocinas, ácidos orgânicos e peróxido de hidrogênio. Os gêneros de importância em alimentos são *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagonococcus* e *Weissella* (KLEIN et al., 1998).

Atualmente, estes microrganismos também têm sido utilizados para a fabricação de produtos químicos e biológicos, incluindo biopolímeros em *Leuconostoc* sp, enzimas em *Lactobacillus brevis*, etanol e ácido láctico em *Lactobacillus casei*, *L. delbrueckii* e *L. brevis*

(KLAENHAMMER et al., 2005). Alguns membros deste grupo de bactérias ainda tem se destacado por estarem freqüentemente associadas e efeitos terapêuticos e benéficos à saúde humana e animal.

2.3 Bactérias do Ácido Lático Probióticas

O aumento da expectativa de vida e a busca por melhorias na qualidade de vida têm sido fatores impulsionantes para a pesquisa e desenvolvimento na área dos alimentos funcionais. Embora o conceito de alimentos funcionais tenha sido introduzido há muito tempo atrás, apenas recentemente surgiram evidências que suportam a hipótese de que a dieta desempenha uma importante função na modulação de funções fisiológicas essenciais ao corpo. Entre os vários compostos funcionais reconhecidos até o momento, compostos bioativos presentes em alimentos fermentados e probióticos são os mais estudados devido à longa tradição no uso e dos efeitos benéficos já reconhecidos (VASILJEVIC & SHAH, 2008).

O termo probiótico tem sido comumente utilizado há mais de 25 anos. Definições sobre este termo têm sido aperfeiçoadas ao longo dos anos, à medida que mais informações tornem-se disponíveis (REID et al., 2003).

Seguindo as recomendações da FAO/WHO (2001), probióticos são descritos como “microrganismos vivos que quando administrados em quantidade adequada conferem benefícios à saúde do hospedeiro”. Conseqüentemente, uma grande variedade de espécies e gêneros poderia ser considerada como potencialmente probióticos. Comercialmente, entretanto, as linhagens mais importantes pertencem ao grupo das bactérias do ácido láctico. Dentre estas, espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são as mais comumente utilizadas como probióticos em alimentos para consumo humano devido aos significantes benefícios associados com a ingestão destes microrganismos (VASJILIC & SHAH, 2008).

O gênero *Lactobacillus* é o maior dentro do grupo das bactérias do ácido láctico (LAB) e apresenta grande variabilidade fenotípica (bioquímica e fisiológica) entre as espécies que colonizam tecidos humanos. Vários efeitos benéficos à saúde são atribuídos a linhagens probióticas de *Lactobacillus* que colonizam o trato gastrintestinal como: manutenção da resistência da mucosa intestinal a doenças infecciosas, produção de metabólitos com ação antimicrobiana, tendo ação sobre patógenos entéricos, estimulação do sistema imunológico, redução da intolerância a lactose, redução dos níveis de colesterol e atividade anticarcinogênica

(OUWEHAND et al., 2002). Por esse motivo, essas bactérias têm sido amplamente estudadas visando o seu uso em alimentos probióticos que auxiliem na terapia e na manutenção da microbiota intestinal. Futuras aplicações dos lactobacilos provavelmente incluirão a construção de linhagens capazes de produzir nutrientes essenciais ou apresentar epitopos como componentes de vacinas orais (MATTILA-SANDHOLM et al., 2002).

Vários critérios são usados para a seleção de microrganismos probióticos, como estabilidade fenotípica e genotípica, padrões de utilização de carboidratos e proteínas, tolerância, sobrevivência e crescimento em condições ácidas e na presença de bile, propriedades de adesão ao epitélio intestinal, produção de substâncias antimicrobianas, padrões de resistência a antimicrobianos e capacidade de inibir patógenos entéricos (REID, 2008). Além disso, para serem utilizadas comercialmente, as linhagens probióticas devem apresentar boas propriedades tecnológicas para serem incorporados em produtos alimentícios sem perderem a viabilidade e funcionalidade ou gerarem aromas e texturas desagradáveis (MATTILA-SANDHOLM et al., 2002).

Alguns autores (MCCARTNEY, 2002; DOGI & PERDIGON, 2006) sugeriram a inclusão de mais duas abordagens na seleção de bactérias probióticas: a avaliação *in vitro* da funcionalidade e a análise genômica. A avaliação da funcionalidade se refere ao efeito exercido por estes microrganismos sobre o tecido linfóide associado ao intestino, denominado GALT, mais especificamente, ao tipo de resposta modulada por estes microrganismos. Já a utilização da análise genômica para seleção de probióticos está relacionado à crescente disponibilidade de sequências completas de genomas de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (MCCARTNEY, 2002; DOGI & PERDIGON, 2006).

O *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20, foi isolado por SANTOS (1984) a partir de fezes de crianças alimentadas exclusivamente com leite materno e demonstrou características fisiológicas de interesse tecnológico e funcional que o tornam objeto de atenção de pesquisadores e empreendedores da área de alimentação e saúde para sua utilização como probiótico (AGOSTINHO, 1988; MONTEIRO, 1999; FURTADO, 2001; LEITE, 2005). Estudos têm demonstrado a capacidade de colonização, de imunoestimulação e, em consequência à atividade protetora dessa bactéria contra microrganismos patogênicos (NEUMAN et al., 1998; FILHO-LIMA et al., 2000).

Muitos autores defendem a importância da origem das estirpes probióticas para aplicações comerciais específicas. Entretanto, sugere-se que a especificidade da ação probiótica é mais importante do que sua origem (FAO/WHO, 2001).

Os genomas de algumas bactérias probióticas já foram seqüenciados e outros estão em andamento. Com a disponibilização destes dados será possível conhecer o potencial genético desses microrganismos para sobreviver no trato gastrointestinal e predizer algumas das atividades probióticas como imunoestimulação (DE VOS et al., 2004; MORELLI, 2007).

O primeiro exemplo de caracterização molecular relacionada à função probiótica foi fornecido pela análise funcional do genoma e do proteoma de *Bifidobacterium longum* NCC2705 (SCHELL et al., 2002; YUAN et al., 2006). Análises de bioinformática forneceram informações necessárias para esclarecer sobre a capacidade de bifidobactérias em fermentar oligossacarídeos não digeríveis, uma vez que um grande número de proteínas putativas parecem ser especializadas no catabolismo de uma variedade de carboidratos. Dentre estas proteínas estão novas glicosil-hidrolases que não foram detectadas por ensaios de fermentação. Esta abundância de hidrolases poderia prontamente contribuir para a competitividade e persistência de bifidobactérias no cólon (MORELLI, 2007).

Além disso, a análise do genoma de *L. johnsonii* NCC533, uma bactéria probiótica comercialmente utilizada, revelou a presença de mais de 12 proteínas de superfície, incluindo subunidades fimbriais, possivelmente envolvidas na adesão às mucinas intestinais (PRIDMORE et al., 2004). Em *L. plantarum* WCFS1 a análise do genoma tem fornecido importantes informações sobre o comportamento desta bactéria sob estresse por sais biliares e em *B. longum* NCC2705 um inibidor de serino-proteases foi encontrado, o qual está possivelmente envolvido na atividade imunomoduladora de bifidobactérias (BRON et al., 2004; SCHELL et al., 2002).

Assim, a análise dos genomas é uma nova ferramenta para a seleção de linhagens probióticas, a qual poderia ser utilizada para fornecer informações sobre as características probióticas potencialmente presentes nos microrganismos analisados. Futuras linhagens probióticas serão provavelmente selecionadas pela combinação entre uma análise genômica preliminar seguida por ensaios *in vitro*. Entretanto, ensaios *in vivo* continuarão sendo fundamentais para a etapa final da seleção de linhagens probióticas (MORELLI, 2007).

Historicamente, um aspecto importante considerado em relação à utilização de microrganismos probióticos é o aspecto ecológico, desde a inferência de Metchnikoff (1907), de que a comunidade bacteriana residente no intestino grosso de humanos seria a fonte de substâncias tóxicas ao sistema nervoso e vascular. Estas substâncias, absorvidas no intestino e presentes na corrente sanguínea, contribuiriam para o processo de envelhecimento. Assim, bactérias do trato gastrointestinal foram identificadas como os agentes causadores da “autointoxicação”. Estes microrganismos seriam capazes de degradar proteínas, liberando

amônia, aminas e indóis, os quais em determinadas concentrações são tóxicos aos tecidos humanos. Metchnikoff inferiu que baixas concentrações dos produtos bacterianos tóxicos poderiam escapar ao processo de desintoxicação no fígado e entrar na circulação sistêmica. Assim, inferiu-se que seria possível substituir ou diminuir em número as bactérias putrefativas no intestino pelo enriquecimento da microbiota intestinal com populações bacterianas que fermentassem carboidratos e possuíssem baixa atividade proteolítica. A administração oral de culturas de bactérias lácticas foi então utilizada para este propósito, uma vez que se observou que a fermentação natural do leite impedia o crescimento de bactérias não tolerantes ao ácido, incluindo espécies proteolíticas (VASILJEVIC & SHAH, 2008).

Entretanto, a visão de Metchnikoff de que o consumo de células bacterianas alteraria as proporções de certas populações presentes no intestino desconsiderou umas das mais poderosas forças da natureza: a homeostase. A homeostase das comunidades bacterianas é representada por estado de equilíbrio que é gerado pelos próprios microrganismos. A competição por nutrientes e espaço, a inibição de um grupo por produtos metabólicos de outro, predação e parasitismo, todos contribuem para a regulação da proporção das populações microbianas (TANNOCK, 2004).

A grande diversidade microbiana do trato gastrointestinal indica a presença de um elevado número de nichos ecológicos. Muitos nichos são determinados por características anatômicas, imunológicas e fisiológicas do hospedeiro. Entretanto, muitos nichos são também gerados pelo desenvolvimento de complexas cadeias alimentares, onde o produto de um microrganismo torna-se substrato para outro (DE VOS et al., 2004; LEY et al., 2006).

A teoria evolucionária prediz que em um ambiente espacialmente heterogêneo, os nichos vagos tornam-se ocupados por organismos, e a seleção natural favorece a emergência de especialistas ecológicos que são altamente adaptados aos nichos disponíveis (KASSEN & RAINEY, 2004). Durante a colonização gradual do trato gastrointestinal humano nos primeiros anos de vida, todos os nichos são provavelmente ocupados por microrganismos bem adaptados, muitos dos quais são adquiridos do contato com a mãe (LEY et al., 2006). Uma vez que cada nicho ecológico pode ser ocupado apenas por um tipo de organismo, segundo a teoria de exclusão de nichos, torna-se extremamente difícil que um organismo que é acidentalmente ou intencionalmente introduzido em um ecossistema seja capaz de estabelecer-se e persistir no sistema. Estes princípios ecológicos explicam porque os níveis populacionais e a composição de espécies da microbiota do trato gastrointestinal permanecem constantes ao longo da vida adulta,

sendo este fenômeno denominado “exclusão competitiva” (TANNOCK, 2004; WALTER, 2008).

A exclusão competitiva é relevante para a introdução de probióticos no trato gastrointestinal. Estes microrganismos são alóctones à comunidade microbiana do intestino, e como demonstrado em vários estudos, estes tem uma existência transiente no ecossistema intestinal (TANNOCK, 2004). Em um destes estudos, *Lactobacillus rhamnosus* DR 20 foi administrado em leite diariamente por um período de 6 meses. A linhagem probiótica foi detectada apenas durante o período de consumo do produto, sendo que após a interrupção do mesmo a excreção do microrganismo nas fezes também foi interrompida. Além disso, os níveis da linhagem probiótica eram relativamente baixos e esta foi detectada irregularmente nas amostras coletadas de cerca de 40% dos indivíduos que possuíam populações preexistentes e estáveis de *Lactobacillus* residentes no intestino. Os demais indivíduos não possuíam populações estáveis de *Lactobacillus* e a linhagem probiótica pode ser detectada em todas as amostras fecais ao longo do período de consumo do produto probiótico (TANNOCK et al., 2000).

Lactobacillus alóctones são comumente introduzidos no ecossistema intestinal, uma vez que os mesmos estão amplamente distribuídos na natureza. Eles são parte da microbiota de muitos alimentos, e estas espécies encontradas em alimentos podem ser detectadas de forma transiente em amostras fecais (DAL BELLO et al., 2003; WALTER et al., 2003). Entretanto, alguns indivíduos possuem populações de *Lactobacillus* autóctones que podem ser detectados ao longo de toda a vida. O conceito de autoctonia foi primeiramente utilizado em relação ao ecossistema intestinal por DUBOS e colaboradores (1965). Posteriormente, SAVAGE (1972) definiu que microrganismos autóctones são caracterizados como microrganismos que colonizam regiões particulares do trato gastrointestinal nos primeiros anos de vida, multiplicam-se formando densas populações logo após a colonização e permanecem nestas proporções ao longo da vida de indivíduos saudáveis.

Os benefícios conferidos por microrganismos intestinais já foram claramente demonstrados de várias formas. As bactérias intestinais podem melhorar as funções imunes do hospedeiro e da barreira mucosa, além de fornecer proteção contra microrganismos patogênicos. Essas interações são extremamente complexas e modulam vias de transdução de sinais e a expressão gênica de células epiteliais e imunes. Isto nos leva a prever que atividades mutuamente benéficas foram estabelecidas por seleção natural durante a coevolução, uma vez que estas interações promovem o melhor desenvolvimento do hospedeiro. Conseqüentemente,

bactérias que habitam o trato gastrointestinal e compartilham uma longa história evolucionária com seu hospedeiro são, provavelmente, as que possuem melhores efeitos sobre a saúde, os quais podem ser explorados quando esses microrganismos são utilizados como probióticos. Portanto, pode-se considerar que estirpes autóctones constituem melhores estirpes probióticas para determinadas aplicações (WALTER, 2008).

A maioria das estirpes atualmente utilizadas como probióticos pertencem a espécies que são provavelmente alóctones ao trato gastrointestinal humano e a incapacidade de persistir no mesmo é reflexo da perda de competitividade no ecossistema intestinal. Seria um grande avanço a investigação de características probióticas de estirpes comprovadamente autóctones, tanto em relação à persistência no intestino como aos efeitos benéficos à saúde (TANNOCK, 2004; WALTER, 2008).

Os efeitos benéficos de microrganismos probióticos à saúde do hospedeiro são conferidos principalmente pela estimulação ou modulação do sistema imunológico. O relacionamento entre microrganismos autóctones e o sistema imune em indivíduos saudáveis é caracterizado pela tolerância, enquanto esta relação com bactérias alóctones resulta em uma intensa resposta imune. Aparentemente, bactérias intestinais desenvolveram propriedades para evitar uma resposta imune do hospedeiro. Assim, elas possuem fatores que induzem células T regulatórias antígeno específicas que contribuem ativamente para o desenvolvimento da tolerância por parte do hospedeiro (TSUJI, 2006). Conseqüentemente, bactérias autóctones seriam candidatas mais promissoras para serem utilizadas como probióticos no tratamento de doenças inflamatórias intestinais, uma vez que a supressão de uma resposta imune inapropriada seria importante para o controle da doença. *Lactobacillus reuteri*, o qual é autóctone em roedores e humanos é capaz de modular macrófagos e células dendríticas de modo a favorecer a tolerância imunológica, tendo demonstrado ser especialmente eficiente na prevenção de colite em vários modelos animais (MIYOSHI et al., 2006).

Por outro lado, a ativação do sistema imune, como o aumento da fagocitose e efeitos adjuvantes, observada após a administração de algumas estirpes probióticas reflete a natureza alóctone das mesmas, e estas bactérias seriam mais efetivas no tratamento ou prevenção de doenças infecciosas e diarreia causada por rotavírus (MADSEN, 2006).

Assim, no futuro, além dos critérios já utilizados para seleção de estirpes probióticas, o desempenho ecológico, a persistência e a história evolucionária poderão também ser analisados como critérios de seleção (WALTER, 2008).

2.4 Estresse oxidativo e efeito do oxigênio no metabolismo de bactérias lácticas

As bactérias do ácido láctico são microrganismos anaeróbios ou aerotolerantes. O efeito do oxigênio no crescimento e metabolismo das bactérias lácticas tem sido estudado há várias décadas. Entretanto, a maioria dos estudos tem utilizado *Lactococcus lactis* como organismo modelo. Estes microrganismos reagem ao oxigênio e as consequências destas reações podem ser tanto benéficas como deletérias. (DE ANGELIS & GOBETTI, 2004).

As bactérias lácticas possuem vias eficientes de fermentação de carboidratos acopladas à fosforilação em nível de substrato. Acreditava-se que estas eram incapazes de produzir ATP através de cadeia transportadora de elétrons utilizando-se oxigênio como aceptor final de elétrons, uma vez que não sintetizam citocromos ou grupamentos heme. Entretanto, na presença de heme ou hemoglobina no meio de cultura, algumas bactérias lácticas são capazes de alterar seu metabolismo fermentativo e realizar respiração, formando citocromos, utilizando oxigênio como aceptor final de elétrons, resultando no aumento da produção de ATP, provavelmente pela fosforilação oxidativa. Esta alteração do metabolismo foi primeiramente observada em bactérias do gênero *Enterococcus*, mas já foi observado também em *Lactococcus* e *Leuconostoc* (AXELSSON, 2004).

A análise do genoma de *L. lactis* IL1403 (BOLOTIN et al., 2001) revelou a presença de todos os genes necessários para a respiração aeróbia, bem como genes envolvidos nas etapas finais da síntese de grupos heme. Apesar destas observações em *L. lactis*, o oxigênio é geralmente associado a efeitos negativos em bactérias lácticas (BOLOTIN et al., 2001; DUWAT et al., 2001; VAN DE GUCHTE et al., 2002).

O estresse oxidativo se refere a condições em que a produção de espécies reativas de oxigênio resulta em efeitos adversos no desempenho celular. A redução de 4 elétrons do O_2 para H_2O resulta na formação de intermediários reativos de oxigênio como: ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxil (HO^\bullet). Os radicais O_2^- e H_2O_2 contribuem para a formação do oxidante altamente reativo HO^\bullet via reações de Fenton e Haber-Weiss (FRIDOVICH, 1998)

O ânion superóxido (O_2^-) pode se difundir por distâncias consideráveis e alcançar alvos potenciais, sendo mais reativo com proteínas intracelulares do que peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxil (HO^\bullet). Desta forma, o oxigênio por si só é incapaz de causar qualquer dano às células, porém durante o metabolismo celular estes intermediários com alto potencial oxidante são gerados e podem reagir com vários alvos celulares causando danos como bloqueio

de vias metabólicas, mutações espontâneas, e efeitos bacteriostático e bactericida (FRIDOVICH, 1995). Dentre os principais alvos celulares estão proteínas, DNA, RNA e lipídeos da membrana, entre outros. O ânion superóxido (O_2^-) possui um moderado potencial oxidante e pode reagir com compostos como polifenóis, ascorbato e catecolaminas (FRIDOVICH, 1998; BRIOUKANOV & NETRUSOV, 2007). Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pode oxidar resíduos de cisteína presentes em proteínas, inativando desta forma várias enzimas. Pode também reagir com ferro e cobre como descrito anteriormente, e produzir radicais hidroxil (STORZ & IMLAY, 1999; BRIOUKANOV & NETRUSOV, 2007). O radical hidroxil (HO^\bullet) é um forte agente oxidante capaz de reagir com a maioria dos compostos orgânicos e causar clivagem das fitas de DNA, bem como uma série de modificações de base do mesmo (FRIDOVICH, 1998; CABISCOL et al., 2000).

Outro tipo de dano é a peroxidação dos lipídeos e alteração das proteínas de membrana, afetando a permeabilidade celular e a osmoregulação. O principal efeito da peroxidação de lipídeos é a diminuição da fluidez da membrana, o que altera suas propriedades, desestruturando a interação desta com as proteínas de membrana (CABISCOL et al., 2000). A peroxidação atua como um efeito amplificador, uma vez que mais radicais são formados e ácidos graxos poliinsaturados são degradados a uma variedade de produtos. Alguns destes produtos, como aldeídos, são extremamente reativos e podem danificar moléculas como proteínas. Ao contrário das espécies reativas de oxigênio, os aldeídos possuem uma vida média longa e podem se difundir e atacar alvos distantes, agindo como segundo mensageiro tóxico (CABISCOL et al., 2000).

Vários mecanismos de resistência ao estresse oxidativo já foram descritos para microrganismos, os quais se baseiam principalmente na prevenção da formação das espécies reativas de oxigênio, na eliminação das mesmas, na proteção dos possíveis alvos ou no reparo dos danos causados (VAN DE GUCHTE et al., 2002).

Bactérias lácticas utilizam tanto enzimas (catalase, NADH oxidase/ peroxidase, superóxido dismutase) quanto compostos não enzimáticos (Mn, ascorbato, tocoferóis e glutatona) para reduzir os radicais do oxigênio, sendo que habilidade de responder ao estresse oxidativo varia, dentre essas bactérias, dependendo do nível e tipos de mecanismos antioxidantes (VAN DE GUCHTE et al., 2002).

Em bactérias do ácido láctico, algumas oxidases são responsáveis pela interação direta com o oxigênio, com a produção de peróxido de hidrogênio, sendo que, em algumas culturas expostas ao oxigênio o acúmulo desse composto chega a níveis inibitórios. As atividades destas

oxidases podem produzir espécies reativas de oxigênio que causam estresse oxidativo na célula sendo esperado, portanto, que a presença de oxigênio induza a uma resposta celular específica (MIYOSHI et al., 2003). A tabela 1 resume as principais reações catalisadas por bactérias lácticas que envolvem a utilização de oxigênio molecular ou metabólitos de oxigênio.

Reações Enzimáticas	Enzimas	Genes
$\text{NADH} + \text{H}^+ + \text{O}_2 \longrightarrow \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O}_2$	NADH: H ₂ O ₂ oxidase	<i>ahpF</i>
$2\text{NADH} + \text{H}^+ + \text{O}_2 \longrightarrow 2\text{NAD}^+ + 2\text{H}_2\text{O}$	NADH: H ₂ O oxidase	<i>nox</i>
Piruvato + fosfato + O ₂ \longrightarrow acetilfosfato + CO ₂ + H ₂ O ₂	Piruvato oxidase	<i>pox</i>
α -glicerofosfato + O ₂ \longrightarrow diidroxiacetona fosfato + H ₂ O ₂	α -glicerofosfato oxidase	<i>glpO</i>
$2\text{O}_2^- + \text{H}^+ \longrightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$	superóxido dismutase	<i>sod</i>
$\text{NADH} + \text{H}^+ + \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{NAD}^+ + 2\text{H}_2\text{O}$	NADH peroxidase	<i>npr</i>

Tabela 1 – Reações enzimáticas que utilizam oxigênio em bactérias lácticas e as respectivas enzimas e genes correspondentes (MIYOSHI et al., 2003).

O mecanismo de resistência mais comum entre as bactérias do ácido láctico é a utilização do sistema NADH oxidase/NADH peroxidase. NADH oxidases estão amplamente distribuídas entre as bactérias lácticas e produzem peróxido de hidrogênio ou água como produtos finais da reação com o oxigênio, dependendo da capacidade da enzima de transferir 2 ou 4 elétrons. No primeiro caso, NADH:H₂O₂ oxidase, catalisa a redução de oxigênio a peróxido pela oxidação de uma molécula NADH, enquanto NADH:H₂O oxidase reduz oxigênio a água pela oxidação de 2 moléculas de NADH. A maioria das bactérias lácticas possui NADH peroxidase que utiliza o peróxido de hidrogênio como acceptor final de elétrons com a formação de uma molécula de água. Entretanto, a atividade de NADH peroxidase é geralmente baixa e a destoxificação celular do peróxido torna-se ineficiente (SEAMUS, 1987; AXELSSON, 2004).

Algumas bactérias lácticas possuem ainda oxidases que utilizam oxigênio molecular para oxidar substratos como piruvato ou lactato. Uma vez que estas reações não ocorrem em anaerobiose, o metabolismo na presença de oxigênio não é idêntico ao metabolismo na ausência deste. Além disso, a atividade das oxidases pode produzir espécies de oxigênio parcialmente reduzidas como ânion superóxido (O₂⁻), peróxido de hidrogênio e radical hidroxil que causarão estresse oxidativo na célula (LORQUET et al., 2004).

Lactobacillus delbrueckii é uma importante espécie de bactéria láctica utilizada na produção industrial de produtos fermentados de leite. Este microrganismo é um anaeróbio aerotolerante

que obtêm a maior parte da energia a partir da fermentação homoláctica. Embora *Lactobacillus delbrueckii* não utilize oxigênio no metabolismo energético, a presença deste no ambiente pode influenciar sua fisiologia (MARTY-TEYSSET et al., 2000).

L. delbrueckii subsp. *bulgaricus* pode reduzir O_2 para H_2O_2 utilizando uma oxidase dependente de NADH para eliminar ou diminuir o nível de O_2 . O mesmo foi encontrado para *L. plantarum* ATCC 8014 através da oxidação de NADH, lactato e piruvato. A destoxificação de O_2 leva a uma superprodução de H_2O_2 que causa estresse oxidativo e provoca a entrada precoce das células na fase estacionária (RIBEIRO, 1995; MARTY-TEYSSET et al., 2000).

A enzima piruvato oxidase também é encontrada entre as bactérias lácticas e converte piruvato a CO_2 e acetil-fosfato com a formação de peróxido. Esta enzima está envolvida no metabolismo aeróbio de *Lactobacillus plantarum* que forma quantidades significativas de acetato em aerobiose (GOLFFIN et al., 2006).

De acordo com a sequência do genoma de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ATCC 11842 poucos dos genes de resistência a estresse oxidativo conhecidos estão presentes neste microrganismo. A única enzima que pode eliminar o oxigênio parece ser a enzima piruvato oxidase (Pox), entretanto, não há catalase para destoxificar o peróxido de hidrogênio produzido nesta reação. Esta estirpe parece não possuir NADH oxidase já descrita em outras linhagens de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (VAN DE GUCHTE et al., 2006).

A enzima piruvato oxidase já foi caracterizada em *Lactobacillus plantarum* e desempenha uma função chave na via de conversão de lactato a acetato. Esta enzima utiliza oxigênio para converter piruvato a acetilfosfato o que resulta na produção de CO_2 e H_2O_2 . A via de conversão do lactato a acetato (Ldh-Pox-Ack) em *L. plantarum* está sobre o controle de dois fatores ambientais: disponibilidade de glicose e oxigênio. A regulação desta enzima por oxigênio em *L. plantarum* ocorre em dois níveis: o oxigênio é requerido como substrato para a atividade da enzima e também induz fortemente a transcrição do gene *poxB* por um mecanismo ainda desconhecido (GOFFIN et al., 2006).

Um segundo mecanismo comum de resistência é a presença da enzima superóxido dismutase (Sod) que remove o ânion superóxido, formando oxigênio e peróxido de hidrogênio. Esta enzima está presente em algumas bactérias lácticas, como *Lactococcus* e *Enterococcus*, mas está ausente em outras como *Lactobacillus* (AXELSSON, 2004)

Outra enzima geralmente utilizada por vários microrganismos em resposta ao estresse oxidativo é a catalase. A maioria das bactérias lácticas não possui catalase, entretanto algumas espécies são capazes de produzir catalases em meios de cultura contendo heme. Catalases

contendo manganês em seu sítio ativo também já foram detectadas em algumas bactérias lácticas (KONO & FRIDOVICH, 1983; BARYNIN et al., 2001). Uma catalase a base de manganês foi detectada em *Lactobacillus plantarum* ATCC 14431 e observou-se que esta é essencial para o crescimento normal deste microrganismo em condições de aerobiose, sendo a mesma importante para a remoção do peróxido de hidrogênio gerando pelo metabolismo celular. Além disso, a inativação desta enzima por recombinação sítio-específica resultou em aumento da sensibilidade ao peróxido (PEACOCK, 2008).

Outro mecanismo importante na eliminação de metabólitos tóxicos de oxigênio é o acúmulo intracelular de manganês. Algumas estirpes de *Lactobacillus* são capazes de acumular manganês em altas concentrações (30 a 35 mM), sendo que nestas concentrações o manganês é funcionalmente equivalente à superóxido dismutase, removendo desta forma o ânion superóxido (AXELSSON, 2004).

Apesar do efeito inibitório das espécies reativas de oxigênio sobre as bactérias lácticas, concluiu-se que parte da atividade antimicrobiana de *Lactobacillus*, sobre a microbiota intestinal é devida a esses compostos (DE ANGELIS & GOBETTI, 2004).

Ribeiro (1995) observou que em *L. delbrueckii* UFV H2b20 a principal substância envolvida na ação antagonista em relação a outros microrganismos, além do ácido láctico, é o peróxido de hidrogênio. Desta forma, a presença de sistemas de resistência às espécies reativas de oxigênio está intimamente relacionada à capacidade competitiva dos microrganismos sejam eles aeróbios, anaeróbios ou aerotolerantes.

A utilização de *Lactobacillus* como probiótico implica na exposição a vários tipos de estresse como extremos de temperatura, pH, pressão osmótica, oxigênio, alta pressão e escassez de nutrientes que afetam a fisiologia e as propriedades das células. Portanto, é essencial conhecer não apenas as condições favoráveis ou desfavoráveis para o crescimento destes microrganismos, mas também os mecanismos que permitem sua sobrevivência e as atividades metabólicas sob condições de estresse (SHAH, 2000).

Dentre as razões da perda de viabilidade de probióticos nos alimentos, a morte celular devido à toxicidade do oxigênio é considerada um fator significativo. Assim, durante o desenvolvimento de um alimento funcional um tipo de estresse encontrado por microrganismos probióticos é o estresse oxidativo. O oxigênio se dissolve facilmente no leite, de forma que a viabilidade de microrganismos em alimentos lácteos fermentados é particularmente influenciada pelo conteúdo de oxigênio no produto, além da permeabilidade da embalagem ao oxigênio (SHAH, 2000; TALWALKAR & KAILASAPATHY, 2004).

De acordo com a sequência do genoma do *L. bulgaricus*, outros genes envolvidos no estresse oxidativo presentes neste microrganismo são os codificadores de duas tioredoxinas, duas tioredoxinas redutases e possivelmente um gene homólogo ao gene da proteína regulatória Spx (ZUBER, 2004). A captação ou entrada de poliaminas ou seus precursores também pode representar uma alternativa para o aumento da tolerância ao estresse oxidativo (VAN DE GUCHTE et al., 2006).

A iniciação da transcrição em procariotos é controlada em muitos níveis e por uma variedade de interações entre RNA polimerase, sequência promotora e diversos fatores regulatórios. A subunidade α da RNA polimerase, especialmente, o domínio C-terminal (α CTD), é um alvo comum para interação entre ativadores transcricionais e a RNA polimerase, fazendo com que esta estabeleça contato produtivo com a região promotora (BUSBY & EBRIGHT, 1999). Recentemente, demonstrou-se que o domínio α CTD é o alvo de uma forma negativa de controle exercida pela proteína Spx em *Bacillus subtilis* (NAKANO et al., 2003).

Spx não possui uma atividade de ligação específica a sequências do DNA, mas ao invés disso, interage com o domínio α CTD da RNA polimerase impedindo ou interrompendo a interação da enzima com determinados ativadores de transcrição, o que resulta na repressão de vários genes. Spx é altamente conservado entre as bactérias Gram-positivas e faz parte da família de proteínas relacionadas à arsenato redutase (ArsC) (NAKANO et al., 2005; NAKANO et al. 2003; ZUBER, 2004).

Com base nos estudos já realizados em *Bacillus subtilis* há evidências de que Spx desempenha uma importante função na estrutura fisiológica deste microrganismo e possivelmente de outras bactérias Gram-positivas. Os dados obtidos indicam que Spx é um regulador transcricional global que exerce tanto controle positivo como negativo sobre a iniciação da transcrição em resposta ao estresse oxidativo (ZUBER, 2004; NAKANO et al., 2003;

Spx também parece ser um importante fator regulatório na resposta ao estresse em *Staphylococcus aureus* e durante o processo de infecção em *Listeria monocytogenes* (CHATTERJEE et al., 2006; PAMP et al., 2006). Vários operons cujos produtos estão relacionados à biossíntese de purinas, pirimidinas, aminoácidos e vitaminas são reprimidos e mais de 100 genes são induzidos pela interação de Spx com o domínio α CTD da RNA polimerase. Dentre os genes mais induzidos estão os genes *trxA* e *trxB* que codificam uma tioredoxina e uma tioredoxina redutase, respectivamente. Outros genes com função na homeostase de tiol, incluindo três genes homólogos a tioredoxina, são induzidos por Spx, o que

sugere que este atue no controle da resposta celular ao estresse oxidativo (NAKANO et al., 2003).

Uma importante característica de Spx é a presença do domínio redox dissulfeto Cys-XX-Cys que controla sua atividade. A ativação transcricional a partir dos promotores de *trxA* e *trxB* requer que ambas as cisteínas estejam oxidadas. A presença de um agente redutor que converta as cisteínas a um estado tiol resulta na perda da capacidade de ativação da transcrição. Ainda não se sabe como a interação da proteína Spx oxidada com a RNA polimerase ativa a transcrição de promotores sobre controle positivo de Spx (NAKANO et al., 2005; NEWBERRY et al., 2005).

O gene *spx* faz parte do operon *yjbC-spx* em *Bacillus subtilis* e é transcrito a partir de pelo menos 5 promotores por 4 formas de RNA polimerase holoenzima (σ^A , σ^B , σ^M e σ^W). A expressão do gene *spx* tem sido associada à limitação de fosfato, a presença de etanol e estresse oxidativo, enquanto o regulon *spx* é ativado por uma variedade de condições de estresse que incluem choque térmico, estresse osmótico, oxidativo e compostos fenólicos tóxicos (LEELAKRIANGSAK & ZUBER, 2007).

O controle da expressão de *spx* em resposta ao estresse oxidativo ocorre em 3 níveis. Os níveis de proteína aumentam independentemente da transcrição do gene, provavelmente pela inibição da atividade de ClpXP que catalisa a proteólise de Spx. A atividade de Spx também está sobre o controle do sítio dissulfeto Cys-XX-Cys e finalmente a transcrição a partir do promotor P3 é induzida por estresse oxidativo. A análise da região promotora P3 de *spx* indicou a presença de dois cis-elementos que participam na repressão da transcrição do gene pela interação direta com dois repressores transcricionais, PerR e YodB (LEELAKRIANGSAK et al., 2007; LEELAKRIANGSAK & ZUBER, 2007)

Embora muito já se conheça a certa da importância deste gene em *Bacillus subtilis*, apenas um estudo foi realizado em bactérias lácticas, no qual um gene homólogo a Spx foi identificado como sítio de mutações que conferem resistência a temperaturas elevadas em mutantes *recA* em *Lactococcus lactis* (FREES et al., 2001).

Análises filogenéticas, comparação do conteúdo genômico dentro do grupo de bactérias do ácido láctico e a reconstrução de genes ancestrais revelam a combinação de perda e ganho de genes durante a evolução das bactérias lácticas. Dentre os genes perdidos durante a evolução estão genes que codificam proteínas envolvidas na resposta ao estresse oxidativo como catalase e outras enzimas. Apesar da ausência destes genes em 8 dos 12 genomas analisados por MAKAROVA e colaboradores (2006) pelo menos alguns *Lactobacillus* mostraram um aumento

na resistência ao estresse. Esta resistência é demonstrada pelo aumento da recuperação de *Lactobacillus* vivos a partir de alimentos desidratados a vácuo e irradiados quando comparado com espécies de *Staphylococcus* e *Salmonella*.

Essa resistência pode ser mediada em parte pelo baixo conteúdo de ferro, um potente oxidante, acompanhado da acumulação de manganês, um potente antioxidante (MAKAROVA et al., 2006).

O ferro é um nutriente essencial para a maioria dos organismos, sendo utilizado como cofator de várias enzimas e como catalisador em processos de transporte de elétrons. Entretanto, na presença de oxigênio, o ferro é capaz de gerar radicais de oxigênio que podem danificar DNA, proteínas e lipídeos da membrana. A concentração intracelular de ferro livre é controlada, principalmente, por ferritinas, uma superfamília de proteínas que estoca ferro na sua forma oxidada, a qual não é tóxica para as células. Ferritinas presentes em mamíferos, bacterioferritinas e proteínas Dps pertencem a esta superfamília (ISHIKAWA et al., 2003).

Proteínas Dps foram identificadas em várias espécies bacterianas. Estas proteínas, ao contrário das bacterioferritinas, não foram completamente caracterizadas e são formadas por apenas 12 subunidades, sendo capazes de se ligarem a aproximadamente 500 átomos de ferro (BOZZI et al., 1997; PAPINUTTO et al., 2002).

O ferro é incorporado na cavidade central da proteína Dps pela oxidação de Fe_2^+ a Fe_3^+ pelo domínio ferroxidase encontrado entre as subunidades da proteína (ILARI et al., 2000, SMITH, 2004).

Estudos com vários organismos confirmaram que todas as ferritinas são utilizadas no estoque de ferro e na proteção contra a toxicidade deste. Além disso, foi demonstrado que Dps protege o DNA contra agentes oxidantes pela co-cristalização do DNA com a proteína (SMITH, 2004).

Em *Escherichia coli*, quando as células estão sob estresse oxidativo, a proteína Dps é expressa e se liga ao DNA sem aparente especificidade de sequência, formando complexos extremamente estáveis. Dps também protege o DNA devido a sua habilidade de anular a combinação tóxica de Fe_2^+ e H_2O_2 (GRANT et al., 1998; ZHAO et al., 2002).

Com relação ao controle da expressão, o gene *dps* está sujeito a um complexo sistema de regulação. A indução de Dps por H_2O_2 requer a presença de OxyR e da RNA polimerase holoenzima σ^{70} . Entretanto, na fase estacionária de crescimento, são requeridos o fator σ^s e o fator de integração do hospedeiro para expressão do mesmo (ALTUVIA et al., 1994)

Um homólogo a Dps, denominado MrgA, foi identificado e caracterizado em *Bacillus subtilis*, porém, o mecanismo de regulação do gene *mrgA* parece ser diferente do mecanismo encontrado para *dps* em *E. coli*. Ao contrário de *dps*, *mrgA* é negativamente regulado, e até o momento, nenhum fator sigma homólogo a σ^S foi encontrado entre as espécies de *Bacillus* (CHEN & HELMANN, 1995; CHEN et al. 1995).

Entre as bactérias lácticas, um homólogo a Dps, denominado Dpr, foi identificado e caracterizado em algumas espécies de *Streptococcus*, o qual parece ser indispensável para a tolerância destes microrganismos ao oxigênio (YAMAMOTO et al., 2000; YAMAMOTO et al., 2004).

Proteção adicional parece ser promovida por outros antioxidantes, incluindo glutathione e γ -glutamylcysteine. Várias espécies de *Lactobacillus* possuem uma glutathione sintetase bifuncional (GshAB) enquanto outras possuem apenas γ -glutamylcysteine sintetase (Gsh A). Entretanto, mesmo *Lactococcus* que não sintetiza glutathione demonstrou ser capaz de acumular este composto, aparentemente pelo transporte a partir do ambiente (LI, 2003).

Além da importância dos mecanismos de resistência ao estresse oxidativo para a sobrevivência de microrganismos probióticos em alimentos, estes também parecem ser importantes para a persistência destes microrganismos no trato gastrointestinal. Durante a passagem dos nutrientes pelo trato gastrointestinal espécies reativas de oxigênio são geradas tanto na mucosa quanto no lúmen, sendo, portanto fundamental que esses microrganismos sejam capazes de eliminar ou resistir à presença destes compostos (TANNOCK, 2004; VASILJEVIC & SHAH, 2008).

A aplicação do sistema IVET (*in vivo* expression technology) usando *L.reuteri* e camundongos *Lactobacillus-free* revelou a indução do gene *msrB*, que codifica uma sulfóxido metionina redutase durante o processo de colonização. Esta é uma enzima de reparo que protege a bactéria contra danos oxidativos causados por espécies reativas de nitrogênio ou intermediários de oxigênio. Pode-se inferir, portanto que a mesma é provavelmente importante para a atividade probiótica deste microrganismo (TANNOCK, 2004).

Nas últimas décadas intensificaram-se as pesquisas para caracterização genética de bactérias probióticas. A combinação dos avanços nas tecnologias genéticas com as informações sobre o genoma destas bactérias abre futuras possibilidades para o desenvolvimento de linhagens probióticas mais eficazes. Essas sofisticadas tecnologias não só facilitarão a compreensão dos mecanismos moleculares por meio dos quais as linhagens probióticas promovem efeitos benéficos no intestino humano, mas também permitirá o desenvolvimento de

novas funcionalidades em algumas linhagens probióticas, como a utilização destes microrganismos como vacinas recombinantes vivas. A adoção da manipulação genética para o melhoramento de culturas probióticas também possui potencial para ser utilizada para o aumento da viabilidade destas culturas quando expostas a ambientes estressantes, como aqueles encontrados durante o desenvolvimento de alimentos funcionais ou durante o trânsito gástrico (MATTILA-SANDHOLM et al. 2002).

Apesar de todo o conhecimento adquirido ao longo dos anos sobre os mecanismos de resistência ao estresse oxidativo em bactérias lácticas, a aplicação da genômica funcional será fundamental para se alcançar um maior conhecimento a cerca da regulação destes mecanismos (MIYOSHI et al., 2003)

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no laboratório de Microbiologia Industrial e Biotecnologia, localizado no Instituto de Biotecnologia Aplicada a Agropecuária – BIOAGRO, na Universidade Federal de Viçosa e no laboratório sob a coordenação do Dr. Hosni M. Hassan, (*Microbiology Department, North Carolina State University at Raleigh, NC, USA*).

3.1. Microrganismo

Lactobacillus delbrueckii UFV H2b20 foi isolado a partir de material fecal de crianças recém nascidas alimentadas exclusivamente com leite materno (SANTOS, 1984). Culturas estoque foram preparadas, congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -80°C em caldo MRS (Oxoid – Hampshire, Inglaterra), contendo 20% de glicerol.

3.2. Extração de DNA total

3.2.1. Preparo das células

As células congeladas de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 foram reativadas em leite desnatado reconstituído a 10% incubado a 37°C até que ocorresse sua coagulação. Em seguida, foi feita a transferência para caldo 3 ml de MRS contendo 2% de glicose, o qual foi incubado a 37°C por aproximadamente 12 horas. A partir desta foi feita uma nova transferência para 20 ml de MRS contendo 2% de glicose, o qual foi incubado conforme descrito anteriormente. Após o período de incubação as células foram coletadas por centrifugação a

7000g, a 4°C por 10 minutos em centrífuga Sorvall RT6000B. Os *pellets* obtidos foram lavados 2 vezes com Tris-HCl 20mM, pH 8.0.

3.2.2. Extração de DNA

Os DNAs das amostras foram extraídos utilizando *DNAeasy Tissue kit* (QIAGEN[®]), seguindo as recomendações do fabricante, ou segundo protocolo adaptado no laboratório de Microbiologia Industrial para bactérias lácticas (NEVES, 1998).

Os *pellets* obtidos, conforme descrito anteriormente, foram ressuspensos em 800 µl de TE (100 mM Tris-HCl, pH 8,0 e 1 mM EDTA), pH 8,0, em microtubos. As paredes das células foram hidrolisadas adicionando-se lisozima (Sigma[®]) e mutanolisina (Sigma[®]) na concentração de 40 µg/mL e 1 µg/mL, respectivamente, seguida de incubação em banho-maria a 37 °C por 1 hora. Após a incubação os microtubos foram centrifugados a 5000g por 10 minutos (Microcentrifuge – 12 Beckman). Os protoplastos foram ressuspensos em 800 µl de TE (100 mM Tris-HCl, pH 8,0 e 1 mM EDTA), pH 8,0. Foram adicionados 200 µl de SDS (duodecil sulfato de sódio) 10% e os microtubos incubados em banho-maria a 55 °C por 15 minutos para que ocorresse lise celular. Em seguida, RNase A foi adicionada a uma concentração final de 50 µg/mL e as amostras incubadas em banho-maria a 37°C, por 30 minutos. Adicionou-se também proteinase K (Sigma[®]) às amostras a uma concentração final de 100 µg/mL e o tempo de incubação foi de 15 minutos, a 55°C. O volume total foi dividido em 2 microtubos, sendo adicionado igual volume de fenol/clorofórmio. O conteúdo foi cuidadosamente homogeneizado e a solução aquosa separada por centrifugação (Microcentrifuge – 12 Beckman). A fase aquosa foi transferida para outro microtubo e a extração com fenol/clorofórmio foi realizada novamente. À fase aquosa obtida após a segunda extração com fenol/clorofórmio foi adicionado 1/10 volume de acetato de sódio 3M pH 5,2, sendo o DNA precipitado pela adição de 1 volume de isopropanol, seguida por incubação a -20 °C por 2 horas ou *overnight*. O DNA foi coletado por centrifugação a 12000g por 15 minutos, lavado com etanol 70% e ressuspensado em TE (Tris-HCl 10 mM e EDTA 1 mM, pH 8,0).

3.2.3. Quantificação de DNA

A quantificação dos DNAs foi estimada pela comparação das bandas com concentrações conhecidas de DNA de fago lambda, por eletroforese em gel de agarose 0,8% e/ou por leitura

em espectrofotômetro em comprimento de onda 260 nm. O DNA quantificado foi armazenado a 4°C ou a -20°C, até sua utilização.

3.3. Seleção dos genes a serem identificados e caracterizados em *L. delbrueckii* UFV H2b20.

Os genomas de duas linhagens de *L. delbrueckii*, *L. delbrueckii* ATCC 11842 (nº de acesso: NC_008054) e *L. delbrueckii* ATCC BAA-365 (nº de acesso: NC_008529), disponíveis no banco de dados do NCBI, bem como os das linhagens probióticas, *Lactobacillus plantarum* (nº de acesso: NC_004567), *Lactobacillus reuteri* (nº de acesso: NC_008529), *Lactobacillus gasseri* (nº de acesso: NC_008530), *Lactobacillus acidophilus* (nº de acesso: NC_006814), *Lactobacillus johnsonii* (nº de acesso: NC_005362) foram analisados e genes possivelmente envolvidos na resposta ao estresse oxidativo foram selecionados para estudo.

Desta forma, três genes foram selecionados para possível caracterização em *L. delbrueckii* UFV H2b20, *spx*, *pox* e *dps*.

O gene *spx* codifica um fator transcricional envolvido na resposta ao estresse oxidativo e é altamente conservado entre bactérias gram-positivas, sendo que a função do mesmo foi amplamente caracterizada em *Bacillus subtilis*. Desta forma, foram analisados em relação à presença e organização gênica de *spx* não apenas os genomas dos microrganismos citados anteriormente, bem como os genomas de *Listeria monocytogenes* (nº de acesso: NC_011660), *Listeria innocua* (nº de acesso: NC_003212), *Enterococcus faecalis* (nº de acesso: NC_004668.1), *Streptococcus pyogenes* (nº de acesso: NC_008022), *Streptococcus pneumoniae* (nº de acesso: NC_008533.1) e *Bacillus subtilis* (nº de acesso: NC_000964.2).

Para o gene *pox*, o qual codifica a enzima piruvato oxidase, além dos genomas das bactérias lácticas citados anteriormente, também foram analisados os genomas de *Bacillus subtilis* (nº de acesso: NC_000964.2), *Streptococcus pneumoniae* (nº de acesso: NC_008533.1) e *Listeria monocytogenes* (nº de acesso: NC_011660).

O terceiro gene selecionado para este estudo foi o gene *dps*, o qual codifica uma proteína que estoca ferro na sua forma oxidada. Este gene foi selecionado devido a sua presença no genoma de linhagens probióticas como *Lactobacillus plantarum* (NC_004567.1), *Lactobacillus rhamnosus* (AF037091), *L. reuteri* (NC_009513.1), *Lactobacillus gasseri* (NC_008530.1), *Lactobacillus acidophilus* (NC_006814), *Lactobacillus johnsonii* (NC_005362), *Lactobacillus helveticus* (NC_010080.1), *Lactobacillus fermentum* (NC_010610.1), *Lactobacillus sakei*

(NC_007576.1) e *Lactococcus lactis* (NC_002662.1). Embora este gene não esteja presente nos genomas de *L. delbrueckii* ATCC 11842 e *L. delbrueckii* ATCC BAA-365, um fragmento de 426 pares de base contendo parte do mesmo foi identificado em *L. delbrueckii lactis* e disponibilizado no banco de dados do NCBI (AF496234). Além disso, genes homólogos a *dps* foram identificados e caracterizados em outros microrganismos gram-positivos como *Streptococcus mutans* (NC_004350.1), *Streptococcus suis* (NC_009442.1), *Listeria monocytogenes* (nº de acesso: NC_011660) e *Listeria innocua* (nº de acesso: NC_003212), sendo o mesmo importante para a sobrevivência desses microrganismos em condições de estresse oxidativo (YAMAMOTO et al., 2000; YANG et al., 2000; ILARI et al., 2000; YAMAMOTO et al., 2002; KAUKO et al., 2004; OLSEN et al., 2005). Desta forma, esses microrganismos também foram utilizados como referência para este estudo.

3.4 Detecção dos genes *spx*, *ptsI*, *mecA* de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20

3.4.1. Construção dos primers

Os primers (MWG[®] ou IDT[®]) abaixo foram construídos com base nas sequências disponíveis no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), nos genomas de: *Lactobacillus delbrueckii* ATCC 11842 e *Lactobacillus delbrueckii* ATCC BAA-365. Uma sequência de 3164 pares de bases contendo os genes *ptsI*, *spx* e *mecA* foi utilizada como referência para construção dos primers SPX 1443, SPX 2575, SPX 2178, PTS1F, PTS1R, MECAF, MECAR (tabela 2).

Inicialmente foram construídos os primers SPX 1443, SPX 2575 e SPX 2178, com os quais foi detectada a presença do gene *spx* no genoma de *L. delbrueckii* UFV H2b20, bem como identificados os genes *ptsI* e *mecA*, os quais estão localizados no mesmo operon que *spx*. Os produtos de PCR foram purificados e seqüenciados.

As sequências obtidas apresentaram alta identidade (99%) com as sequências de *Lactobacillus delbrueckii* ATCC 11842 e *Lactobacillus delbrueckii* ATCC BAA-365. Desta forma, os primers PTS1F, PTS1R, MECAF, MECAR foram construídos com base nas sequências dos genes *ptsI* e *mecA* destes microrganismos.

Assim, com o objetivo de se obter a maior sequência possível do operon *ptsI-spx-mecA*, algumas combinações de primers foram utilizadas para amplificação do mesmo, conforme listado na tabela 3.

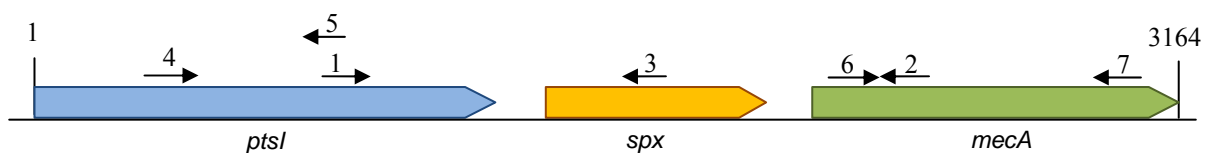
	<i>Primers</i>	Sequência
1	SPX 1443	5'-GTCAGTTCTCCGCCTCATC-3'
2	SPX 2575	5'-AAGTCATTGTCCTCGTCCACT-3'
3	SPX 2178	5'-CTCAGCAGGCTTGGGTTCTTT-3'
4	PTS1F	5'-AAGGCTGAATGGCGGAAG-3'
5	PTS1R	5'-CGGAGAACTGACGGGTTG-3'
6	MECAF	5'-CTTGGACTTACTCGGCAACC-3'
7	MECAR	5'- CTGCTGGAAGAGGCACTG-3'

Tabela 2- *Primers* utilizados para a amplificação dos genes *spx*, *ptsI* e *mecA*

Combinação de <i>Primers</i>	Condições para reação de PCR
1+2	1 ciclo de 94 °C por 3min
1+3	30 ciclos de 94 °C por 30s, 47°C por 1 min, 72 °C por 1 min 1 ciclo de 72 °C por 10 min
4+5	1 ciclo de 94 °C por 3min 30 ciclos de 94 °C por 30s, 54°C por 1 min, 72 °C por 1 min 1 ciclo de 72 °C por 10 min
6+7	1 ciclo de 94 °C por 3min 30 ciclos de 94 °C por 30s, 52°C por 1 min, 72 °C por 1 min 1 ciclo de 72 °C por 10 min

Tabela 3 – Combinações de *primers* utilizadas para amplificação dos genes *spx*, *ptsI* e *mecA*

A posição de anelamento dos *primers* está representada no esquema abaixo:



3.4.2. Reações de Amplificação

Reações de amplificação foram conduzidas, em volume total de 25 µL, contendo: tampão Gotaq Green (Promega[®]); 0,1 mM de cada deoxirribonucleotídeo (dNTP); 0,4 µM de cada *primer*; 25 ng de DNA de *L. delbrueckii* UFV H2b20 e 1,0 U de Taq DNA polimerase (Promega[®]). Foi utilizado termociclador Bio-Rad 96-well iClicer (Bio-Rad, Hercules, CA) programado conforme descrito na tabela 3. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,2% contendo brometo de etídeo (0,5 µg /mL).

3.5. Detecção do gene *pox* em *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20

3.5.1. Construção dos primers

Os *primers* (MWG[®] ou IDT[®]) foram construídos com base na sequência do genoma de *Lactobacillus delbrueckii* ATCC 11842 e *Lactobacillus delbrueckii* ATCC BAA-365, disponível no banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e estão descritos na tabela 4. Os nucleotídeos destacados nos primers POXHISF, POX1R e POXHISR correspondem a sítios de restrição (NdeI, BamHI e BamHI, respectivamente) adicionados para clonagem do gene em vetor pET16B. Os primers POXRTF e POXRTR também foram utilizados nas reações de PCR em tempo real.

	<i>Primers</i>	Sequência
1	POXHISF	5'-AGACAAC <u>CATATG</u> GCAAAAATTAAGGGCG-3'
2	POX1R	5'- AAAT <u>GGATCCT</u> TAGTAAAGAAGCAC -3'
3	POXHISR	5'-AAT <u>GGATCCT</u> TAGTAAAGAAGCACCTGAAC -3'
4	POXRTR	5'-CAAGCTCTTCTTAGCGTCT-3'
5	POXRTF	5'-CTGGTAGTTTGGGTTGGT-3'

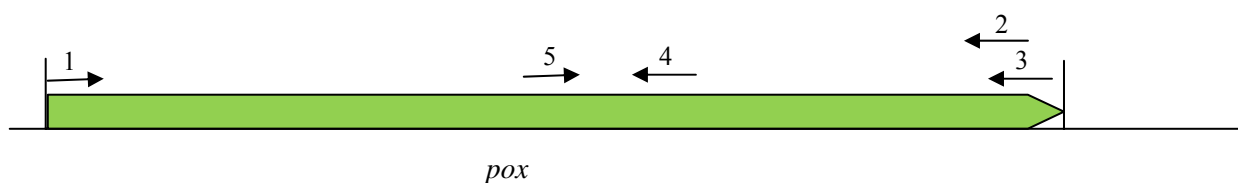
Tabela 4 – *Primers* utilizados para amplificação do gene *pox*

As combinações de *primers* presentes na tabela 5 foram utilizadas para amplificação do gene *pox*, com o objetivo de se obter a sequência completa do mesmo.

Combinação de <i>Primers</i>	Condições para reação de PCR
1+3	1 ciclo de 94 °C por 3min 30 ciclos de 94 °C por 30s, 56°C por 1 min, 72 °C por 2 min 1 ciclo de 72 °C por 10 min
2+5	1 ciclo de 94 °C por 3min 30 ciclos de 94 °C por 30s, 48°C por 1 min, 72 °C por 1 min 1 ciclo de 72 °C por 10 min
3+5	1 ciclo de 94 °C por 3min 30 ciclos de 94 °C por 30s, 53°C por 1 min, 72 °C por 1 min 1 ciclo de 72 °C por 10 min

Tabela 5 – Combinações de *primers* utilizadas para amplificação do gene *pox*.

A posição de anelamento dos *primers* está representada no esquema abaixo:



3.5.2 Reações de Amplificação

Reações de amplificação em cadeia (PCR) foram conduzidas conforme descrito anteriormente no item 3.4.2. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,2% contendo brometo de etídeo (0,5 µg/ ml).

3.6. Detecção do gene *dps* em *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20

3.6.1. Construção dos *primers*

Inicialmente, os *primers* (IDT[®]) DPS1, DPS2, DPS548 e DPSend foram construídos com base na sequência do fragmento de um gene homólogo a *dps* presente em *Lactobacillus delbrueckii lactis*, de acordo com dados disponíveis no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Os produtos de PCR obtidos foram purificados e sequenciados. As sequências obtidas apresentaram alta identidade (99%) com a sequência do gene *dps* de *Lactobacillus plantarum* WCFS1 (acesso). Desta forma, os demais *primers* (DPS3, DPS4, DPS517) foram construídos com base no genoma desse microrganismo, a fim de se obter a sequência completa do gene *dps* de *L. delbrueckii* UFV H2b20.

<i>Primers</i>		Sequência
1	DPS1	5'-CTACCCATAAGCCTACCGA-3'
2	DPS2	5'-GACCTTTACCAATACGGCA-3'
3	DPS3	5'-GTTGCCGATTTGAGCCAG-3'
4	DPS4	5'-GAAATACACGAAAACCAAAGCA -3'
5	DPSend	5'-TGCCGTAGTATCCGTGTCA-3'
6	DPS517	5'-CTACCATAAGCCTACCCATAA-3'
7	DPS548	5'- ATATTCAAATGGGGCGTTC-3'

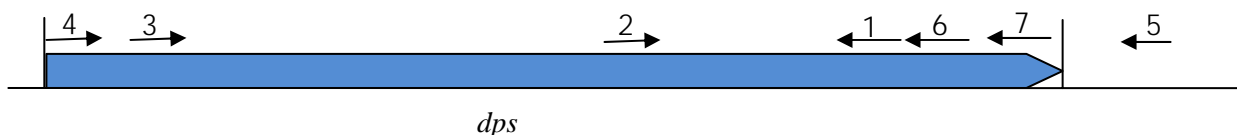
Tabela 6 – *Primers* utilizados para amplificação do gene *dps*

Várias combinações de *primers* foram utilizadas para amplificação do gene *dps*, com o objetivo de se obter a sequência completa do mesmo conforme listado na tabela 7.

Combinação de <i>Primers</i>	Condições para reação de PCR
1+2	1 ciclo de 94 °C por 3min
1+3	30 ciclos de 94 °C por 30s, 53°C por 1 min, 72 °C por 1 min
2+5	1 ciclo de 72 °C por 10 min
3+6	1 ciclo de 94 °C por 3min
4+5	30 ciclos de 94 °C por 30s, 48°C por 1 min, 72 °C por 1 min
4+6	1 ciclo de 72 °C por 10 min
4+7	

Tabela 7 – combinações de *primers* utilizadas para amplificação do gene *dps*.

A posição de anelamento dos *primers* está representada no esquema abaixo:



3.6.2 Reações de Amplificação

Reações de amplificação em cadeia (PCR) foram conduzidas conforme descrito anteriormente no item 3.4.2. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,2% contendo brometo de etídeo (0,5 µg /mL).

3.7. Detecção de gene homólogo a *sigA* em *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20

O gene homólogo a *sigA*, Ldb1245, foi utilizado por PENAUD et al. (2006) como gene controle ou de referência para análise da expressão de uma CPX-ATPase por PCR em tempo real em *L. delbrueckii* ATCC 11842. A expressão deste gene foi avaliada em condições de estresse ácido e o mesmo escolhido como controle após a verificação que a expressão do mesmo não foi significativamente afetada em tais condições.

Desta forma, este gene foi detectado em *L. delbrueckii* UFV H2b20 e sua expressão avaliada nas condições testadas nesse trabalho, a fim de se utilizar o mesmo como gene de referência nos ensaios de PCR em tempo real.

3.7.1. Construção dos *primers*

Os *primers* (MWG[®] ou IDT[®]) RPOD124 e RPOD1128 (Tabela 8) foram construídos com base na sequência do gene Ldb1245 presente no genoma de *Lactobacillus delbrueckii* ATCC 11842 disponível no banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). O gene Ldb1245 é um gene homólogo a *sigA*, o qual codifica um fator sigma.

	<i>Primers</i>	Sequência
1	RPODF124	5'-CTGCCGTATGGTCTGAATGA-3'
2	RPODR1128	5'-TGAGAAGTAGTCCTGGAGCA-3'

Tabela 8 – *Primers* utilizados para amplificação do gene homólogo a *sigA*

3.7.2. Reação de Amplificação

Reações de amplificação foram conduzidas, em volume total de 25 µL, contendo: tampão Gotaq Green (Promega[®]); 0,1 mM de cada deoxinucleosídeo trifosfatado; 0,4 µM de oligonucleotídeos iniciadores; 25 ng de DNA de *L. delbrueckii* UFV H2b20 e 1,0 U de Taq DNA polimerase (Promega[®]). Foi utilizado termociclador Bio-Rad 96-well iClicer (Bio-Rad,

Hercules, CA) programado conforme descrito na tabela acima. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,2% contendo brometo de etídeo ($0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$).

3.8. Seqüenciamento e análise das sequências

Os produtos de PCR obtidos foram extraídos de gel de agarose utilizando *QIAQUICK Gel extraction kit* (QIAGEN[®]) de acordo com as recomendações do fabricante e enviados para seqüenciamento (MWG-BIOTECH Inc., High Point, NC ou Laboratório de Genômica, UFV) ou clonados em pGEM-Teasy anteriormente ao seqüenciamento (Laboratório de Genômica, UFV).

As sequências foram analisadas pelo programa BLAST, disponível no banco de dados NCBI, pela homologia com outros genes presentes em bancos de dados disponíveis e alinhadas utilizando-se o programa ClustalW2 disponível online no site do *European Bioinformatics Institute* (<<http://www.ebi.ac.uk>>).

As sequências dos genes analisados foram capturadas no site do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>).

3.9. PCR Inversa

A fim de se obter a sequência promotora do gene *dps* utilizou-se a técnica de PCR inversa (HARTL & OCHMAN, 1994).

O DNA de *L. delbrueckii* UFV H2b20 foi digerido com a enzima MspI (C[▼]CG_▲G) a 37°C por 12 horas. Após o período de incubação, a enzima foi inativada em banho-maria a 70°C por 15 min. Uma alíquota do DNA (2 a 4 μl na concentração de 100 ng/ μl) foi então utilizada para reação de ligação. A reação de ligação foi conduzida em volume total de 40 μl contendo: Tampão de ligação 1X (Promega[®]), 2 U de DNA ligase (Promega[®]) e DNA (5-10 ng/ μl). A reação foi incubada a 4°C por 16 horas e uma alíquota da mesma foi utilizada para a reação de PCR.

A reação de amplificação foi conduzida, em volume total de 25 μL , contendo: tampão GoTaq Green (Promega[®]); 0,1 mM de dNTP; 0,4 μM de cada *primer*; 25 ng de DNA de *L. delbrueckii* UFV H2b20 e 1,0 U de GoTaq DNA polimerase (Promega[®]). Foi utilizado termociclador TC-512 (TECHNE, Staffordshire, UK) programado para 1 ciclo de 3 minutos a 94°C; 35 ciclos de

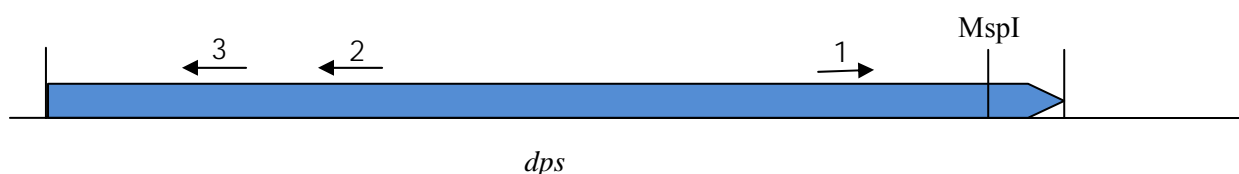
30 segundos a 94°C; 1 minuto a 56°C e 2 minutos a 72°C. Após o último ciclo, uma etapa de 10 minutos a 72°C. Os produtos da amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,2% contendo brometo de etídeo (0,5 µg mL⁻¹), extraídos do gel utilizando *PureLink™ Quick Gel Extraction kit* (Invitrogen®) e enviados para seqüenciamento (Laboratório de Genômica – UFV).

Os *primers* utilizados na reação de PCR estão listados na tabela 9.

	<i>Primers</i>	Sequência
1	INVPCRRIG	5'-AGCCAAGAACCAGGAAAC-3'
2	DPSUNE1	5'-GTCAGGAACTCACCCATC-3'
3	DPSUNE2	5'-GAAGAAGGCACGGAAGAA-3'

Tabela 9 – *Primers* utilizados para reação de PCR inversa

A posição de anelamento dos *primers* está representada no esquema abaixo:



3.10. Análise filogenética

Os genes que apresentaram maior porcentagem de identidade com o DNA seqüenciado foram analisados com o auxílio do programa MEGA4 (TAMURA et al., 2007). Árvores filogenéticas foram reconstruídas pelos métodos da Máxima Parcimônia e de *Neighbor-Joining*, utilizando o método de dois parâmetros de Kimura (ECK e DAYHOFF, 1966).

3.11. Análise da expressão dos gene *spx*, *dps* e *pox* por PCR em tempo real

3.11.1. Condições de cultivo: transferência da condição de anaerobiose para aerobiose

Uma alíquota do estoque da cultura contendo *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 foi ativada em 10 ml de caldo MRS (2% de glicose) e incubado em câmara de anaerobiose (Coy Laboratory Products, Grass Lake, MI, USA) contendo 85% de N₂, 10% de CO₂ e 5% de H₂, a 37°C por 12 horas. Após este período, a pureza da cultura foi determinada por coloração de Gram. Além disso, também foram feitas estrias compostas em ágar MRS (2% de glicose) e incubadas por 24 horas a 37°C, sob as condições descritas anteriormente.

Uma alíquota dessa cultura foi, então, inoculada em 40 ml de MRS (2% de glicose) de modo a se obter uma densidade óptica de 0.04, a qual foi determinada por medidas de densidade óptica em espectrofotômetro (*SmartSpec Plus Spectrophotometer, Bio-rad, Hercules, CA, USA*), com comprimento de onda de 600 nm e incubado sob as condições descritas anteriormente. O crescimento também foi acompanhado por espectrofotometria, em comprimento de onda de 600 nm, até atingir uma densidade óptica de aproximadamente 0.5. Ao atingir a densidade ótica desejada a cultura foi diluída em 400 ml de caldo MRS (2% de glicose) para uma densidade ótica de aproximadamente 0.04, quando então se iniciou o experimento para coleta das amostras para extração de RNA. O crescimento foi novamente acompanhado por medidas de densidade ótica em espectrofotômetro, com comprimento de onda de 600 nm e o atingir densidade ótica de aproximadamente 0.25, uma amostra foi retirada (T0) para extração de RNA. A cultura foi então separada em 3 partes iguais: Uma das partes foi mantida em anaerobiose e as outras foram transferidas para agitador rotatório (*Innova 4000 Benchtop Incubator Shaker, Artisan Scientific, IL, USA*) (130 rpm/37°C), sendo adicionado a uma delas 20U de catalase. A partir do T0 amostras para a extração de RNA foram coletadas a cada geração até atingirem o início da fase estacionária. Amostras foram coletadas apenas das culturas mantidas em anaerobiose e em aerobiose ambas sem catalase.

Para cada amostra coletada, o mesmo volume de uma solução de 25 mM citrato de sódio, 10 mM EDTA, 10 M sulfato de amônio, pH 5.2, foi adicionado para preservação do RNA (CLARKE & AMARAL, 2003). As amostras foram então mantidas em temperatura ambiente por aproximadamente 20 minutos ou a 4°C por até 12 horas e então centrifugadas. Os pellets foram mantidos a -80°C para posterior extração de RNA.

Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata e em caldo MRS contendo 2% de glicose.

3.11.2. Condições de cultivo: transferência da condição de aerobiose para anaerobiose

Uma alíquota do estoque da cultura contendo *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 foi ativada em 10 ml de caldo MRS (2% de glicose) e incubada por 12 horas a 37°C sob condições de microaerofilia. Após este período, a pureza da cultura foi determinada por coloração de Gram. Além disso, também foram feitas estrias compostas em ágar MRS (2% de glicose) e incubadas por 24 horas a 37°C, sob as condições descritas anteriormente.

Uma alíquota dessa cultura foi, então, inoculada em 40 ml de MRS (2% de glicose) de modo a se obter uma densidade óptica de 0.04, a qual foi determinada por medidas de densidade óptica em espectrofotômetro (*SmartSpec Plus Spectrophotometer, Bio-rad, Hercules, CA, USA*), com comprimento de onda de 600 nm, e incubada a 37°C sob condições de microaerofilia. O crescimento também foi acompanhado por espectrofotometria, em comprimento de onda de 600 nm, até atingir uma densidade ótica de aproximadamente 0.5. Ao atingir a densidade ótica desejada a cultura foi diluída em 400 ml de caldo MRS (2% de glicose) para uma densidade ótica de aproximadamente 0.04 e transferida para agitador rotatório (130 rpm/37°C), quando então se iniciou o experimento para coleta das amostras para extração de RNA. O crescimento foi novamente acompanhado por medidas de densidade ótica em espectrofotômetro, com comprimento de onda de 600 nm e o atingir densidade ótica de aproximadamente 0.25, uma amostra foi retirada (T0) para extração de RNA.

A cultura foi, então, separada em 4 partes iguais: Duas partes foram mantidas em agitador rotatório (*Innova 4000 Benchtop Incubator Shaker, Artisan Scientific, IL, USA*) (130 rpm/37°C), sendo adicionada a uma delas 20 U de catalase. As demais partes foram transferidas para câmara de anaerobiose (*Coy Laboratory Products, Grass Lake, MI, USA*) contendo 85% de N₂, 10% de CO₂ e 5% de H₂, a 37°C, sendo que a uma delas também foi adicionado 20 U de catalase. A partir do T0 amostras para a extração de RNA foram coletadas a cada geração até que a cultura atingisse o início da fase estacionária. Amostras foram coletadas apenas das culturas mantidas em anaerobiose e em aerobiose, ambas sem catalase.

Para cada amostra coletada, o mesmo volume de uma solução de 25 mM citrato de sódio, 10 mM EDTA, 10 M sulfato de amônio, pH 5.2, foi adicionado para preservação do

RNA (CLARKE & AMARAL, 2003). As amostras foram então mantidas em temperatura ambiente por aproximadamente 20 minutos ou a 4°C por até 12 horas e então centrifugadas. Os pellets foram mantidos a -80°C para posterior extração de RNA.

Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata e em caldo MRS contendo 2% de glicose.

3.11.3. Condições de cultivo: efeito da concentração de glicose sob a expressão do gene *pox* de *L. delbrueckii* UFV H2b20

Para análise da expressão do gene *pox*, *L. delbrueckii* UFV H2b20 também foi cultivado nas mesmas condições descritas nos itens 3.10.1 e 3.10.2, porém em MRS contendo 0,2% de glicose.

3.11.4. Condições de cultivo: efeito da concentração de peróxido de hidrogênio sob a expressão do gene *dps* de *L. delbrueckii* UFV H2b20

Para análise da expressão do gene *dps*, uma alíquota do estoque da cultura contendo *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 foi ativada em 10 ml de caldo MRS (2% de glicose) e incubado em câmara de anaerobiose (*Coy Laboratory Products, Grass Lake, MI, USA*) contendo 85% de N₂, 10% de CO₂ e 5% de H₂, a 37°C por 12 horas. Após este período, a pureza da cultura foi determinada por coloração de Gram. Além disso, também foram feitas estrias compostas em ágar MRS (2% de glicose) e incubadas por 24 horas a 37°C, sob as condições descritas anteriormente.

Uma alíquota dessa cultura foi, então, inoculada em 40 ml de MRS (2% de glicose) de modo a se obter uma densidade óptica de 0.04, a qual foi determinada por medidas de densidade óptica em espectrofotômetro (*SmartSpec Plus Spectrophotometer, Bio-rad, Hercules, CA, USA*), com comprimento de onda de 600 nm, e incubada a 37°C sob condições de microaerofilia. O crescimento também foi acompanhado por espectrofotometria, em comprimento de onda de 600 nm, até atingir uma densidade óptica de aproximadamente 0.4. Ao atingir a densidade óptica desejada, peróxido de hidrogênio foi adicionado a cultura de modo a obter as concentrações finais de 0,1 mM, 0,2 mM e 0,4 mM. Amostras foram retiradas logo antes da adição do peróxido (T0), 30 minutos e 60 minutos após. A uma das culturas peróxido de hidrogênio não

foi adicionado, sendo esta utilizada como condição controle. O experimento foi conduzido em triplicata para cada uma das concentrações de peróxido de hidrogênio utilizada.

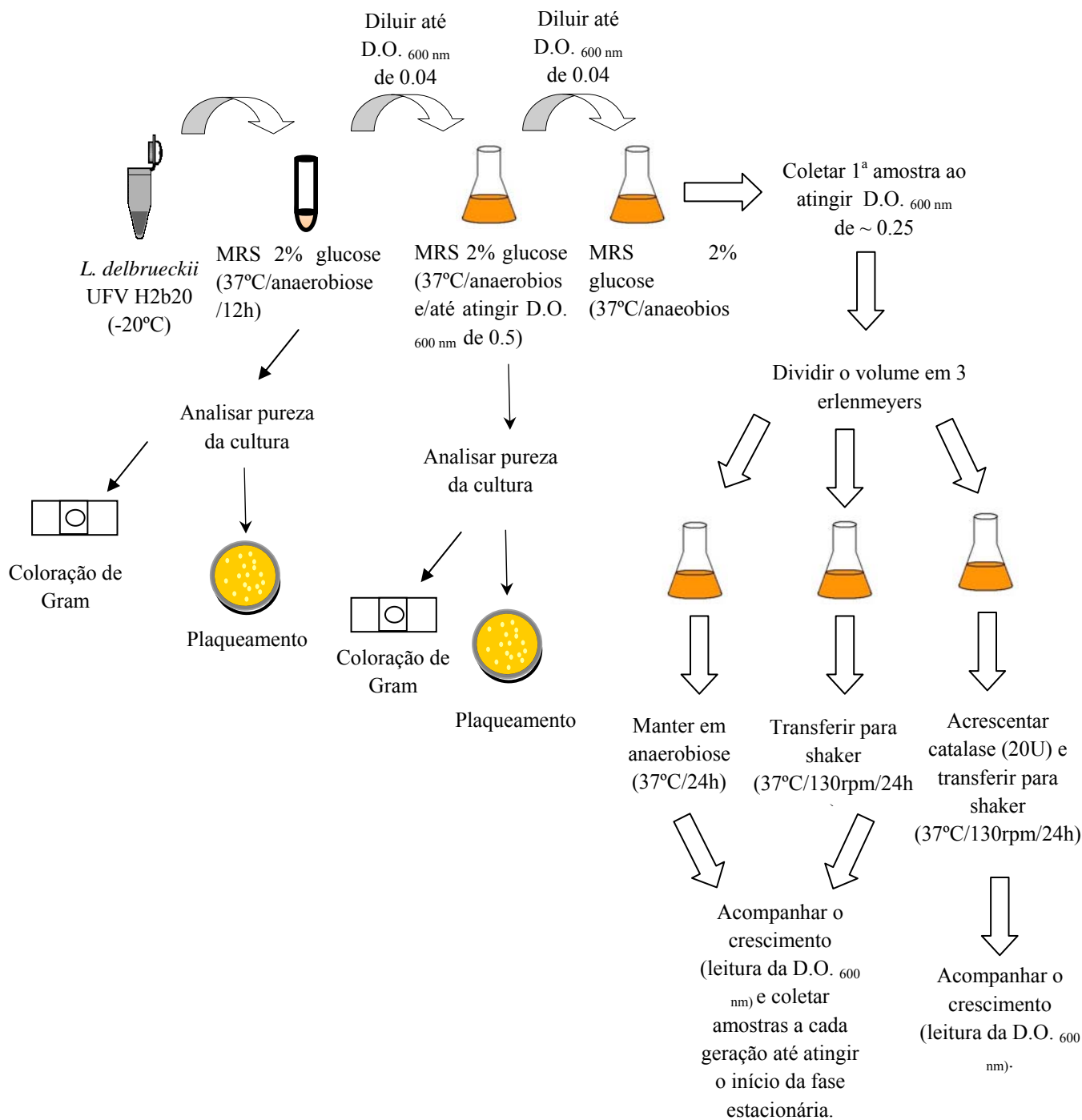


Figura 2 – Condições de cultivo para análise da expressão dos genes *spx*, *pox* e *dps* de *L. delbrueckii* UFV H2b20: transferência da condição de anaerobiose para aerobiose.

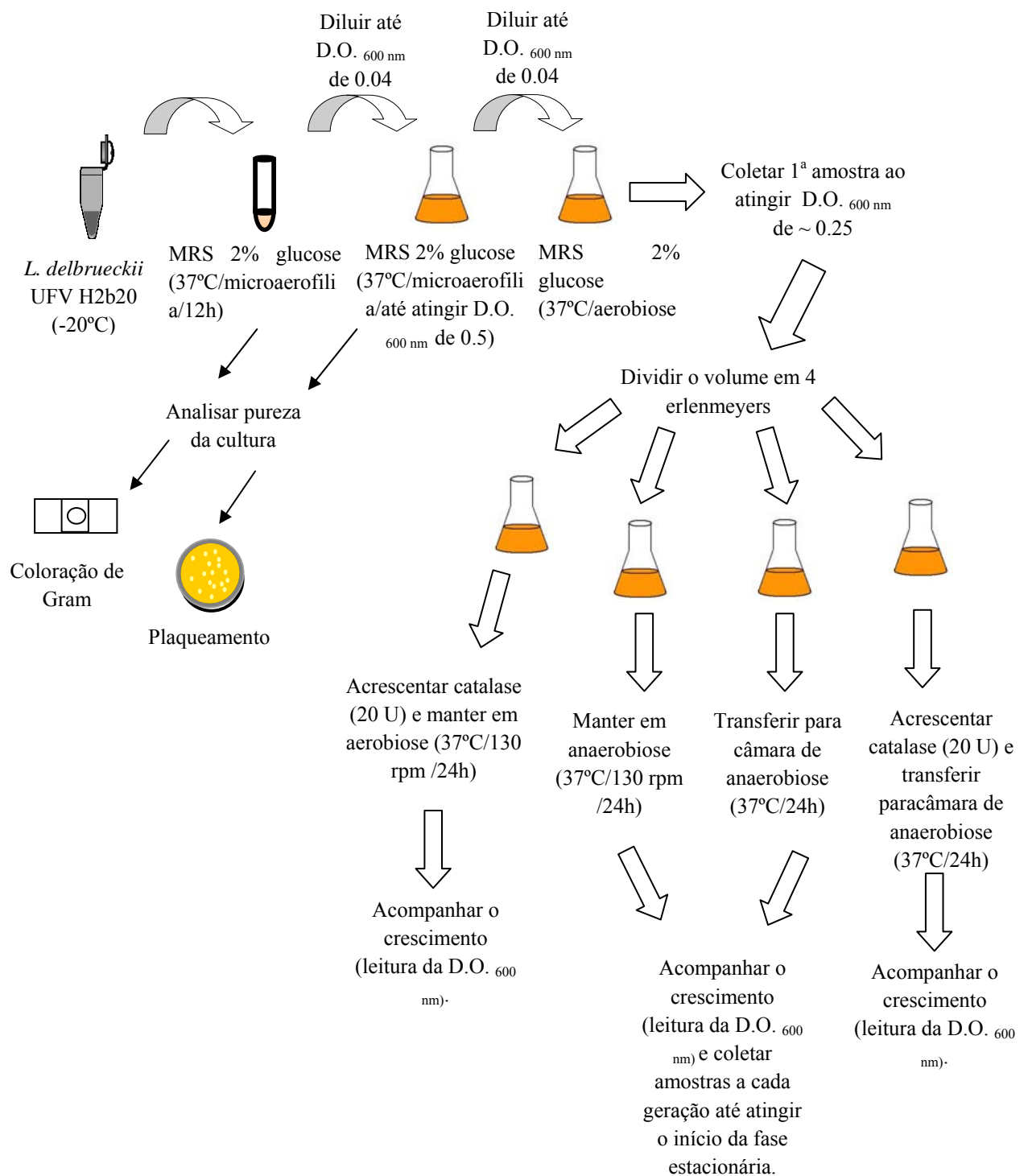


Figura 3 – Condições de cultivo para análise da expressão dos genes *spx*, *pox* e *dps* de *L. delbrueckii* UFV H2b20: transferência da condição de aerobiose para anaerobiose.

3.11.5. Extração de RNA

As amostras mantidas a -80 °C, foram descongeladas, lavadas 2 vezes em tampão fosfato e ressuspensas em Trizol (Invitrogen®). As células foram então rompidas utilizando 0.2 mm *silica beads* (BioSpec, Inc., Bartlesville, OK) em um *Mini-BeadBeater-8* (BioSpec, Inc., Bartlesville, OK) por 40 segundos, seguido de intervalo de 1 minuto em banho de gelo. Estes ciclos foram repetidos 4 vezes.

As amostras foram então centrifugadas e a extração do RNA foi feita de acordo com as instruções do fabricante para utilização do Trizol (Invitrogen®).

O RNA obtido foi submetido a 2 tratamentos com DNase (Promega®), segundo instruções do fabricante.

A pureza e quantificação do mesmo foi determinada utilizando-se o aparelho *NanoDrop ND1000*.

3.11.6. PCR em Tempo Real

Para realização do PCR em Tempo Real foi utilizado *kit QuantiTect SYBR Green RT-PCR* (QIAGEN®) segundo recomendações do fabricante para *one-step reactions*. Foram utilizadas placas de 96 poços com 20 µl de reação/cada, contendo 40 ng de RNA e 0,2 µM de cada *primer*. Os *primers* utilizados estão listados na tabela 9.

O procedimento foi realizado utilizando aparelho *iCycler iQ Real-Time PCR Detection System* (Bio-Rad, Hercules, CA). As condições utilizadas foram: 50 minutos a 50°C para a reação de transcriptase reversa, 15 minutos a 95°C para ativação da DNA polimerase (*hot-start*) e 35 ciclos a 95°C por 15 segundos, 51°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos. Após os 35 ciclos de amplificação todas as amostras foram submetidas a análise da curva de dissociação, a fim de validar a ausência de produtos não específicos e dímeros de primers. As amostras foram aquecidas com incremento de 1°C por 30 segundos, partindo de 60°C até atingir 94°C.

O gene homólogo a *sigA* detectado em *L. delbrueckii* UFV H2b20 foi escolhido como gene de referência para normalização dos resultados após a verificação de que a expressão do mesmo não foi significativamente afetada nas condições testadas.

Os dados de expressão gênica foram anotados como valores de Ct (*cycle threshold*). O valor de Ct refere-se ao número de ciclos de PCR no qual o sinal de fluorescência é detectado e está acima do valor limiar da curva de amplificação (BUSTIN, 2000). Valores de Ct são

representativos do número de cópias de moléculas de RNA e serve como base para comparação entre amostras. O Ct é específico para cada amostra e é inversamente proporcional a quantidade inicial do alvo presente na reação.

A eficiência da reação para cada par de *primers* foi determinada pela construção de uma curva padrão para cada gene em que diluições seriadas de DNA (0.1, 1, 2, 5, 10, 20, 50 e 100 ng de DNA) foram plotadas contra seus respectivos valores de Ct. A inclinação da reta foi calculada por regressão linear simples e posteriormente calculado o coeficiente de correlação de Pearson. O valor de inclinação da reta foi empregado na fórmula $E = 10^{(-1/\text{inclinação da reta})}$ em que E é a eficiência da reação. A quantificação relativa foi baseada no método descrito por PFAFFL (2001), que utiliza a seguinte fórmula:

$$\text{Quantidade relativa} = \frac{(E_{\text{alvo}})^{\Delta\text{CT}_{\text{alvo}}}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta\text{CT}_{\text{ref}}}}$$

Em que:

E_{alvo} = eficiência da reação de PCR dos genes alvos (*spx*, *pox*, *dps*)

E_{ref} = eficiência da reação de PCR do gene controle (homólogo de *sigA*)

ΔCT = Ct controle – Ct amostra

Os resultados foram analisados utilizando-se o *software* REST © (*Relative Expression Software Tool*), versão REST-MCS (PFAFFL et al., 2002), disponível em <http://www.wzw.tum.de/gene-quantification> que utiliza o modelo *Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test* para comparar a diferença de expressão entre os tratamentos. Este modelo tem a vantagem de não assumir nenhum tipo de distribuição e de se adequar a dados cuja variância pode ser grande, quando não é possível a aplicação de testes paramétricos.

O *software* REST © foi desenvolvido com base em testes de permutação, que consideram os resultados obtidos a partir de permutações aleatórias dos dados do experimento. No presente trabalho foram consideradas 2000 permutações, o que é suficiente para obtenção de boa estimativa do valor de p (erro-padrão da média ou EP < 0,005 quando p = 0,05).

<i>Primers</i>	<i>Sequência</i>
Ldb1245F	5'-AGCCAAGAACCAGGAAAC-3'
Ldb1245R	5'-GTCAGGAACTCACCCATC-3'
SpxRTF	5'-GAAGAAGGCACGGAAGAA-3'
SpxRTR	5'-GGCGGTCATCCAAAATAAT-3'
DPSRTF	5'-GAAGAAGGCACGGAAGAA-3'
DPSRTR	5'-GGCGGTCATCCAAAATAAT-3'
POXRTF	5'- CTGGTAGTTTGGGTTGGT-3'
POXRTR	5'- CAAGCTCTTCTTAGCGTCT-3'

Tabela 9 – *Primers* utilizados nas reações de PCR em tempo real

A análise da expressão dos genes foi feita comparando-se o resultado obtido a partir das amostras controles e testes em relação ao T0.

Para o experimento em que peróxido de hidrogênio foi adicionado a cultura, a análise foi feita comparando-se o resultado obtido para a condição teste (adição de peróxido) em relação à condição controle (sem adição de peróxido) nos respectivos tempos analisados.

3.12. Avaliação da atividade da enzima piruvato oxidase em *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20

Lactobacillus delbrueckii UFV H2b20 foi crescido em MRS contendo 2% e 0,2% de glicose e também em MRS contendo 2% e 0,2% de galactose em condições de aerobiose (130 rpm) e anaerobiose.

Amostras foram coletadas durante a fase de crescimento exponencial bem como durante a fase estacionária. As amostras foram centrifugadas, lavadas com tampão fosfato de potássio e rompidas utilizando 0.1 mm *silica beads* (BioSpec, Inc., Bartlesville, OK) em um *BeadBeater-8* (BioSpec, Inc., Bartlesville, OK) por 40 segundos, seguido de intervalo de 1 minuto em banho de gelo. Estes ciclos foram repetidos 4 vezes. As amostras foram então centrifugadas para obtenção do extrato livre de células e o método de Bradford foi utilizado para quantificação das proteínas.

A determinação da atividade da enzima piruvato oxidase foi feita utilizando o método de LORQUET et al. (2004).

Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização das Sequências e Análise Filogenética dos genes *spx*, *dps* e *pox*

4.1.1 Sequência nucleotídica e organização gênica parcial do operon que codifica o gene *spx* de *L. delbrueckii* UFV H2b20

A estratégia para a obtenção da sequência do gene *spx* e caracterização do operon que codifica este gene resultou em quatro fragmentos que apresentavam em alguns pontos sobreposição de sequências, os quais foram amplificados e seqüenciados. A partir da análise das sequências destes fragmentos, obteve-se uma sequência final de 2354 pares de base que possui 98% de identidade com as sequências de *L. delbrueckii bulgaricus* ATCC 11842 e *L. delbrueckii bulgaricus* ATCC BAA-365 (Figura 4).

A organização gênica na região do gene *spx* também é conservada na maioria das bactérias gram-positivas de baixo conteúdo G+C, em que *spx* está fortemente ligado ao gene *mecA*, o qual codifica o regulador negativo de competência em *B.subtilis*. Estudos recentes mostram que Spx afeta a atividade de MecA/ClpCP, uma indicação de possível relacionamento entre MecA e Spx (NAKANO et al., 2001; NAKANO et al., 2002; ZUBER, 2004).

A organização gênica do operon que codifica *spx* em *L. delbrueckii* UFV H2b20 foi determinada por seqüenciamento e está representada na figura 5. A figura 5 apresenta também a organização desse operon em diferentes espécies de bactérias gram-positivas, de acordo com as sequências disponíveis no banco de dados do NCBI. De acordo com os resultados de seqüenciamento, a organização gênica desse operon em *L. delbrueckii* UFV H2b20 se assemelha a de espécies como *L. gasseri*, *L. acidophilus* e *L. johnsonii*, bem como de outras estirpes de *L. delbrueckii*, sendo o mesmo localizado entre os genes *ptsI* e *mecA*. Além da presença do gene *mecA*, conforme descrito anteriormente, observa-se que dentre algumas espécies de *Lactobacillus*, os genes *ptsH* e *ptsI* encontram-se anteriores ao gene *spx*.


```

1  GCTGAATGGCGGAAGTTGAAGGACGAACCATCAGTAACTGCTGACGGCAAGCACTTCACG
   A E W R K L K D E P S V T A D G K H F T
61  ATCGCTGCCAACATCGGTACTCCAGACGACCTGGCTGGCGTTTTGGAAAACGGTGCTGAA
   I A A N I G T P D D L A G V L E N G A E
121 GCAGTCGGCTTGTTTCAGAACTGAATTCTTGTACATGAACTCAAACGACTTCCCAACTGAA
   A V G L F R T E F L Y M N S N D F P T E
181 GAAGACCAGTTTGAAGCCTACAAGAAGGTTCTGGAAGGCATGAACGGCAAGCAGGTTATC
   E D Q F E A Y K K V L E G M N G K Q V I
241 ATCAGAACCATGGACATCGGTGGCGACAAGCACCTGTCCTACTGGGACCTGCCAGAAGAA
   I R T M D I G G D K H L S Y W D L P E E
301 ATGAACCCATTCTGGGTATCCGGGCCGTTTCGTCTGTCCTTGAAAAACAAGGAAATCTTC
   M N P F L G I R A V R L S L K N K E I F
361 CGCACCCAGCTGCGGGCCTTGCTGAGAGCATCAGCTTACGGCAAGCTGGGGATCATGCTC
   R T Q L R A L L R A S A Y G K L G I M L
421 CCAATGATCGGTACTTTGGACGAACTTCACCAAGCCAAGGCTGTTTTGGCTGAAGAAAAG
   P M I G T L D E L H Q A K A V L A E E K
481 GACAAGCTGGTCAAGGAAGGCGTCAAGGTTGGCGACGACCTGCAAGTCCGGCATGATGATC
   D K L V K E G V K V G D D L Q V G M M I
541 GAAGTTCGGCAGCTGCCGTTCTGGCAGACCAATTTGCCAAGGAAGTTCGACTTCTTCTCA
   E V P A A A V L A D Q F A K E V D F F S
601 ATCGGGACCAACGACTTGATCCAATACACTATGGCTGCTGACCGGGGCAACGAAAACGTT
   I G T N D L I Q Y T M A A D R G N E N V

```

Figura 4 – Sequência parcial do operon que codifica o gene *spx* e das proteínas correspondentes. A sequência de aminoácidos das ORFs que codificam as proteínas PtsI, Spx e MecA estão mostradas abaixo da sequência de nucleotídeos. Os códons de início e de parada estão destacados em negrito. Sítios de ligação aos ribossomos (RBS) putativos estão destacados em negrito e sublinhadas.

Figura 4 (continuação)

661 TCTTACCTCTACCAGCCATACAACCCGTCAGTTCTCCGCCTCATCAAGCACACGATCGAC
S Y L Y Q P Y N P S V L R L I K H T I D

721 TCAGCTCACGAAGCTGGTATCTGGTGCGGGATGTGTGGTGAAGCAGCTGGTGACTCAATC
S A H E A G I W C G M C G E A A G D S I

781 ATGTTCCCAATCCTGCTTTCCATGGGCCTGGACGAATACTCAATGAGCGCAACTTCAATT
M F P I L L S M G L D E Y S M S A T S I

841 CTGCGGATCAGAAACGAAATGAAGAAGCTCTCAACTGAAGAACTCGCTAGCCTGGCTGAC
L R I R N E M K K L S T E E L A S L A D

901 AAGGCAACCAAGGAATCATTGACCAACGAAGACAACATCGAACTGGTTAAGAACTTGATG
K A T K E S L T N E D N I E L V K N L M

961 GCTGACAAGTAAAGAGCAAATTTAAAGCGATTAGCGTGAGCTGACCGCTTTTTTTGCTTGA
A D K -

1021 TTAATTAAGAAATTTAAAAGAAAGCCAATTACCCCTTCCTTTTTGTAAAGTATCCATGCT

1081 AAATATATAGTAAGCAACGAATGTGTGTTTCATGCAATCTCATTTTAAAGGAGCGTGGTA

1141 ACAATGGTAGATTTATATGTTTCTCCAAGCTGCACCTCATGCCGCAAGGCAAAGCAATGG
M V D L Y V S P S C T S C R K A K Q W

1201 CTTGAACAGCACAAATATTCCTTACAAGGAAAGAAACATTATTTTCAGATCCTTTGAACCGG
L E Q H N I P Y K E R N I I S D P L N R

1261 GAAGAAATCATTCATGTTCTGAGAATGACTGAAGAAGGCACGGAAGAAATCGTGTCAACA
E E I I H V L R M T E E G T E E I V S T

1321 CGGTCGAAGGCTTTCCAAGAGCTGAATATCGACCTGGACGACATTTCAATGAATGAACTG
R S K A F Q E L N I D L D D I S M N E L

1381 ATCGATTTGATTGAAAAGAACCAAGCCTGCTGAGACGGCCAATTATTTTGGATGACCGC
I D L I E K N P S L L R R P I I L D D R

Figura 4 (continuação)

1441 CGGATGCAGGTTGGCTACAATGAAGATGAAATCCGCCGCTTCCTGCCGCGCAGCGTGCGC
R M Q V G Y N E D E I R R F L P R S V R
1501 CGGCTGGAAATAGCCCGGGCTAAGCGCCTGGCAGACCAGGATTTTT**TA**ATTTAAGAATAGA
R L E I A R A K R L A D Q D F -
1561 AAGTTGCAGGCGTTGGCTTCTAGAAGCTAACGCTTTTGCTTTGTTGGCTTTTTAGGTTAC
1621 AATAACGGTACACATATAAGGAGGGATGAAGATGCGCGTTGAAAAGGTGAATGAGAACAC
M R V E K V N E N T
1681 GCTCCGCGTAAGCATGACCCGGGAGGATCTGAACCAGCGGGGCTTGAAGATCTTGGACTT
L R V S M T R E D L N Q R G L K I L D L
1741 ACTCGGCAACCGGAAAGAGTCCAGGAATTTTTCCTGTCAGTTCTCCGCGAAGTGGACGA
L G N R E R V Q E F F L S V L R E V D E
1801 GGACAATGACTTTGCCAGCGATGCGCCGGTGACTTTCCAGGTCATGCCCAACGATGGCGG
D N D F A S D A P V T F Q V M P N D G G
1861 GATCGATCTCCTGATTACCAAGATGAACGCAGGTAGCGACCTGCCGGAAGAAATGCGGCG
I D L L I T K M N A G S D L P E E M R R
1921 CTTCTTTGATCCTGAAGCCAATGGGGTCGGAGACGATATGGCGGAAGCGGTTGAGGAAGA
F F D P E A N G V G D D M A E A V E E D
1981 TGACTGGGCCTTTTCCGACTTGAACCCGGCTGATGACGCTAACACTGAGATGGACCCGGT
D W A F S D L N P A D D A N T E M D P V
2041 GATCATGCAGGACCTGGGCAACACCGATGATGAAGACTACGAGGACTACTGGAGTTACCA
I M Q D L G N T D D E D Y E D Y W S Y Q
2101 GGAGACCCATGTTTTAGTCTTTGACGATATCGATGACCTCCTGGCTTTGGCTGACAGCCT
E T H V L V F D D I D D L L A L A D S L
2161 CAAGGTCAGTGACCTGGCGTCCAGCGTCTACTACTACAAGCAGCAGTTTTATCTCAAGCT
K V S D L A S S V Y Y Y K Q Q F Y L K L
2221 GGCTTTTATGGACGAGAATTACGCGGAAATCAAGCCAGCTGATGCCTGGGCGATCGCCAA

A F M D E N Y A E I K P A D A W A I A N
2281 TGAATTTGGCCGCCAGGTGTCCGCTGACGAATTCAGCAGGCCCAAGCCCACGGCCAGTG
E F G R Q V S A D E F Q Q A Q A H G Q C
2341 CCTCTTCCAGCA
L F P A

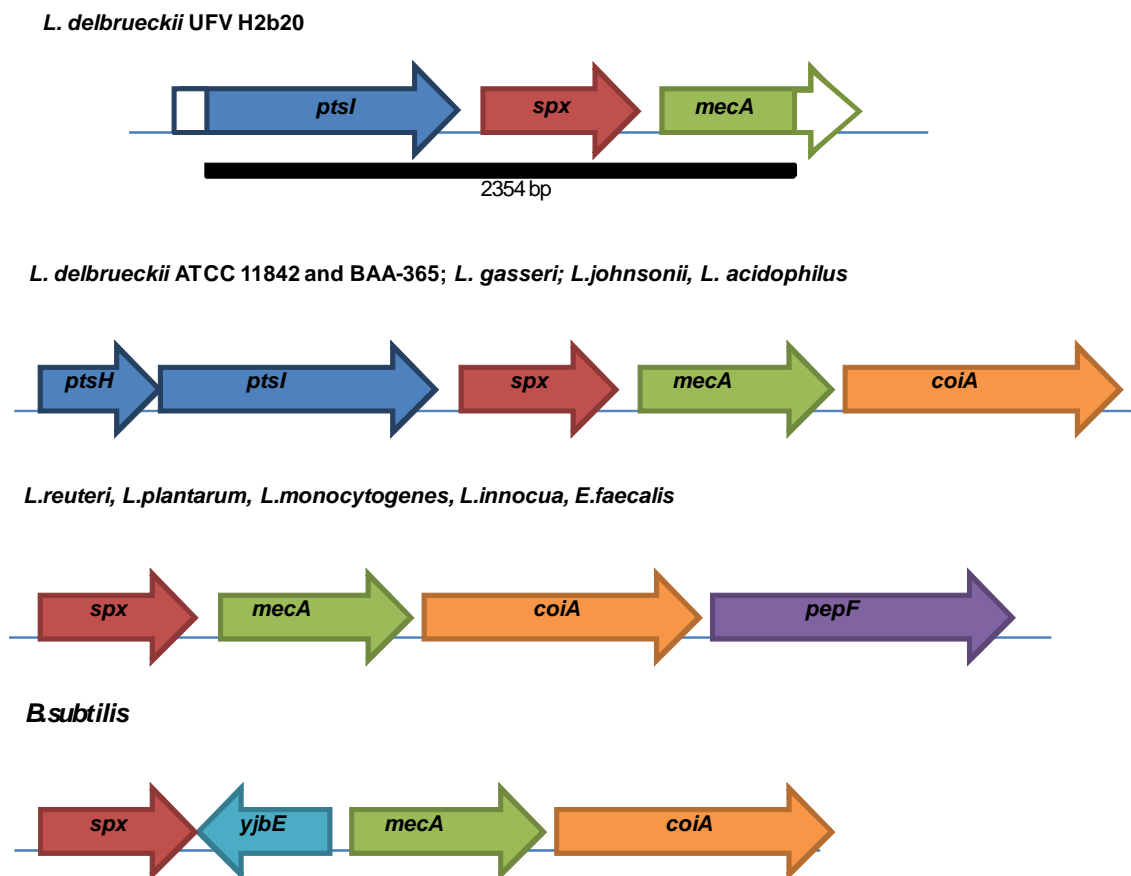


Figura 5 – Organização gênica do operon que codifica o gene *spx* em *L. delbrueckii* UFV H2b20 e em outras bactérias gram-positivas de baixo conteúdo G+C.

4.1.2 Caracterização dos domínios conservados da proteína Spx de *L. delbrueckii* UFV H2b20

Com base na sequência de nucleotídeos obteve-se a possível sequência de aminoácidos da proteína Spx, a qual foi alinhada com homólogos de Spx presentes em outras bactérias Gram-positivas (Figura 6).

Os resultados do alinhamento mostram que a proteína Spx apresenta alguns domínios que são muito conservados entre as bactérias Gram-positivas.

Em *Bacillus subtilis*, Spx é uma proteína monomérica de aproximadamente 15 KDa que pertence a família das proteínas arsenato redutases (ArsC). Membros da família arsenato redutase contêm um resíduo de cisteína conservado que interage com o arsenato. Ortólogos de Spx podem ser encontrados na maioria das bactérias Gram-positivas de baixo conteúdo G+C, como *Staphylococcus*, *Listeria*, *Enterococcus*, *Lactococcus* e *Streptococcus*, possivelmente por estar envolvida com a resposta ao estresse oxidativo. (ZUBER, 2004).

Em bactérias gram-positivas, Spx e seus homólogos possuem um domínio conservado Cys-XX-Cys, que se apresenta no estado sulfidril na presença de condições redutoras. Este domínio se assemelha aos domínios ativos encontrados em oxidoredutases e é o alvo para ativação da proteína Spx (NAKANO et al., 2003). A proteína Spx ativa a transcrição de *trxA* e *trxB* in vitro apenas sobre condições oxidantes, e ao mesmo tempo a ativação transcricional por Spx requer a formação de uma ponte dissulfeto intramolecular dentro do domínio Cys-XX-Cys. Assim, o estado de oxidação destas cisteínas age como um sensor em condições de estresse oxidativo (NAKANO et al., 2005).

Nesse trabalho, a proteína Spx de *L. delbrueckii* UFV H2b20 foi comparada a de *B. subtilis*, uma vez que a função e estrutura dessa proteína foram profundamente caracterizadas nessa bactéria. O alinhamento dos resíduos de aminoácidos da proteína Spx de *B. subtilis* e seu homólogo em *L. delbrueckii* UFV H2b20 resultou na conclusão de que a proteína de *L. delbrueckii* UFV H2b20 apresenta 60% de identidade e 80% de similaridade com a proteína de *B. subtilis*. Além disso, o domínio de ativação Cys10-XX-Cys13 desta é idêntico ao encontrado em *B. subtilis* (Figura 7). Além do domínio de ligação, outro domínio importante é o domínio de interação com a porção α CTD da RNA polimerase. A substituição da glicina presente na posição 52 por uma arginina resultou na perda da capacidade de ativação ou repressão da transcrição por Spx, sendo que a perda desta função ocorreu em razão do rompimento da interação direta entre Spx e o domínio α CTD da RNA polimerase (NEWBERRY et al., 2005).

A região caracterizada por NEWBERRY et al. (2005) como indispensável para interação de Spx com o domínio α CTD também foi encontrado em *L. delbrueckii* UFV H2b20, como por exemplo a presença da glicina na posição 52 (Figura 7).

```

L.delbrueckiiUFVH2b20      MVDLYVSPSCTSCRKAKQWLEQHNIPIYKERNIISDPLNREEI IHVLRMTE 50
L.delbrueckiiATCCBAA365    MVDLYVSPSCTSCRKAKQWLEQHNIPIYKERNIISDPLNREEI IHVLRMTE 50
L.delbrueckiiATCC11842    MVDLYVSPSCTSCRKAKQWLEQHNIPIYKERNIISDPLNREEI IHVLRMTE 50
L.gasseri                   VLNLYTSPSCTSCRKAKAWLKEHDISFKERNIFANPLNKEEIMQVLRMTE 50
L.johnsonii                 VLNLYTSPSCTSCRKAKAWLKEHDISFKERNIFANPLNKEEIMQVLRMTE 50
L.acidophilus              MVDLYVSPSCTSCRKARAWLEKHNIPIFKERNIFSEPLTKEELLKILRMTE 50
L.monocytogenes           MVTLYTSPSCTSCRKARAWLEEHDIPIYKERNIFSEPLSLDEIKEILRMTE 50
L.innocua                   MVTLYTSPSCTSCRKARAWLEEHDIPIYKERNIFSEPLSLDEIKEILRMTE 50
B.subtilis                  MVTLYTSPSCTSCRKARAWLEEHEIPFVERNIFSEPLSIDEIKQILRMTE 50
E.faecalis                  MLTLYTSPSCTSCRKARAWLEEHDIPIFKERNIFSEPLNIEELKAILIMTE 50
L.reuteri                   MVTLYTSPSCTSCRKARAWLKEHDIAFKERNIFSEPLSLNEIKNILRMTE 50
L.plantarum                 MVILYTAPSTSCRKAKAWLQTHDIDFQEHNLTFEPLSIEKIKQILQLTE 50
S.pneumoniae               MITLFLSPSCTSCRKAKAWLEKHKVFPVEHNIMTSPLTRKELQHILSLTE 50
                             :: * : ***** : * * * . : : * : : : . * * . : : : * : * *

L.delbrueckiiUFVH2b20      EGTEEIVSTRSKAFQELNIDLDDISMNELIDLIEKNPSLLRRPI IILDDR 100
L.delbrueckiiATCCBAA365    EGTEEIVSTRSKAFQELNIDLDDISMNELIDLIEKNPSLLRRPI IILDDR 100
L.delbrueckiiATCC11842    EGTEEIVSTRSKAFQELNIDLDDISMNELIDLIEKNPSLLRRPI IILDDR 100
L.gasseri                   NGTEEIISTRSRTFQNLKINLDDSIDQLIDLVEKNPSLLRRPI IIMDDR 100
L.johnsonii                 NGTEEIISTRSRTFQNLKINLDDY---QLIDLVEKNPSLLRRPI IIMDDR 97
L.acidophilus              NGTEEIISTRSRAFQQLKINLDDSIDQLDLVEKNPSLLRRPI IIMDDR 100
L.monocytogenes           DGTDEIISTRSKTFQKLNVDLDSLPLQQLFELIQKNPGLRRPI IDEKR 100
L.innocua                   DGTDEIISTRSKTFQKLNVDLDSLPLQQLFELIQKNPGLRRPI IDEKR 100
B.subtilis                  DGTDEIISTRSKVQKLNVDLDSMPLQDLYRLINEHPGLRRPI IDEKR 100
E.faecalis                  DGTEEIISTRSKVQKLNMDLDELPLQDLLELVQENPGLRRPI IDEKR 100
L.reuteri                   DGTEDIISKRSKAYQKLSVDLNDLSMKALFKLISKNPGLRRPI IDDKR 100
L.plantarum                 SGTEEIISTRSKAFQQLNVDINDLSLNEFLDMITHDPSLLRRPI IMLDEKR 100
S.pneumoniae               NGTDDIISTRSKIFQKLNIDVESISVSELLHLIEQYPSLLRRPI IDAKR 100
                             . * * : : * . * * : : * * : : : . * : : . * . * * * * : : *

L.delbrueckiiUFVH2b20      MQVGYNEDEIRRFLPRSVRRLEIARAKRLADQDF--- 134
L.delbrueckiiATCCBAA365    MQVGYNEDEIRRFLPRSVRRLEIARAKRLADQDF--- 134
L.delbrueckiiATCC11842    MQVGYNEDEIRRFLPHSVRRLEIARAKRLADQYF--- 134
L.gasseri                   LQVGYNEDEIRRFLPRKVRRLELEEIQAMTADL---- 133
L.johnsonii                 LQVGYNEDEIRRFLPRKVRRLELEEIQAMTADF---- 130
L.acidophilus              LQVGYNEDEIRRFLPRKVRRLELAEAQKI-ADL---- 132
L.monocytogenes           LQVGYNEDEIRRFLPRRVRTYQLREAQKMN----- 131
L.innocua                   LQVGYNEDEIRRFLPRRVRTYQLREAQKMN----- 131
B.subtilis                  LQVGYNEDEIRRFLPRKVSFQLREAQRLAN----- 131
E.faecalis                  LQVGFNEDEIRRFLPRDVRQLELRQAQLMAGL----- 132
L.reuteri                   LQVGYNEDEIRRFLPRKVRELELVEAQEKANMI---- 133
L.plantarum                 LQVGYNEDEIRRFLPRKIRTLELLRAQQLANM----- 132
S.pneumoniae               MQIGFNEDEIRAFLPRSYRQELKEARMRAGIS---- 133
                             : * : * : * * * * * * * * : * : : .

```

Figura 6 – Alinhamento da sequência de aminoácidos da proteína Spx de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 com homólogos encontrados em outras bactérias Gram-positivas (Clustal W2). (*) resíduos idênticos, (:) substituições conservadas – aminoácidos com propriedades químicas semelhantes e (.) substituições semi-conservadas – aminoácidos com conformação semelhantes.


```

L.del.UFVH2b20  MVDLYVSPSCTSCRKAKQWLEQHNIIPYKERNITISDPLNREETIHVLRMTE 50
B.subtilis      MVTLYTSPSCTSCRKARAWLEEHETPFVERNIFSEPLSIDEIKQILRMTE 50
** ** .*****: **:*:**: **:*:**. ** :*****

L.del.UFVH2b20  EGTEEIVSTRSKAFQELNIDLDDISMNELIDLIEKNPSLLRRPIILDDR 100
B.subtilis      DGTDEIISTRSKVFQKLNVNVE SMPLQDLYRLINEHPGLRRPIIIDKR 100
:***:**:*****. **:*:**: . . . : * **:*:**. *****:***:

L.del.UFVH2b20  MQVGYNEDEIRRFLPRSVRRLEIARAKRLADQDF 134
B.subtilis      LQVGYNEDEIRRFLPRKVR SFOLREAORLAN --- 131
:*****. ** : . : * :

```

Figura 7 – Alinhamento dos resíduos de aminoácidos da proteína Spx de *Bacillus subtilis* com seu homólogo encontrado em *L.delbrueckii* UFV H2b20 (ClustalW2) . (*) resíduos idênticos, (:) substituições conservadas – aminoácidos com propriedades químicas semelhantes e (.) substituições semi-conservadas – aminoácidos com conformação semelhantes.

4.1.3. Relacionamento Filogenético de Spx de *L. delbrueckii* UFV H2b20 com homólogos de outras bactérias gram-positivas.

Árvores filogenéticas foram reconstruídas com base na sequência do gene *spx* de *L. delbrueckii* UFV H2b20 e de outras bactérias Gram-positivas, bem como na sequência de aminoácidos da proteína Spx (Figuras 8, 9, 10 e 11). Independentemente do método utilizado, todas as árvores reconstruídas apresentam a sequência correspondente a *L. delbrueckii* UFV H2b20 agrupada junto às sequências de *L. delbrueckii* ATCC 11842 e *L. delbrueckii* ATCC BAA-365.

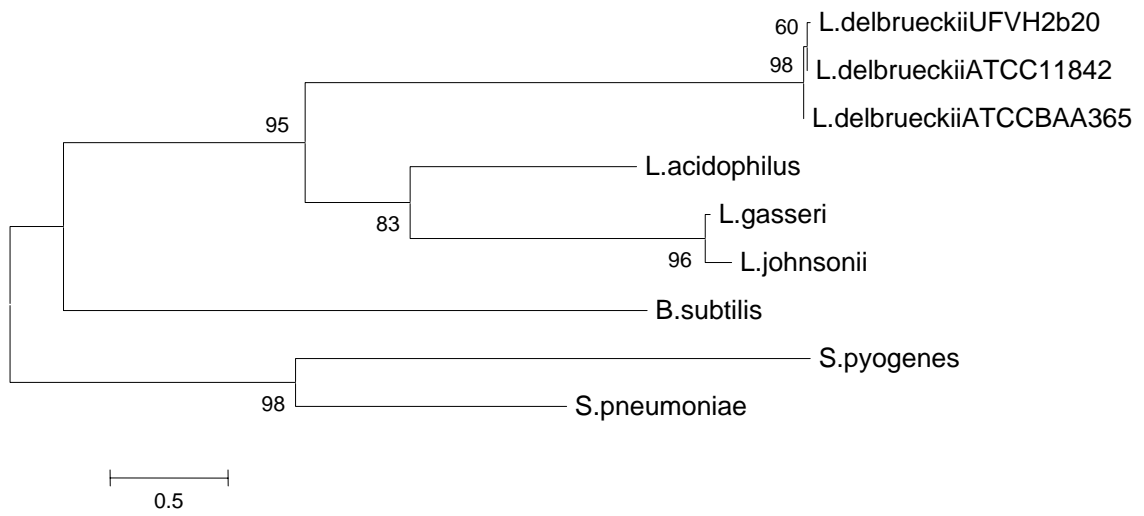


Figura 8 - Árvore filogenética reconstruída com homólogos do gene *spx* pelo método de *Neighbor-Joining* utilizando o programa MEGA 4.

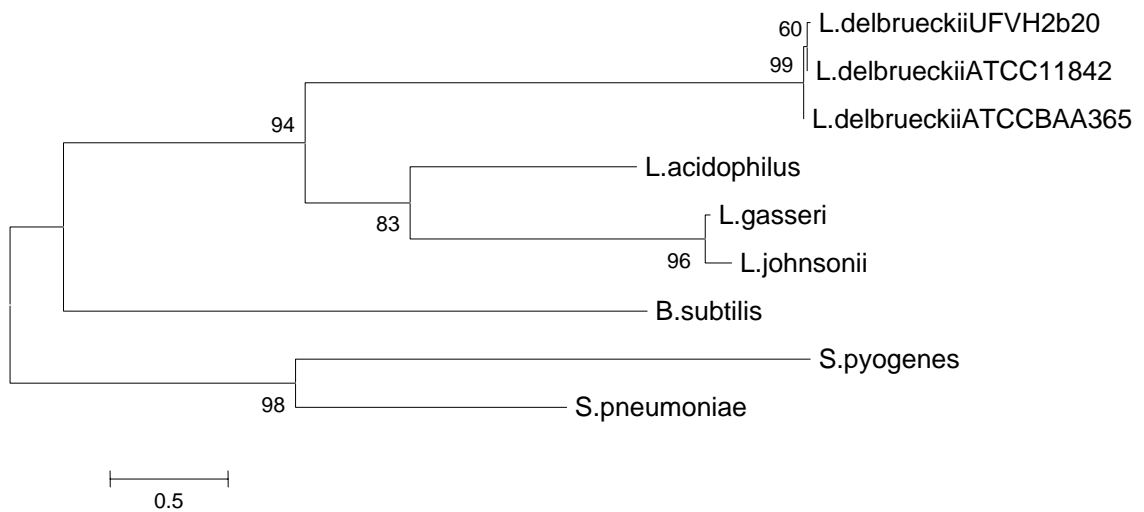


Figura 9 - Árvore filogenética reconstruída com base na sequência de aminoácidos da proteína Spx pelo método de *Neighbor-Joining* utilizando o programa MEGA4.

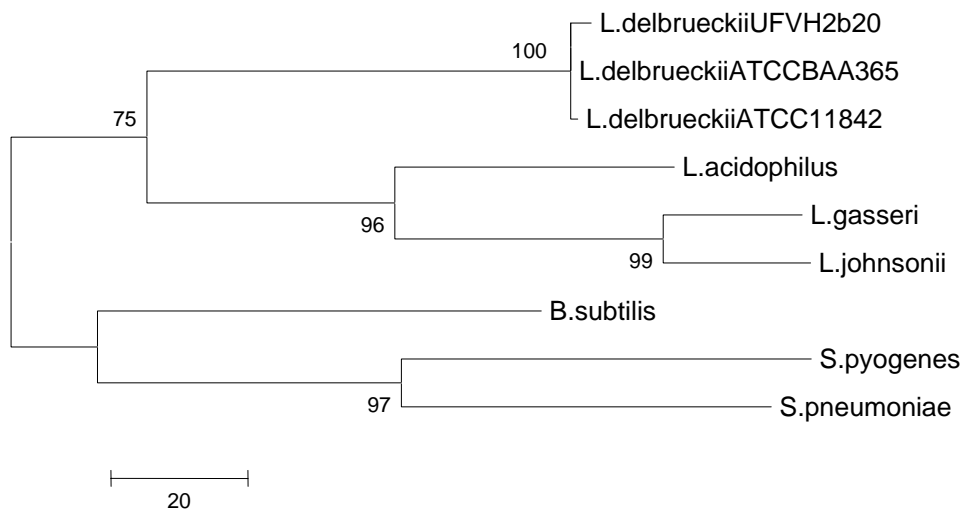


Figura 10 - Árvore filogenética reconstruída com homólogos do gene *spx* pelo método de Máxima Parcimônia utilizando o programa MEGA 4.

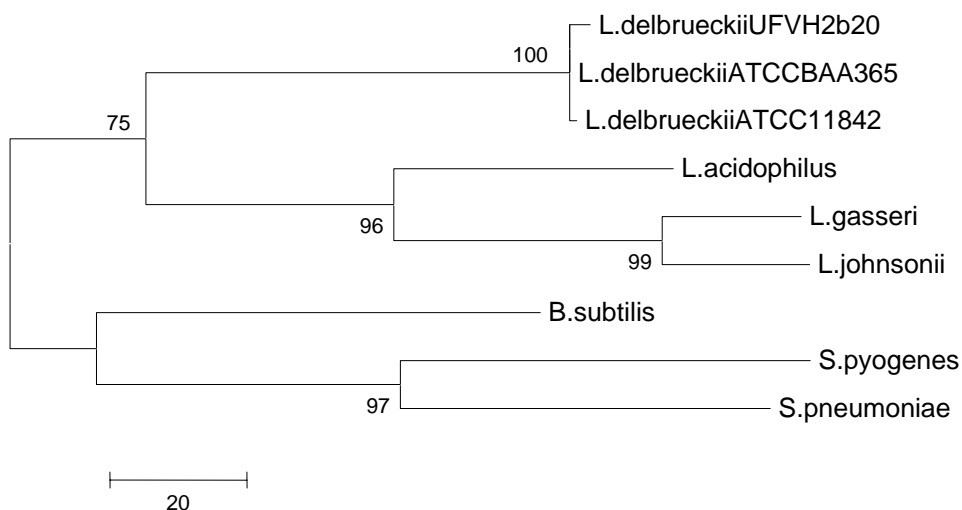


Figura 11 - Árvore filogenética reconstruída com base na sequência de aminoácidos da proteína Spx pelo método de Máxima Parcimônia utilizando o programa MEGA4.

4.1.4. Sequência do gene *dps* de *L. delbrueckii* UFV H2b20

A estratégia para amplificar e obter a sequência do gene *dps* de *L. delbrueckii* UFV H2b20 foi semelhante à utilizada para amplificação do gene *spx*. Os vários fragmentos obtidos por PCR foram seqüenciados e analisados. A partir da análise das seqüências destes fragmentos, obteve-se uma sequência final de 546 pares de base com 98% de identidade com as seqüências do gene *dps* de *L. plantarum*, *L. rhamnosus* e *L. sakei* (Figura 12). Este gene está ausente no genoma das linhagens de *L. delbrueckii* ATCCBAA-365 e *L. delbrueckii* ATCC 11842, bactérias amplamente utilizadas na indústria de alimentos, mas que não apresentam características de probiose.

A fim de se caracterizar a sequência promotora do gene *dps*, a técnica de PCR inversa foi utilizada, com a qual se obteve um fragmento de aproximadamente 1000 pares de base. O fragmento gerado foi seqüenciado e a partir da análise da sequência obtida foi possível determinar a presença de 784 pares de base anteriores ao gene *dps*.

A análise desta sequência pelo programa tBLASTn detectou identidade de aproximadamente 80 a 90% com seqüências de vários plasmídeos presentes em *L. plantarum* e *L. curvatus*. Quando esta sequência foi comparada com a região promotora do gene *dps* de *L. plantarum*, apenas os 35 pares de base próximos ao gene apresentaram alguma identidade. Além disso, a mesma parece não codificar nenhuma proteína conhecida (Figura 12).

Foram encontradas nessa região 2 seqüências típicas de promotores de *Lactobacillus* com seqüências análogas as regiões -35 (TTGACA) e -10 (TATAAT), ambas separadas por 18 nucleotídeos contendo o motivo TG antes do hexamero -10. A presença do motivo TG parece ser de considerável importância em bactérias gram-positivas, onde a introdução ou deleção do motivo pode influenciar substancialmente a atividade do promotor (VOSKUIL & CHAMBLISS, 1998; McCRAKEN & TIMMS, 1999).

Um sítio de ligação de ribossomos (RBS) (AAGGAGAT) foi encontrado próximo da região de início da tradução. Uma sequência semelhante (AAGGAGAA) foi encontrada por SCHICK et al. (1999) na região promotora do gene *pepQ* de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, o qual codifica uma peptidase.

Assim, como resultado dos métodos empregados, obteve-se uma sequência final de 1310 pares de bases.

O gênero *Lactobacillus* é subdividido em 3 grupos de acordo com características fermentativas, sendo que *L. plantarum*, *L. rhamnosus* e *L. sakei* não pertencem ao mesmo grupo de *L. delbrueckii*, que é homofermentativo. Filogeneticamente, os gêneros *Lactobacillus* e *Pediococcus* formam um *supercluster* dentro das bactérias lácticas que pode ser subdividido em dois *subclusters*. Estes, por sua vez, não se correlacionam com a subdivisão fisiológica do gênero *Lactobacillus* descrita anteriormente. Entretanto, também baseado nesta divisão, *L. delbrueckii* apresenta-se em um grupo diferente e pouco relacionado com *L. plantarum*, *L. rhamnosus* e *L. sakei* (SALMINEN et al., 2004).

Com base nos resultados já descritos, infere-se que o gene *dps* presente em *L. delbrueckii* UFV H2b20 tenha sido adquirido por transferência horizontal de genes.

A massiva transferência horizontal de genes (THG) é um dos mecanismos evolucionários mais estudados (OCHMAN, 2001). Três marcantes descobertas, baseadas na análise de genomas completos, contribuíram para aumentar o interesse sobre o papel da THG na evolução de procariotos. Primeiro, a THG é geralmente considerada como rampa entre genomas, pelo menos na escala biológica de tempo. Segundo, nem todos os genes são igualmente transferidos horizontalmente, os genes informacionais de transcrição, tradução e processos relacionados são raramente transferidos, ao passo que genes operacionais, os envolvidos em biossíntese de aminoácidos e vários outros processos operacionais são facilmente transferidos. Terceiro, fatores biológicos e físicos parecem alterar a THG, eles incluem forças intracelulares estruturais entre proteínas - a hipótese da complexidade, interações entre organismos e as com o meio físico (NOVICHKOV, 2004).

Está claramente demonstrado que a THG é talvez o principal responsável pela diversidade genética entre procariotos, sendo que esta ocorre preferencialmente entre organismos que têm fatores ambientais e genômicos em comum, fenômeno denominado associação positiva (JAIN et al., 2003).

```

1   CCGGTTGGTCTTTAAGCCACAGCTTAAAGCGCTTGATACAGCTTTTATAGGTCTTAGCCG
61  TGTTTCGGCATGTCTTCAAGATACAGTAAAAAGCTATCAAGGGTTGCCCCGTCTAAGGTTT
121 GGGCAAGCGTGATGTCATTGGTCATTTTTGCATCCCTCTTAACTATGATTACTAATCATA
181 TAATCATATATTGACTCTTTACAGCTATTATAGCACCTTTTCCGCCTATGTGTTATATGG
241 AATTAGAACTTTTTTCAATTAGTTCGGGATCTGCTCCCCCTGATTTTTCAAATTTCTATCC
301 CACACGAATAAAACCATAGGCACTGCCAAACCCGCAAGCTGTGTCAGCTTGACCCCATAA
361 ATGAGCGGGAGCTCCCGCTCAAACCTACCCCGCACTCGCCGTGAGGCAGGCAAAAAAAGC
421 AGGTGTGCTTTTCTTTACATGCGCAAAAGTGTCTTGGCCTAGTGAGTCCATCAACTCCTT
481 AAAAGCCGTTCTACGTCAGATTTACCGTTAGACGGACAGTAAAATTATACGGTTAACAGC
541 TAAAATGGCTTAGAGAGCAAATTAGGGGCATTTAAAGCCAATAAAGTCCAGTCGCCAACT
601 CTTTCGGACTTTATTGGCTTTGAAGATTCAACTGACGCAAGTCAGTTTTGTTTGAGCAA
661 AGCGAAATCTGATACAGGTTTTAATGGGTTTAGAACAGCGTAATCTTTGATTGACGTATAA
721 GTGCGCCTTGGCATTTTTCTTCGGTTTTGAGTTATAATAACCATATCAAAAGGAGATCAA
781 TCTAATGAAATATACGAAAACCAAAGCAGTATTAAATCAACTCGTTGCCGATTTGAGCCA
      M K Y T K T K A V L N Q L V A D L S Q
841 GATGTCAATGATTATTCATCAGACGCATTGGTACATGCGTGGACCCAACTTTTTGAAGTT
      M S M I I H Q T H W Y M R G P N F L K L

```

Figura 12 – Sequência do gene *dps* de *L. delbrueckii* UFV H2b20, de sua respectiva região promotora e da proteína correspondente. A sequência de aminoácidos da ORF que codifica a proteína Dps está mostrada abaixo da sequência de nucleotídeos. Os códons de início e de parada estão destacados em negrito. Sítio de ligação ao ribossomo (RBS) putativo e as sequências promotoras putativas estão destacadas em negrito e sublinhadas. Em cinza estão destacados os motivos TG, anteriores a região -10, os quais parecem ser de considerável importância para atividade de promotores em bactérias gram-positivas.

Figura 12 (continuação)

901 GCACCCCTTGATGGATAAGTTCATGGAAGAAATTGATAGCCAACCTCGATGTCATTTCTGA
H P L M D K F M E E I D S Q L D V I S E
961 ACGGCTGATTGCGCTTGATGGCAATCCTTACTCGACCTTAAAAGAAATGGCCGAAAACAC
R L I A L D G N P Y S T L K E M A E N T
1001 TAAGATTCAAGACTGGCCTGGTGAATGGGACAAAACAACCCAGAACGCCTCGCACACTT
K I Q D W P G E W D K T T P E R L A H L
1061 AGTTGATGGCTATCGTTACTTGAAGACCTTTACCAACACGGCATTGAAGTATCCGATGT
V D G Y R Y L E D L Y Q H G I E V S D V
1121 TGAAAAAGACTTCAGTACCCAAGATATTTTCATTGGTCTCAAACCGCAATTGAGAAGAA
E K D F S T Q D I F I G L K T A I E K K
1181 AATCTGGATGATTCAGGCAGAGCTTGGGTGGCGCCGAAATTGATGAAT~~TAA~~AATAATAT
I W M I Q A E L G S A P E I D E -
1241 AAAAAATCGGTAGGCTTATGGGTAGGCTTATGGTAGATTGTAAAATTAATCCGAACGCC
1301 CATTTGAATA

4.1.5. Caracterização da proteína Dps de *L. delbrueckii* UFV H2B20

Com base na sequência do gene *dps* obteve-se a possível sequência de aminoácidos da proteína Dps, a qual foi alinhada com homólogos de Dps presentes em outras bactérias gram-positivas (Figura 13).

Ao contrário do observado para a proteína Spx (Figura 4), Dps apresenta poucos resíduos idênticos entre as bactérias gram-positivas analisadas, com a ocorrência de várias substituições conservativas e semi-conservativas (Figura 13).

A proteína Dps de *L. delbrueckii* apresentou 98% de identidade e 100% de similaridade com as proteínas de *L. plantarum*, *L. sakei* e *L. rhamnosus* (Figura 13 e Figura 14).

Uma característica importante da proteína Dps é a capacidade da mesma em acumular átomos de ferro. Proteínas Dps são formadas por apenas 12 subunidades, sendo capazes de se ligarem a aproximadamente 500 átomos de ferro (BOZZI et al., 1997; PAPINUTTO et al., 2002).

O ferro é incorporado na cavidade central da proteína Dps pela oxidação de Fe_2^+ a Fe_3^+ pelo domínio ferroxidase encontrado entre as subunidades da proteína (ILARI et al., 2000, SMITH, 2004).

Assim, a proteína Dps possui 3 domínios importantes, a interface de dimerização, o centro ferroxidase e o poro iônico. Todos os domínios importantes para atividade desta proteína foram detectados na sequência de *L. delbrueckii* UFV H2b20 (Figura 15).

L.gasseri	MAYPKTKKIMNEIVADLTQTHMVVHQHHWYMLGRGFLKLHPYLLDDVMDL	50
L.johnsonii	MAYPKTKKIMNEIVADLTQTHMVVHQHHWYMLGRGFLKLHPYLLDGVMEEL	50
L.helveticus	MQYQKTKEILNQAVADLSQLQMVVRQQHWYMRGPEFLNLHPYLLDDVMSEL	50
L.rhamnosus	MKYTKTKAVLNQLVADLSQMSMIHQTHWYMRGNFLKLHPLMDEFMEEI	50
L.plantarum	MKYTKTKAVLNQLVADLSQMSMIHQTHWYMRGNFLKLHPLMDEFMEEI	50
L.delbrueckiiUFVH2b20	MKYTKTKAVLNQLVADLSQMSMIHQTHWYMRGNFLKLHPLMDKFMEEI	50
L.reuteri	MKYQETKETLNQLVADLSQMAMIHQTHWYMRGNFLKLHPLMDQFMDEI	50
L.fermentum	MKYEKTKEVLNQLVADLSQLVMVVHQTHWYMRGENFLKLHPLMDDWMDL	50
E.faecalis	MKFEKTKEILNQLVADLSQFSVVIHQTHWYMRGPEFLTLHPQMDYMDQI	50
L.lactis	MSNEHTQEVLNQTVADLSKGSALVHQIHWYLRGPGFLYLHPKMDLKDQL	50
	* .*: *: *****: :::* ***: * ** *** :* .::	
L.gasseri	AEQQDQVAERLIEINGSPISTYEEVLEETNVPDQVGSWDLSEERFQLIV	100
L.johnsonii	AEQQDQVAERLIAINGNPISYEEVLEETNVPDQIGSWDLSEERFQLII	100
L.helveticus	NDQRDLIAERLITIDGSPYSSLAEMVDHSTIEAHPGKWTPTTTERFATIV	100
L.rhamnosus	DSQLDVISERLIALDGPSTLKEAENTKIQDWPGEWDKTTPERLAHLV	100
L.plantarum	DSQLDVISERLIALDGPSTLKEAENTKIQDWPGEWDKTTPERLAHLV	100
L.delbrueckiiUFVH2b20	DSQLDVISERLIALDGNPYSTLKEAENTKIQDWPGEWDKTTPERLAHLV	100
L.reuteri	NDQLDVISERLLTLDGEPYSTLKEIATHTKIKDWPGNFDKTTPERLAHLV	100
L.fermentum	NDQLDEISERLIALDGPSTLKEAHTKIPDEPGNWNKSTPERFEVLA	100
E.faecalis	NEQLDVVSERLITLDGSPFSTLREFAENTKIEDEIGNWDRTIPERMEKLV	100
L.lactis	DEHLDEFAERLITIGSPVSTLAEFDKNSKIEMTPAAWGKSNSERVKELI	100
	.: * .:****: :.*.* *: * . .::: . .: . ** . :	
L.gasseri	NAYQLRDDYERGIKISEDEGDNSTNDLLIAYHTAVEKRIWMSAELGKR	150
L.johnsonii	NAYQLRDDYERGIKISEGEGDDSTNDLLISYHTAIEKRIWMSAELGQR	150
L.helveticus	DGYHHLAHLYEKGIKADEEGDYSSDILTTCNDLEKRIWMSAAEINQA	150
L.rhamnosus	DGYRYLEDLYQHGIIEVSDVEKDFSTQDIFIGLKTAEKKIWMIAELGSA	150
L.plantarum	DGYRYLEDLYQHGIIEVSDVEKDFSTQDIFIGLKTAEKKIWMIAELGSA	150
L.delbrueckiiUFVH2b20	DGYRYLEDLYQHGIIEVSDVEKDFSTQDIFIGLKTAEKKIWMIAELGSA	150
L.reuteri	AGYRYLEDLYQHGIIEVTDIEKDYSTQDIFIGFKTAIEKKIWMIAELDQA	150
L.fermentum	KDYRYLADLYQHGIIEISDDEKDFSTQDIFIGFKTATEKRLWMIQAEKGKA	150
E.faecalis	AGYRYLADLYAKGIEVSGEEDDCTQDIFIANKTDIEKNIWMLQAKLGKA	150
L.lactis	VAYKYLTQLFKDGIKIAAGDDVTVDLFTTALGDIEKTLWMIAEVGG--	148
	*: * . : ** : : * : *** : ** :***: *::.	
L.gasseri	PGEGE	155
L.johnsonii	PGEGE	155
L.helveticus	PNIDE	155
L.rhamnosus	PEIDE	155
L.plantarum	PEIDE	155
L.delbrueckiiUFVH2b20	PEIDE	155
L.reuteri	PEIDN	155
L.fermentum	PERDL	155
E.faecalis	PGIDA	155
L.lactis	----	

Figura 13 – Alinhamento da sequência de aminoácidos da proteína Dps de *L. delbrueckii* UFV H2b20 com homólogos encontrados em outras bactérias Gram-positivas (ClustalW2). (*) resíduos idênticos, (:) substituições conservadas – aminoácidos com propriedades químicas semelhantes e (.) substituições semi-conservadas – aminoácidos com conformação semelhantes.

```

L.delbrueckii      MKYTGTKAVLNQLVADLSQSMIIHQTHWYMRGPNFLKLHPLMDKFMEEDSQLDVISER 60
L.plantarum       MKYTGTKAVLNQLVADLSQSMIIHQTHWYMRGPNFLKLHPLMDEFMEEIDSQLDVISER 60
*****:*****

L.delbrueckii      LIALDGNPYSTLKEMAENTKIQDWPGEWDKTPERLAHLVDGYRYLEDLYQHGI EVSDVE 120
L.plantarum       LIALDGSPYSTLKEMAENTKIQDWPGEWDKTPERLAHLVDGYRYLEDLYQHGI EVSDVE 120
*****.*****

L.delbrueckii      KDFSTQDIFIGLKTAIEKKIWMIQAELGSAP EIDE 155
L.plantarum       KDFSTQDIFIGLKTAIEKKIWMIQAELGSAP EIDE 155
*****

```

Figura 14 – Alinhamento dos resíduos de aminoácidos da proteína Dps de *L. delbrueckii* UFV H2b20 com seu homólogo encontrado em *L. plantarum* WCFS1 (ClustalW2). (*) resíduos idênticos, (:) substituições conservadas – aminoácidos com propriedades químicas semelhantes e (.) substituições semi-conservadas – aminoácidos com conformação semelhantes.

```

L.delbrueckii      MKYTGTKAVLNQLVADLSQSMIIHQTHWYMRGPNFLKLHPLMDKFMEEI 50
L.plantarum       MKYTGTKAVLNQLVADLSQSMIIHQTHWYMRGPNFLKLHPLMDEFMEEI 50
L.lactissubsp.cremoris MSNEHTQEVLNQTVADLSKGSALVHQIHWYLRGPGFLYLHPKMDLKDQL 50
*. :*: **** *****: * :*: ** *:***. ** ** *: :*:

L.delbrueckii      DSQLDVIERLIALDGNPYSTLKEMAENTKIQDWPGEWDKTPERLAHLV 100
L.plantarum       DSQLDVIERLIALDGSPYSTLKEMAENTKIQDWPGEWDKTPERLAHLV 100
L.lactissubsp.cremoris DEHLDEFAERLITIGGSPVSTLAEFDKNSKIEMTPAAWGKSNSEVVKELI 100
*. :*: :*: :*: :*. * ** *: :*: :*. * .*: .*: .*:

L.delbrueckii      DGYRYLEDLYQHGI EVSDVEKDFSTQDIFIGLKTAIEKKIWMIQAELGSA 150
L.plantarum       DGYRYLEDLYQHGI EVSDVEKDFSTQDIFIGLKTAIEKKIWMIQAELGSA 150
L.lactissubsp.cremoris VAYKYLTQLFKDGIKIAGDDGDDVTVDLFTTALGDIEKTLWMI EAEVG-- 148
. :*: :*: :*: :*. * * ** * ** .:***:***:***

L.delbrueckii      PEIDE 155
L.plantarum       PEIDE 155
L.lactissubsp.cremoris -----

```

Figura 15 – Alinhamento dos resíduos de aminoácidos da proteína Dps de *L. delbrueckii* UFV H2b20 com homólogos encontrados em *L. plantarum* WCFS1 e *L. lactis* subsp. *cremosis* (ClustalW2). (*) resíduos idênticos, (:) substituições conservadas – aminoácidos com propriedades químicas semelhantes e (.) substituições semi-conservadas – aminoácidos com conformação semelhantes. Resíduos marcados em cinza: interface de dimerização; sublinhados: centro ferroxidase; destacados em preto: poro iônico.

4.1.6. Relacionamento Filogenético de Dps de *L. delbrueckii* UFV H2b20 com homólogos de outras bactérias gram-positivas.

Árvores filogenéticas foram reconstruídas com base na sequência do gene *dps* de *L. delbrueckii* UFV H2b20 e de outras bactérias gram-positivas, bem como na sequência de aminoácidos da proteína Dps (Figuras 16, 17, 18 e 19). Independente do método utilizado, todas as árvores construídas apresentam a sequência correspondente a *L. delbrueckii* UFV H2b20 agrupada junto às sequências de *L. plantarum*, *L. rhamnosus* e *L. sakei*, sendo *S. mutans* um ancestral comum a estes. *L. reuteri*, outra bactéria probiótica, também foi agrupada no mesmo clado que *L. delbrueckii* UFV H2b20.

A proteína Dpr de *S. mutans*, um homólogo de Dps, foi amplamente caracterizada e é indispensável à sobrevivência deste em condições de aerobiose e para persistência na cavidade bucal (HIGUCHI et al., 2000). Podemos sugerir, portanto, que a aquisição do gene *dps* por *L. delbrueckii* UFV H2b20 lhe confere uma vantagem adaptativa para sobrevivência durante a passagem pelo trato gastrointestinal, estando assim, possivelmente relacionado a sua capacidade probiótica.

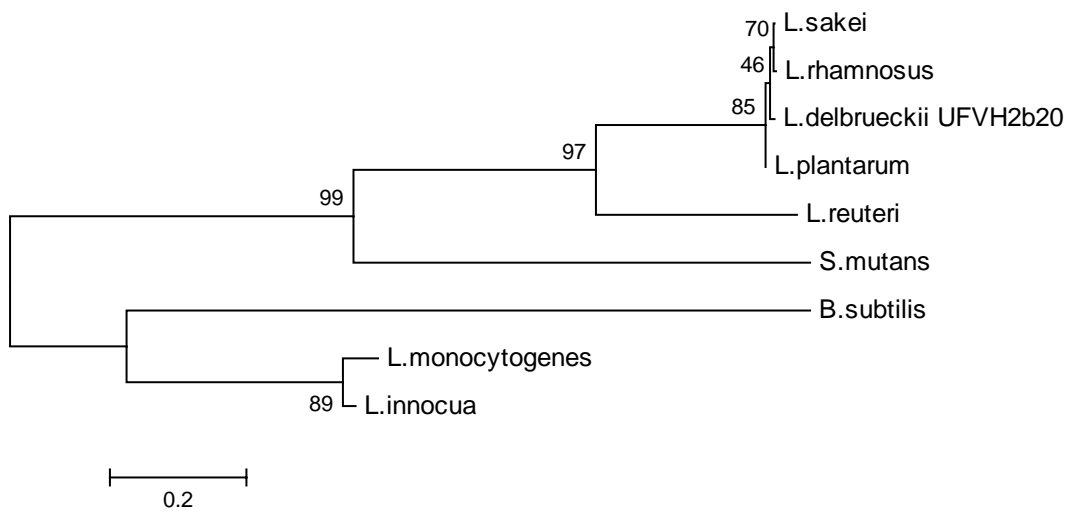


Figura 16 - Árvore filogenética reconstruída com homólogos do gene *dps* pelo método de *Neighbor-Joining* utilizando o programa MEGA 4.

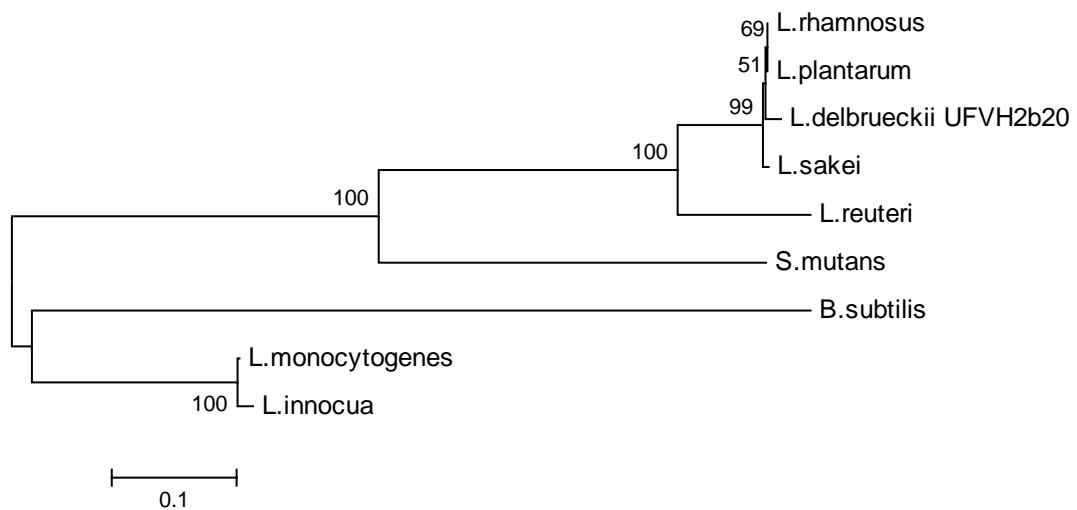


Figura 17- Árvore filogenética reconstruída com base na sequência de aminoácidos da proteína Dps pelo método de *Neighbor-Joining* utilizando o programa MEGA4.

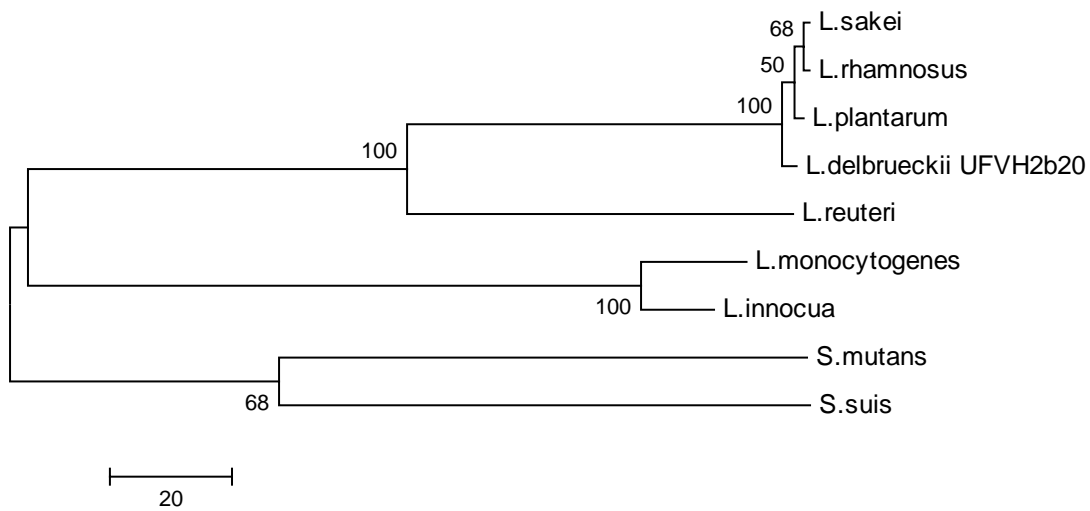


Figura 18 - Árvore filogenética reconstruída com homólogos do gene *dps* pelo método de Máxima Parcimônia utilizando o programa MEGA 4.

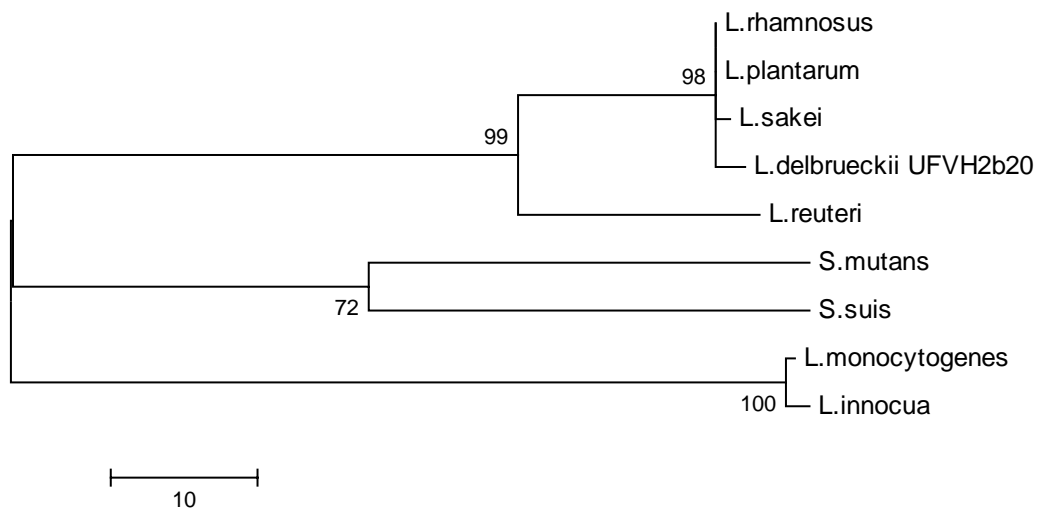


Figura 19 - Árvore filogenética reconstruída com base na sequência de aminoácidos da proteína Dps pelo método de Máxima Parcimônia utilizando o programa MEGA 4.

4.1.7. Caracterização parcial do gene *pox* que codifica a enzima piruvato oxidase de *L. delbrueckii* UFV H2b20

Uma estratégia semelhante à utilizada para amplificação do gene *spx* foi empregada para detecção e obtenção da sequência parcial do gene *pox* de *L. delbrueckii* UFV H2b20. Alguns fragmentos foram gerados por reação de PCR, seqüenciados e analisados. A partir da análise das sequências destes fragmentos, obteve-se uma sequência final de 1327 pares de base que possui 98% de identidade com as sequências dos genes *pox* de *L. delbrueckii* ATCC 11842 e *L. delbrueckii* ATCC BAA-365 (Figura 20).

1 GGCATTGACCACCTCTACGGTTTTCCAGGTGGTTCTTTTACTCAACCATGAACGCGATC
 G I D H L Y G F P G G S F D S T M N A I
 61 TACGAAATGCAAGACAAGATCAAGTTCATCGAAGTTCGTCACGAAGAAGCCGCATCCTTG
 Y E M Q D K I K F I E V R H E E A A S L
 121 GCTGCCTCAGCAGAATACAAGCTGACTGGCAAGCTTGGTGTCTGCATGGGTTTCAGCTGGC
 A A S A E Y K L T G K L G V C M G S A G
 181 CCTGGTGCCATCCACTTGATGAACGGCTTGTATGACGCTAAGTACGACAAGACCCCAATG
 P G A I H L M N G L Y D A K Y D K T P M
 241 GTTGCCCTGGTAGCCAATGTTCCAACCTCCTCGTCAAGACATCAACTTCTTCCAAGCCTTT
 V A L V A N V P T P R Q D I N F F Q A F
 301 GACGAAACGCCATGGTTCCTGACGTTGCCGTTTGGGTCCACCAAGCCAAGACCAAGGAA
 D E T P W F R D V A V W V H Q A K T K E
 361 GCTTTGCCAGTTTTGATGGACTGCTATCCGTCAAGCATAACGCAAAGAAGGGTCCAGCT
 A L P V L M D T A I R Q A Y A K K G P A
 421 GTTTTGGTAATTCCCTAAGGACTTCGGTTGGCAAGAAATCGAAGACAACCTACCGCGTTTCC
 V L V I P K D F G W Q E I E D N Y R V S
 481 GCAAGCAACCACGTTGCTGACAACCTACGCTGCTCCAACCTGCTGAATCAATTGAAGCCGCA
 A S N H V A D N Y A A P T A E S I E A A
 541 ACTAAGTTGATCAAGGAAGCTAAGAACCCAGTTGTTTACTTCGGTTTGGGTGCTTCAGGC
 T K L I K E A K N P V V Y F G L G A S G
 601 GCTGCCGAAGAATTGAAGGAATTTGCTGACAAGTTCAAGATGCCAATGATGTCCTCATAAC
 A A E E L K E F A D K F K M P M M S S Y
 661 CTGGGCAAGGGTATCGTTGAAGACAGCTTCAAGCCATACTTGGGGACTATCGGCCGTCTC
 L G K G I V E D S F K P Y L G T I G R L

Figura 20 – Sequência parcial do gene *pox* de *L. delbrueckii* UFV H2b20 e da proteína correspondente. A sequência de aminoácidos da ORF que codifica a proteína Pox está mostrada abaixo da sequência de nucleotídeos.

Figura 20 (continuação)

721 GGTGCTAAGGCTCCTAACGAAGTTCAAGGCCACACTGACCTGGTAGTTTGGGTTGGTAAC
G A K A P N E V Q G H T D L V V W V G N
781 AACTCACCATTCTCAGTATTGTGGTTCCTAAGAACGCCAAGGTTATCCAAATCGACGTT
N S P F S V L W F P K N A K V I Q I D V
841 GACCCAGAAAAGCAAGGCAAGCGTCACTCAGTTGACGTATCAATCCTGGCAGACGCTAAG
D P E K Q G K R H S V D V S I L A D A K
901 AAGAGCTTGCGTGCTTTGATCGACGCCGGTGAAGCCCGTGAAGAATCACCACCTTTACAAG
K S L R A L I D A G E A R E E S P L Y K
961 GCTGCTTTGGCCGACCGTGAAGAATGGGACGCATGGACTGCTTCATTTGCTGACGACCAC
A A L A D R E E W D A W T A S F A D D H
1021 TTGAAGGACGAAGGCCGCGTACGCCAAGAACCAATCTGGGATGTCATCAACAAGGAAGCC
L K D E G R V R Q E P I W D V I N K E A
1081 GCAGACAACGCTGTCTTCGCTATTGACGTTGGTAACGTCAACATGGACCACGCACGTCTG
A D N A V F A I D V G N V N M D H A R L
1141 TTGAACATGAACGGCAAGCAACGCTGGACTACTTCAGGCTTGTACGCAACCATGGGTTAC
L N M N G K Q R W T T S G L Y A T M G Y
1201 GGCTCACCAGCTGCTATTGCAGCCGCAACTGCAATGCCAGACCGTGTAGTATGGCACTTG
G S P A A I A A A T A M P D R V V W H L
1261 GCCGGAGACGGTGGCTTCGCGATGATGAGCGAAGAAGTCTTACTTTGGCTCGCTACAAC
A G D G G F A M M S E E L L T L A R Y N
1321 ATGCACGT
M H V

4.1.8. Caracterização parcial da enzima piruvato oxidase de *L. delbrueckii* UFV H2b20

Com base na sequência parcial do gene *pox* obteve-se a possível sequência de aminoácidos de uma porção da enzima piruvato oxidase (Pox), a qual foi alinhada com homólogos de Pox presentes em outras bactérias gram-positivas (Figura 21).

Vários domínios ou resíduos de aminoácidos conservados foram identificados entre as bactérias Gram-positivas, sendo que proteína Pox de *L. delbrueckii* apresentou 98% de identidade e 100% de similaridade com as proteínas de *L. delbrueckii* ATCC 11842 e *L. delbrueckii* ATCC BAA-365 (Figura 22).

Um importante domínio presente nesta enzima é o domínio de ligação ao TPP, o qual já foi amplamente caracterizado em *L. plantarum* (SEDEWITZ et al., 1984; MULLER & SCHULZ, 1993). Com a sequência obtida foi possível identificar apenas parte deste domínio na proteína Pox de *L. delbrueckii* UFV H2b20 (Figura 22).

```

L.delbrueckiiATCCBAA-365      MAKIKGANAVLDVMYKWDHLYGFPGGSFDMNAIYEMQDKVKFIEVR 50
L.delbrueckiiATCC11842      MAKIKGANAVLDVMYKWDHLYGFPGGSFDMNAIYEMQDKVKFIEVR 50
L.delbrueckiiUFVH2b20      -----GIDHLYGFPGGSFDMNAIYEMQDKIKFIEVR 33
L.gasseriATCC33323      MTKISGSDAMFQVLYDWGIDHIYGFPGGSFDMNAIHNWRNKIKFIEVR 50
L.johnsoniiNCC533      MTKISGSDAMFQVLYDWGIDHIYGFPGGSFDMNAIHNWRDKIKFIEVR 50
L.acidophilusNCFM      MTKINGSDAMLKVIYDWGIDHIYGFPGGSFDSSMNAIYDFRDKMKFIEVR 50
L.plantarumWCFS1      MAKISGSDAVLKVIQKVGKHIYGLPGGSFDMNAIYNQRKTLKYIQVR 50
L.monocytogenesEGD-e      MKKVKASETLVQTLKNWGDHLYGFPGGSIDTVVDALRKEQEAIEFIHVR 50
                               *:.*:***:**.*:.*: .::: . :. :.:**

L.delbrueckiiATCCBAA-365      HEEAASLAASAEYKLTGKLGVCMSAGPGAHLMNGLYDAKYDKTPMVAL 100
L.delbrueckiiATCC11842      NEEAASLAASAEYKLTGKLGVCMSAGPGAHLMNGLYDAKYDKTPMVAL 100
L.delbrueckiiUFVH2b20      HEEAASLAASAEYKLTGKLGVCMSAGPGAHLMNGLYDAKYDKTPMVAL 83
L.gasseriATCC33323      HEEAGALAASAEYKISGKVGVCFGSAGPGAVHLMNGLYDAKYDKTPMVAI 100
L.johnsoniiNCC533      HEEAGALAASAEYKISGKVGVCFGSAGPGAVHLMNGLYDAKYDKTPMVAI 100
L.acidophilusNCFM      HEEAGALAASSEYKVTGKLGVCFGSAGPGAHLFNGLYDAKYDKTPMLAI 100
L.plantarumWCFS1      HEEAGALIAASADYKLTGKIGVCFGSAGPGAVHLLNGLYDAKEDGIPMLAI 100
L.monocytogenesEGD-e      HEEVATLAAAAYTKLTGKIGVALSIGGPGAHLNGLMYDAKMDHVPMLVL 100
                               :**..:***: .:::**.*:.. .**** **:*:*** ** * **..:

L.delbrueckiiATCCBAA-365      VANVPTPRQDINFFQAFDEMPWFRDVAVWVHQAKTKEALPVLMDTAIRQA 150
L.delbrueckiiATCC11842      VANVPTPRQDINFFQAFDEMPWFRDVAVWVHQAKTKEALPVLMDTAIRQA 150
L.delbrueckiiUFVH2b20      VANVPTPRQDINFFQAFDETPWFRDVAVWVHQAKTKEALPVLMDTAIRQA 133
L.gasseriATCC33323      VANVPTSRQDIDFFQAFDEKPFWDPVAVWNHQAKTAEVIPVLMDEAIRQA 150
L.johnsoniiNCC533      VANVPTSRQDIDFFQAFDEKPFWDPVAVWNHQAKTAEVIPVLMDEAIRQA 150
L.acidophilusNCFM      VANVPTSKQDIDFFQAFDEKWFLDASVWCASAKTPELIPVLTDEAIRQA 150
L.plantarumWCFS1      VAQVPTKRMNMDFFQAMNEEPIFDDVAVWNRRTAMTAESLPMMTDEAIRQA 150
L.monocytogenesEGD-e      AGQVTTDLNLTGFFQEVNLPALFEDVAVYNKQIDNAETLADVDEAIRTA 150
                               ..:*.* : .*** .: * .:.* . * .: : * *** *

L.delbrueckiiATCCBAA-365      YAKKGPVAVLVIPKDFGWQEIENYRVSASNH-VADNYAAPTAESIEAATK 199
L.delbrueckiiATCC11842      YAKKGPVAVLVIPKDFGWQEIENYRVSASNH-VADNYAAPTAESIEAATK 199
L.delbrueckiiUFVH2b20      YAKKGPVAVLVIPKDFGWQEIENYRVSASNH-VADNYAAPTAESIEAATK 182
L.gasseriATCC33323      YQRKGPVAVLILPKDFGWDKIEDNFRNNAAAHKVVPNFPAPRKEQVDKALE 200
L.johnsoniiNCC533      YQKKGPAVLIILPKDFGWDKIEDNFRNNAAAHKVVPNFPAPRKEQIDKALE 200
L.acidophilusNCFM      YARKGPVAVLIPKDYGWQKIEDNFRVSKKAQ-PKPNYPAPTETSVEEAVK 199
L.plantarumWCFS1      YAHNGVAVLTIIPKDFGWAEIEDNFETNASVH--TVNYPAPTAEVADAVK 198
L.monocytogenesEGD-e      YKEKGVAVLTIIPNDIPSQVIKASLEAKPVKF--EQENPKLDEAAIQEAVT 198
                               * .:* *** :*: * . . . : . : *

L.delbrueckiiATCCBAA-365      LIKEAKNPVVYFGLGASAAAEELKEFADKFKMPMSSYLGGKIVEDSFKP 249
L.delbrueckiiATCC11842      LIKEAKNPVVYFGLGASAAAEELKEFADKFKMPMSSYLGGKIVEDSFKP 249
L.delbrueckiiUFVH2b20      LIKEAKNPVVYFGLGASGAAEELKEFADKFKMPMSSYLGGKIVEDSFKP 232
L.gasseriATCC33323      LIKNAENPIVYFGHGAEDASAEELKEFSDFKMPVSSVLGGKIVEDFPA 250
L.johnsoniiNCC533      LIKEAKNPIIYFGHGAQDASAEELKEFSDFKMPVSSVLGGKIVEDFPA 250
L.acidophilusNCFM      LLKEAKNPTMYIGAGAKDAGEEVKEFAEKFKTPIIMSSYLGGKVVEDKFP 249
L.plantarumWCFS1      LIKAAKSPMIYFGVAKDAAEELKAASEKFKMPLVSSVLAKGIEDDYPA 248
L.monocytogenesEGD-e      LIEKAEPVILAGLGTKHAGPELIAFSEKLIKIPIIHSLPAKTIVPDDHPN 248
                               *:.*:* : * *:. * .: .:*** * : * .: : * .:

```

Figura 21 – Alinhamento da sequência parcial de aminoácidos da proteína Pox de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 com homólogos encontrados em outras bactérias gram-positivas (ClustalW2). (*) resíduos idênticos, (:) substituições conservadas – aminoácidos com propriedades químicas semelhantes e (.) substituições semi-conservadas – aminoácidos com conformação semelhantes.

Figura 21 (continuação)

L.delbrueckiiATCCBAA-365	YLGTIGRIGAKAPNEVQGHDTLTVVWVGNNSPFVSVLWFPKNAKVIQIDVDP	299
L.delbrueckiiATCC11842	YLGTIGRIGAKAPNEVQGHDTLTVVWVGNNSPFVSVLWSPKNAKVIQIDVDP	299
L.delbrueckiiUFVH2b20	YLGTIGRIGAKAPNEVQGHDTLTVVWVGNNSPFVSVLWFPKNAKVIQIDVDP	282
L.gasseriiATCC33323	YMGSIGRVGAKPSNDIQTHADLVVWVGNNSPFVSVFFFNPKAKVIQIDINS	300
L.johnsoniiNCC533	YMGSIGRVGAKPSNDIQTHADLVVWVGNNSPFVSVFFFNPKAKVIQIDINS	300
L.acidophilusNCFM	YIGTIGRIGPKAAQEVQATDLTVVWVGNNSPFVSVGLWFPKDAKVIQIDVDP	299
L.plantarumWCFS1	YLGSTGRVAPKPGAEIGFSTDLILWVGNNVFPFVSVFLFNKAKVIQIDIDS	298
L.monocytogenesEGD-e	ALGNLKGIGTKPAYEAMQETDLLLLMFGNDYPYSDYLP-KKTDICIQIDIDP	297
	:*. **:. .*. : :***: .**:*:* .: .*****:.	
L.delbrueckiiATCCBAA-365	EKQGKRHSVDVVSILADAKKSLRALIDAGEAREESPLYKAALADREEWDAW	349
L.delbrueckiiATCC11842	EKQGKRHSVDVVSILADAKKSLRALIDAGEAREESPLYKAALADREEWDAW	349
L.delbrueckiiUFVH2b20	EKQGKRHSVDVVSILADAKKSLRALIDAGEAREESPLYKAALADREEWDAW	332
L.gasseriiATCC33323	ERLGRHVAITVPMPLADAKKTLRALIEAGESRSESPLYKAALADRENWEAW	350
L.johnsoniiNCC533	ERLGRHVAITVPMPLADSKKTLRALIEAGEGRAESPLY-----	337
L.acidophilusNCFM	GKFGKRHSTDVSMPLADSKKALRALIEEGEERSESPLYKAAIADRENWDWA	349
L.plantarumWCFS1	EKFGKRHHTNVAIQADAKKALAAINAAGEARDDSAFYDAAVADKKNWDKW	348
L.monocytogenesEGD-e	AKISKRFPAIVGLVGDAAEIIISDLTAKIAPVEERKFLQACQENMQEWKWW	347
	: .** . * : .** : : : : : : :	
L.delbrueckiiATCCBAA-365	IASFADDHLKDEGRVVRQEP IWDVINKEAADNAVFAIDVGNVNMHDVRLLN	399
L.delbrueckiiATCC11842	IASFADDHLKDEDRVRQEP IWDVINKEAADNAVFAIDVGNVNMHDVRLLN	399
L.delbrueckiiUFVH2b20	TASFADDHLKDEGRVVRQEP IWDVINKEAADNAVFAIDVGNVNMHDARLLN	382
L.gasseriiATCC33323	LESFND---SDEIPMRVEP IFDVINKKAADDAVFAVDVGNVNIINFDRMLH	397
L.johnsoniiNCC533	-----KAANDAVFAVDVGNVNIINFDRMLH	361
L.acidophilusNCFM	EDSFKN---SDEMPVRPEP IWDVINKKAADNAIFAIDVGNVNVDSCLLN	396
L.plantarumWCFS1	QASFND---STESPVRPEP IFDVLNQEASDKAVWAIDVGNVNIINFERLIR	395
L.monocytogenesEGD-e	LEEDIA---QTSDDPIAEVVMANIQKIADKDAVFSIDVGTATVWSTYRLH	394
	* . . * : : : : : * : .	
L.delbrueckiiATCCBAA-365	MNGKQRWTTSGLYATMGYGSPPAAIAAATAMPDREVWHLAGDGGFAMMSEE	449
L.delbrueckiiATCC11842	MNGKQRWTTSGLYATMGYGSPPAAIAAATAMPDREVWHLAGDGGFAMMSEE	449
L.delbrueckiiUFVH2b20	MNGKQRWTTSGLYATMGYGSPPAAIAAATAMPDRVVWHLAGDGGFAMMSEE	432
L.gasseriiATCC33323	LHGDQKWTTSGLYATMGYGAPASLAAATIYPNREVWNLAGDGGFAMMNQE	447
L.johnsoniiNCC533	LHDDQKWTTSGLYATMGYGAPALAAATIYPKREVWNLAGDGGFAMMNQE	411
L.acidophilusNCFM	LHDDQKWTTSGLHATMGYGAPALMAATVYPDREVWNLAGDGGFAMMNQE	446
L.plantarumWCFS1	MHDDQKWATSGIYATMGFVPAALAAKVNYPDRDVYSLSGDGAFAMLSEE	445
L.monocytogenesEGD-e	LTPENDFIVSAWLGTMGCGLPAGIAAKKAFDPDRQAIIVGDGGFSMVMQD	444
	: . : : .* . .*** * * . : : * * . : ** . * : : :	
L.delbrueckiiATCCBAA-365	LLTLARYNMHVLTVVFTNETLGYIEAEQRDESNQPLSGV IIPDNDWAKVA	499
L.delbrueckiiATCC11842	LLTLARYNMHVLTVVFTNETLGYIEAEQRDESNQPLSGV IIPDNDWAKVA	499
L.delbrueckiiUFVH2b20	LLTLARYNMHV-----	443
L.gasseriiATCC33323	LLTQARYNMHVINVVFTNETLGYIEAEQVDESHQPLSGVKLPDNDWAMSA	497
L.johnsoniiNCC533	LLTQARYNMHI INVVFTNETLGYIEAEQVDESHQPLSGVKLPDNDWAMSA	461
L.acidophilusNCFM	LLTMSRYNMHVLNVVFTNETLGYIEAEQVDESHQPLSGV IIPDNNWAKVA	496
L.plantarumWCFS1	ILAQVKYNLHI INIVFSNETLGFIEAEQTDDSHQPLSGVDLPDNDWAKVG	495
L.monocytogenesEGD-e	FVTVAGLNMMPMIVVVLNNQQLSFIKYEQQSAG-ELNYAIDLDPINYAKFA	493
	: : : * : :	

```

L.delbrueckiiATCCBAA-365      MAKIKGANAVLDVMYKWGIDHLYGFPGGSFDMSTMNAIYEMQDKVKFIEVR 50
L.delbrueckiiATCC11842      MAKIKGANAVLDVMYKWGIDHLYGFPGGSFDMSTMNAIYEMQDKVKFIEVR 50
L.delbrueckiiUFVH2b20      -----GIDHLYGFPGGSFDMSTMNAIYEMQDKIKFIEVR 33
                               *****:*****

L.delbrueckiiATCCBAA-365      HEEAASLAASAEYKLTGKLGVCMSAGPGAIHLMNGLYDAKYDKTPMVAL 100
L.delbrueckiiATCC11842      NEEAASLAASAEYKLTGKLGVCMSAGPGAIHLMNGLYDAKYDKTPMVAL 100
L.delbrueckiiUFVH2b20      HEEAASLAASAEYKLTGKLGVCMSAGPGAIHLMNGLYDAKYDKTPMVAL 83
                               :*****

L.delbrueckiiATCCBAA-365      VANVPTPRQDINFFQAFDEMPWFRDVAVWVHQAKTKEALPVLMDTAIRQA 150
L.delbrueckiiATCC11842      VANVPTPRQDINFFQAFDEMPWFRDVAVWVHQAKTKEALPVLMDTAIRQA 150
L.delbrueckiiUFVH2b20      VANVPTPRQDINFFQAFDETPWFRDVAVWVHQAKTKEALPVLMDTAIRQA 133
                               *****

L.delbrueckiiATCCBAA-365      YAKKGPVAVLVI PKDFGWQEI EDNYRVSASNHVADNYAAPTAESEEAATKL 200
L.delbrueckiiATCC11842      YAKKGPVAVLVI PKDFGWQEI EDNYRVSASNHVADNYAAPTAESEEAATKL 200
L.delbrueckiiUFVH2b20      YAKKGPVAVLVI PKDFGWQEI EDNYRVSASNHVADNYAAPTAESEEAATKL 183
                               *****

L.delbrueckiiATCCBAA-365      IKEAKNPVVYFGLGASAAAEELKEFADKFKMPMSSYLKGGIVEDSFKPY 250
L.delbrueckiiATCC11842      IKEAKNPVVYFGLGASAAAEELKEFADKFKMPMSSYLKGGIVEDSFKPY 250
L.delbrueckiiUFVH2b20      IKEAKNPVVYFGLGASAAAEELKEFADKFKMPMSSYLKGGIVEDSFKPY 233
                               *****

L.delbrueckiiATCCBAA-365      LGTIGRIGAKAPNEVQGHDTLVVWVGNNSPF SVLWFPKNAKVIQIDVDPE 300
L.delbrueckiiATCC11842      LGTIGRIGAKAPNEVQGHDTLVVWVGNNSPF SVLWSPKNAKVIQIDVDPE 300
L.delbrueckiiUFVH2b20      LGTIGRLGAKAPNEVQGHDTLVVWVGNNSPF SVLWFPKNAKVIQIDVDPE 283
                               *****

L.delbrueckiiATCCBAA-365      KQGKRHSVDVSI LADAKKSLRALIDAGEAREESPLYKAALADREEDAWI 350
L.delbrueckiiATCC11842      KQGKRHSVDVSI LADAKKSLRALIDAGEAREESPLYKAALADREEDAWI 350
L.delbrueckiiUFVH2b20      KQGKRHSVDVSI LADAKKSLRALIDAGEAREESPLYKAALADREEDAWT 333
                               *****

L.delbrueckiiATCCBAA-365      ASFADDHLKDEGRVRQEP IWDVINKEADNAVFAIDVGNVNM DHVRL LNM 400
L.delbrueckiiATCC11842      ASFADDHLKDEDRVRQEP IWDVINKEADNAVFAIDVGNVNM DHVRL LNM 400
L.delbrueckiiUFVH2b20      ASFADDHLKDEGRVRQEP IWDVINKEADNAVFAIDVGNVNM DHARLLNM 383
                               *****

L.delbrueckiiATCCBAA-365      NGKQRWTTSGLYATMGYGS PAAIAAATAMPDREVWHLAGDGGFAMMSEEL 450
L.delbrueckiiATCC11842      NGKQRWTTSGLYATMGYGS PAAIAAATAMPDREVWHLAGDGGFAMMSEEL 450
L.delbrueckiiUFVH2b20      NGKQRWTTSGLYATMGYGS PAAIAAATAMPDRVWHLAGDGGFAMMSEEL 433
                               *****

L.delbrueckiiATCCBAA-365      LTLARYNMHVLTVVFTNETLGYIEAEQRDESNQPLSGVIIPDNDWAKVAE 500
L.delbrueckiiATCC11842      LTLARYNMHVLTVVFTNETLGYIEAEQRDESNQPLSGVIIPDNDWAKVAE 500
L.delbrueckiiUFVH2b20      LTLARYNMHV----- 443
                               *****

```

Figura 22 – Alinhamento da sequência parcial de aminoácidos da proteína Pox de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 com homólogos encontrados em *L. delbrueckii* ATCC 11842 e *L. delbrueckii* ATCC BAA-365. Os resíduos destacados em preto correspondem a parte do domínio de ligação a TPP identificado nesta proteína (ClustalW2). (*) resíduos idênticos, (:) substituições conservadas – aminoácidos com propriedades químicas semelhantes e (.) substituições semi-conservadas – aminoácidos com conformação semelhantes.

4.1.9. Relacionamento Filogenético da enzima piruvato oxidase de *L. delbrueckii* UFV H2b20 com homólogos de outras bactérias gram-positivas.

Árvores filogenéticas foram reconstruídas com base na sequência parcial do gene *pox* de *L. delbrueckii* UFV H2b20 e de outras bactérias gram-positivas, bem como na sequência parcial de aminoácidos da proteína Pox (Figuras 23, 24, 25 e 26). Independente do método utilizado, todas as árvores reconstruídas apresentam a sequência correspondente a *L. delbrueckii* UFV H2b20 agrupada junto às sequências de *L. delbrueckii* ATCC 11842 e *L. delbrueckii* ATCC BAA-365.

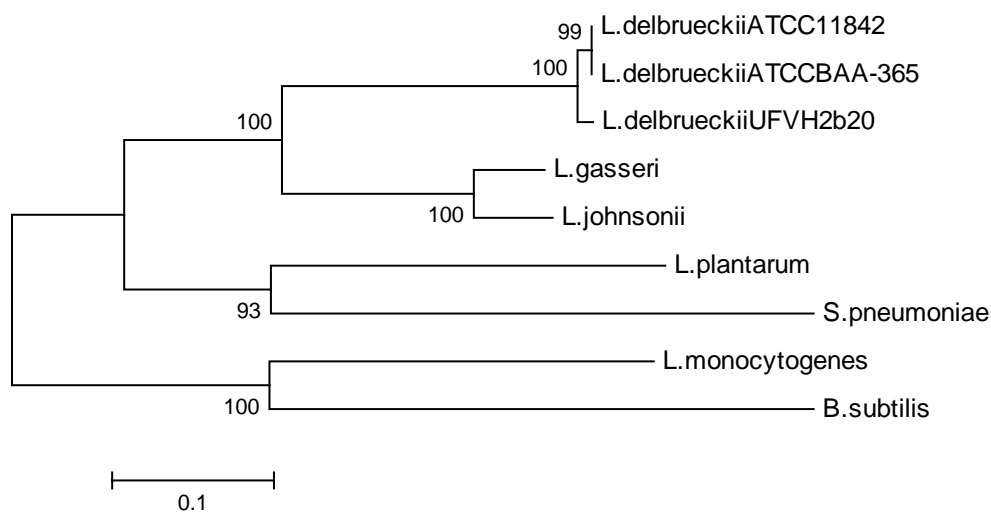


Figura 23 - Árvore filogenética reconstruída com homólogos do gene *pox* pelo método de *Neighbor-Joining* utilizando o programa MEGA 4.

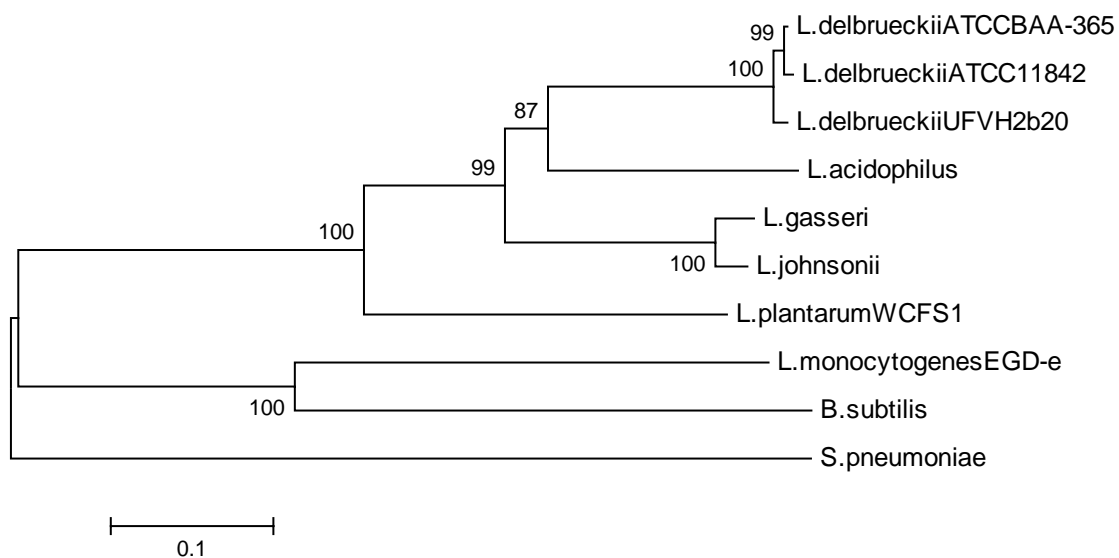


Figura 24 - Árvore filogenética reconstruída com base na sequência de aminoácidos da proteína Pox pelo método de *Neighbor-Joining* utilizando o programa MEGA4.

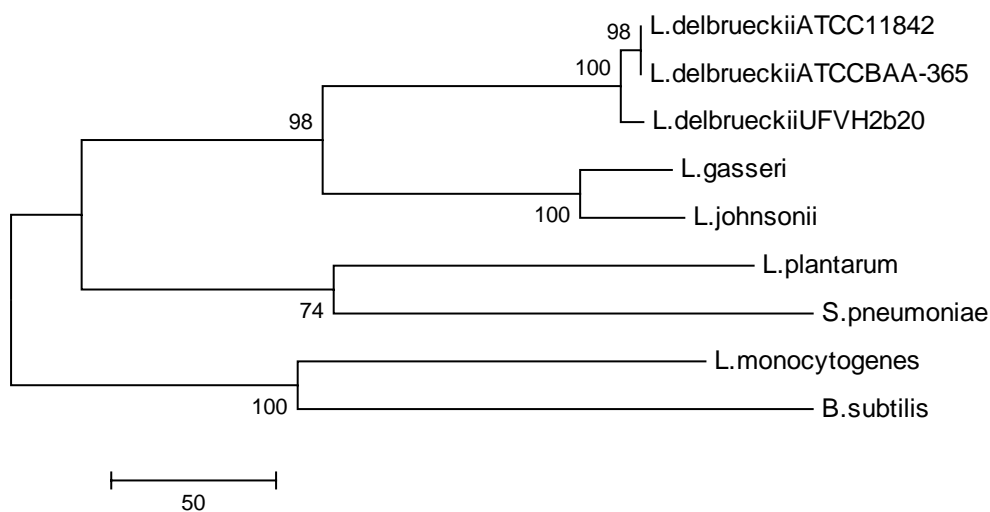


Figura 25 - Árvore filogenética reconstruída com homólogos do gene *pox* pelo método de Máxima Parcimônia utilizando o programa MEGA 4.

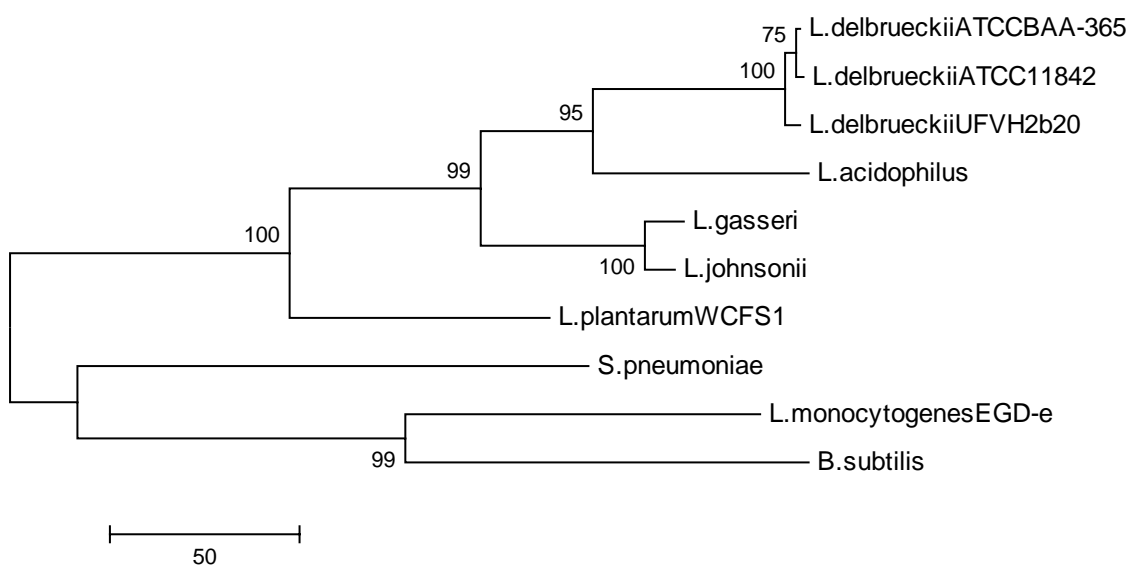


Figura 26 - Árvore filogenética reconstruída com base na sequência de aminoácidos da proteína Pox pelo método de Máxima Parcimônia utilizando o programa MEGA 4.

4.1.10. Sequência de gene homólogo a *sigA* de *L. delbrueckii* UFV H2b20

Um gene homólogo a *sigA* foi detectado em *L. delbrueckii* UFV H2b20 por reação de PCR e seqüenciado a fim de utilizá-lo como gene de referência para normalização das reações de PCR em tempo real.

Como resultado do seqüenciamento do produto de PCR referente a este gene foi obtida uma sequência de 972 pares de base (Figura 27), a qual apresenta 99% de identidade com as seqüências de *L. delbrueckii bulgaricus* ATCC 11842 e *L. delbrueckii bulgaricus* ATCC BAA-365.

Uma característica única do genoma de *L. delbrueckii bulgaricus* é que este codifica duas proteínas homólogas a SigA, Ldb1245 e Ldb1246, que possuem 58% de identidade e cujos genes se organizam *in tandem*, sendo estes co-transcritos (VAN DE GUCHTE et al., 2006). O gene homólogo a *sigA*, Ldb1245, foi utilizado por PENAUD et al. (2006) como gene controle ou de referência para análise da expressão de uma CPX-ATPase por PCR em tempo real em *L. delbrueckii* ATCC 11842. A expressão deste gene foi avaliada em condições de estresse ácido e o mesmo escolhido como controle após a verificação que a expressão do mesmo não foi significativamente afetada em tais condições.

A expressão deste gene foi avaliada em *L. delbrueckii* UFV H2b20 nas condições de estresse oxidativo e não foram detectadas mudanças significativas até a entrada da fase estacionária de crescimento, sendo assim um bom candidato a ser utilizado como gene de referência nestas condições.

1 GATGCCGAAACTGCCAAGCTGGTAGAAGAGTTTGCGGACAATGGGATTAGAATCGTTGAC
D A E T A K L V E E F A D N G I R I V D
61 GACCAGGGTGAACCGTCTGCTCTGGCCCTCAGGGCTGAAGAAGAAGCTGAAAAGAAAGAA
D Q G E P S A L A L R A E E E A E K K E
121 CAAAAAGAAGTGGTCGCTTCCAGCGACAATGACCGGGTTTACGACTCGGTTCCGGATGTAT
Q K E L V A S S D N D R V Y D S V R M Y
181 TTAAAGGAAATCGGCAAGGTCCCGCTTTTGGAGCCGGGACGAAGAAGTAGAAGTAGCCAAG
L K E I G K V P L L S R D E E V E V A K
241 CGGATTGAAAACGGCGATGAGTCAGCCAAGGATGAACTGGCCGCCGCAACCTCCGTTTG
R I E N G D E S A K D E L A A A N L R L
301 GTTGTCTCCATTGCCAAGCGCTATGCCAAGCACAATGGGAAGATGGGGATCCTGGACTTG
V V S I A K R Y A K H N G K M G I L D L
361 ATCCAGGAGGGCAATATCGGCCTGATGAAGGCAGTTGACAAGTTCGACTACTCCAAGGGC
I Q E G N I G L M K A V D K F D Y S K G
421 TTTAAGTTTTCAACTTATGCTACCTGGTGGATCCGGCAGGCCATTACCCGGGCCCTGGCT
F K F S T Y A T W W I R Q A I T R A L A
481 GACCAGGACCGGATGATCAGAATCCCGGTTACGTAGTGAAAGCATAAACAAGATGAAC
D Q D R M I R I P V H V V E S I N K M N
541 CGGATCCAGCGGACTCTGCAGCAGGACCTGGACCGGGATGCCAAGCCGGAAGAGCTGGCT
R I Q R T L Q Q D L D R D A K P E E L A
601 GCGGAAATGAATGAACCTTTGCAGAAAGTGCAGGAAATTATCACGGTAGCCAAGAACCAG
A E M N E P L Q K V Q E I I T V A K N Q

Figura 27 – Sequência parcial do gene homólogo a *sigA* de *L. delbrueckii* UFV H2b20 e da proteína correspondente. A sequência de aminoácidos da ORF que codifica a proteína homóloga a SigA está mostrada abaixo da sequência de nucleotídeos.

Figura 27 (continuação)

661 GAAACTGACTCTTTGGACAAGCCGTTGGCGAAGAAGGGGACTCGCAATTGGGGGACCTT
E T D S L D K P V G E E G D S Q L G D L

721 TTGGAAGACAACAAGGCAATCAACCCGGAAGAATACACTGCTTTTGAAATGCTGAAGGAC
L E D N K A I N P E E Y T A F E M L K D

781 CAACTGTCCAGCATGATGGGTGAGTTCCTGACTGACAGAGAAGCTAAGGTCTTGAAGCTG
Q L S S M M G E F L T D R E A K V L K L

841 CGCTTCGGCCTGGAAAACGATGAGCCGCACACTCTGGAAGAAGTTGGCCGCAGTCTGGGC
R F G L E N D E P H T L E E V G R S L G

901 GTTACCCGGGAACGGGTCCGGCAGATTGAAGCTAAGGCTGTTAAGAAGTTGAAGCACCCAC
V T R E R V R Q I E A K A V K K L K H H

961 TCAAACCTGCTC
S N L L

4.2. Análise da expressão dos genes *spx*, *dps* e *pox* e da atividade da enzima piruvato oxidase de *L. delbrueckii* UFV H2b20.

4.2.1. Avaliação da expressão do gene *spx* por PCR em tempo real em condições de estresse oxidativo.

A expressão do gene *spx* de *L. delbrueckii* UFV H2b20 foi avaliada sob condições de estresse oxidativo. A figura 28 apresenta as curvas de crescimento de *L. delbrueckii* UFV H2b20, inicialmente em anaerobiose, seguida pela transferência para condições de aerobiose.

De acordo com o padrão de crescimento de *L. delbrueckii* nas condições testadas, pode-se concluir que o peróxido de hidrogênio exerce um efeito inibitório importante sobre o crescimento deste microrganismo. Ao cultivá-lo em condições de anaerobiose alta densidade celular foi alcançado ao final do período de cultivo, entretanto, ao se transferir a cultura para condições de aerobiose ocorreu inibição do crescimento. Ao se acrescentar catalase ao meio de cultivo em aerobiose, grande parte deste efeito foi eliminado, podendo este ser atribuído, portanto, a produção de peróxido de hidrogênio durante o crescimento de *L. delbrueckii* UFV H2b20 em aerobiose.

Para avaliar a expressão do gene *spx* nestas condições, amostras foram coletadas conforme indicado nas curvas de crescimento abaixo (Figuras 29 e 30).

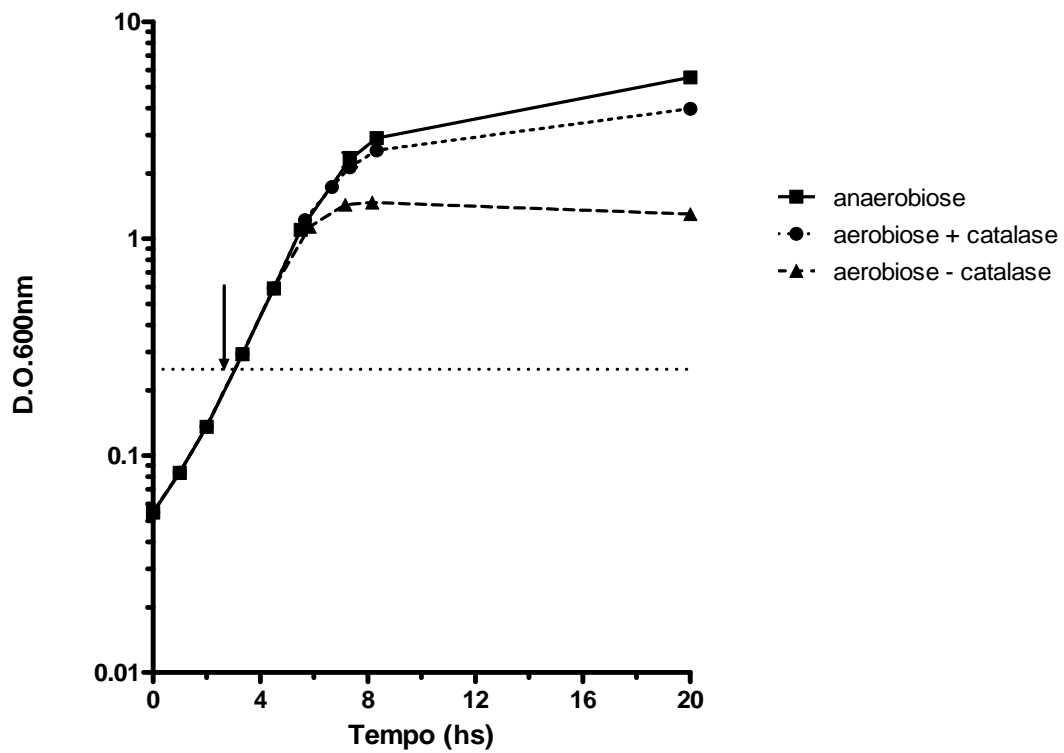


Figura 28 – Crescimento de *L. delbrueckii* UFV H2b20 em condição de anaerobiose, seguida pela transferência para condição de aerobiose (130 rpm). A seta indica o momento da transferência.

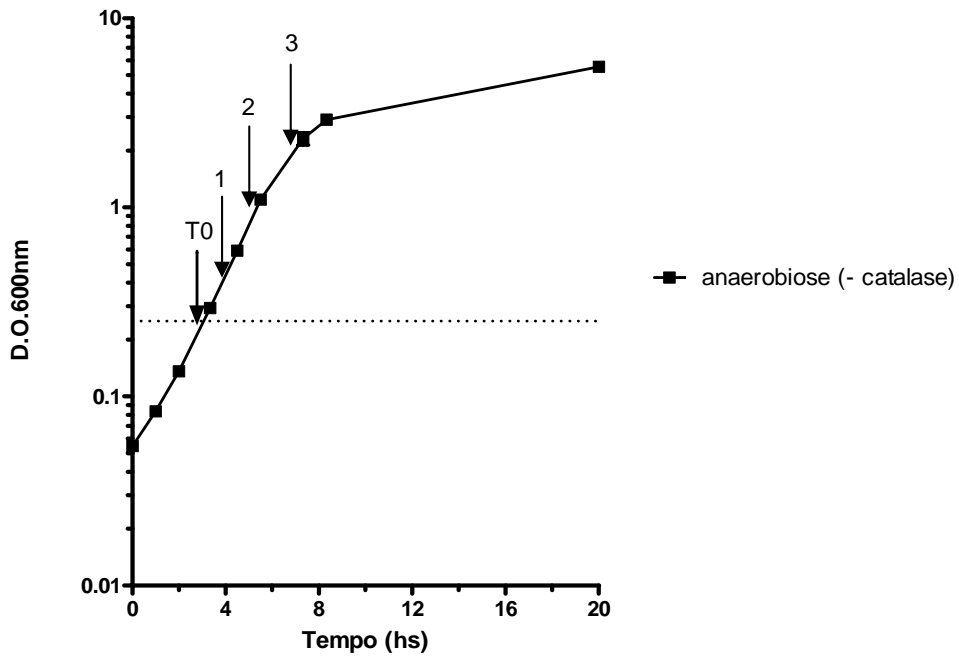


Figura 29 – Crescimento de *L. delbrueckii* UFV H2b20 em MRS contendo 2% de glicose em anaerobiose. As setas indicam as amostras coletadas para análise da expressão gênica por PCR em tempo real.

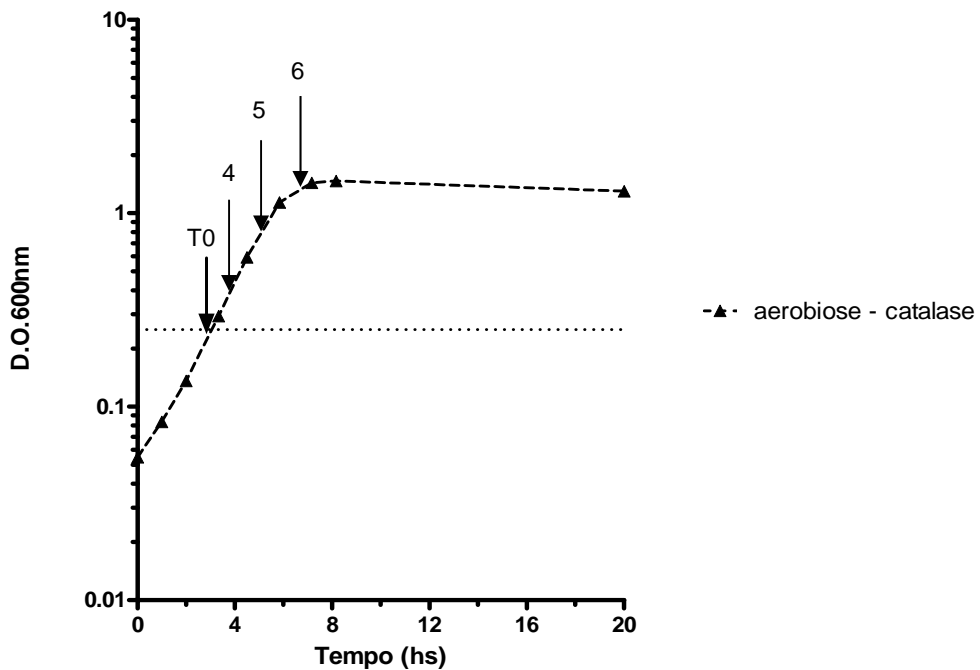


Figura 30 - Crescimento de *L. delbrueckii* UFV H2b20 em MRS contendo 2% de glicose em aerobiose. As setas indicam as amostras coletadas para análise da expressão gênica por PCR em tempo real.

A figura 31 apresenta a expressão relativa do gene *spx* ao longo do crescimento de *L. delbrueckii* UFV H2b20 em condições de anaerobiose e após a transferência do mesmo para condições de aerobiose. Os pontos de coleta estão indicados nas figuras 29 e 30. (1 a 3 - anaerobiose; 4 a 6 - aerobiose). De acordo com os resultados apresentados na figura 31, a expressão de *spx* foi significativamente ($p < 0,001$) afetada após a transferência para condições de aerobiose.

Com o objetivo de confirmar o efeito do oxigênio na expressão do gene *spx*, *L. delbrueckii* UFV H2b20 foi também cultivado em aerobiose e em seguida transferido para condições de anaerobiose. As figuras 32, 33 e 34 apresentam as curvas de crescimento de *L. delbrueckii* UFV H2b20 obtidas nestas condições e os pontos onde amostras foram coletadas para avaliação da expressão gênica.

A figura 35 apresenta a expressão relativa do gene *spx* ao longo do crescimento de *L. delbrueckii* UFV H2b20 em condições de aerobiose e após a transferência do mesmo para condições de anaerobiose. Os pontos de coleta estão indicados nas figuras 33 e 34. (1 a 3 - aerobiose; 4 a 6 - anaerobiose).

Os resultados obtidos neste experimento confirmam os resultados anteriores, sendo que a expressão deste gene foi induzida pela presença de oxigênio. Na ausência de oxigênio o aumento da expressão foi gradual atingindo valores mais elevados no início da fase estacionária de crescimento.

Em *B. subtilis*, o gene *spx* faz parte do regulon PerR, o qual reprime a expressão deste gene em condições normais de crescimento. Além de PerR, outro repressor, denominado YodB também controlada a expressão do gene *spx*. Na presença de peróxido de hidrogênio ambos os repressores se ligam fracamente a região promotora, ocorrendo assim o aumento da expressão do gene *spx* (LEELAKRIANGSAK et al., 2007). YOU et al., 2008 observou que a expressão do operon *msrAB*, que codifica duas metioninas sulfoxido redutases, em *B. subtilis* também é regulada por Spx, sendo induzida na presença de *paraquat*, o qual é capaz de gerar ânions superóxido. Assim, estes resultados indicam que possivelmente o efeito do oxigênio na expressão do gene *spx* em *L. delbrueckii* UFV H2b20 se deve a presença de espécies reativas de oxigênio geradas durante o crescimento em condição de aerobiose.

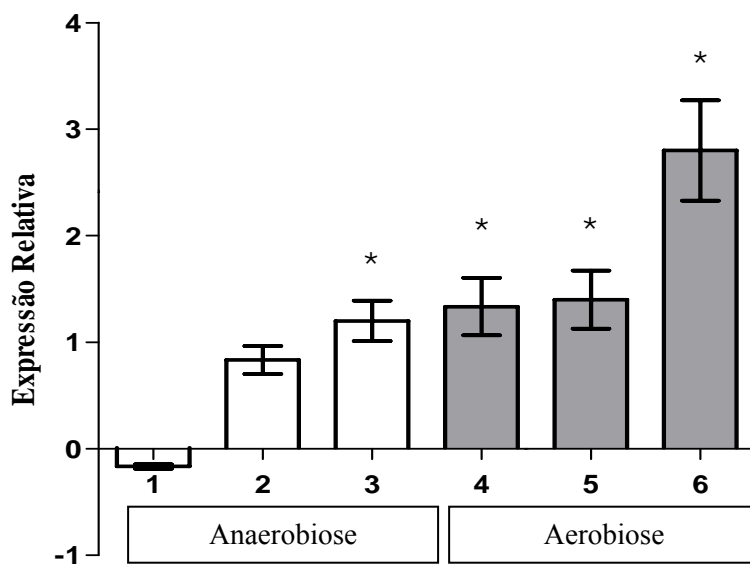


Figura 31 – Expressão relativa do gene *spx* em MRS contendo 2% de glicose sob anaerobiose (1-3) e após a transferência para condição de aerobiose (4-6), de acordo com os resultados obtidos pelo software REST[®]. (* p<0,001)

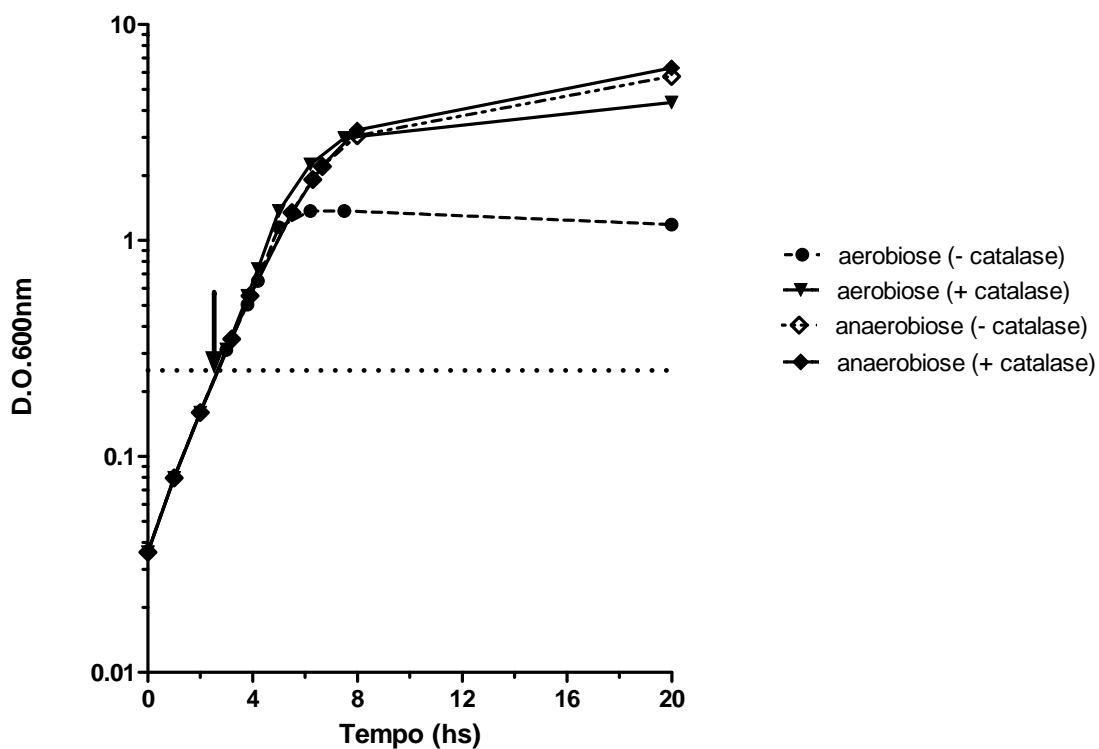


Figura 32 - Crescimento de *L. delbrueckii* UFV H2b20 em MRS 2% de glicose em aerobiose (130 rpm), seguida pela transferência para anaerobiose. A seta indica o momento da transferência.

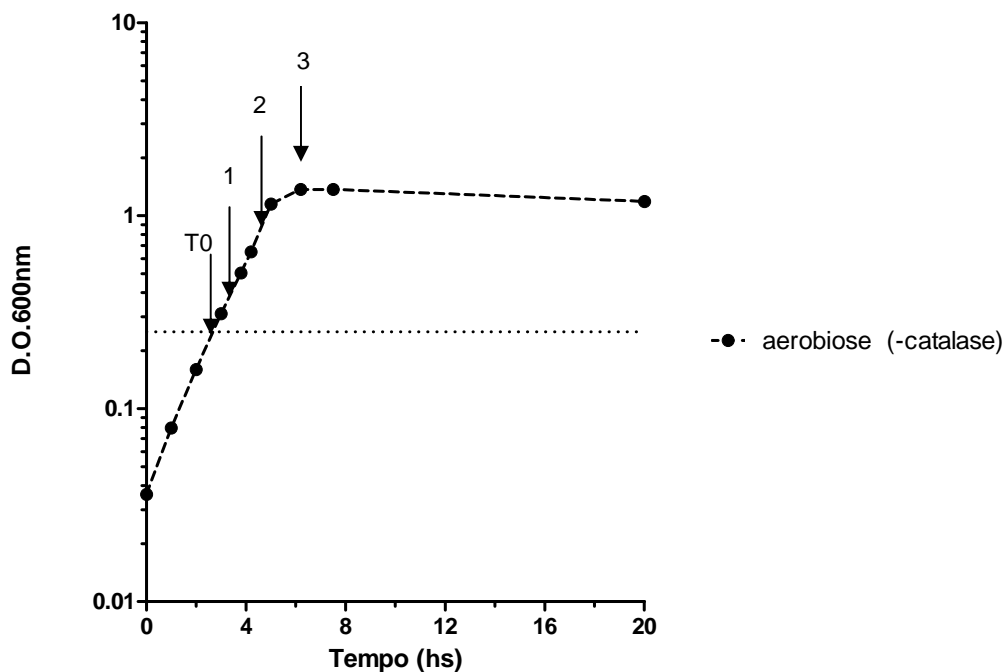


Figura 33 - Crescimento de *L. delbrueckii* UFV H2b20 em MRS 2% de glicose em aerobiose (130 rpm). As setas indicam as amostras coletadas para análise da expressão gênica por PCR em tempo real.

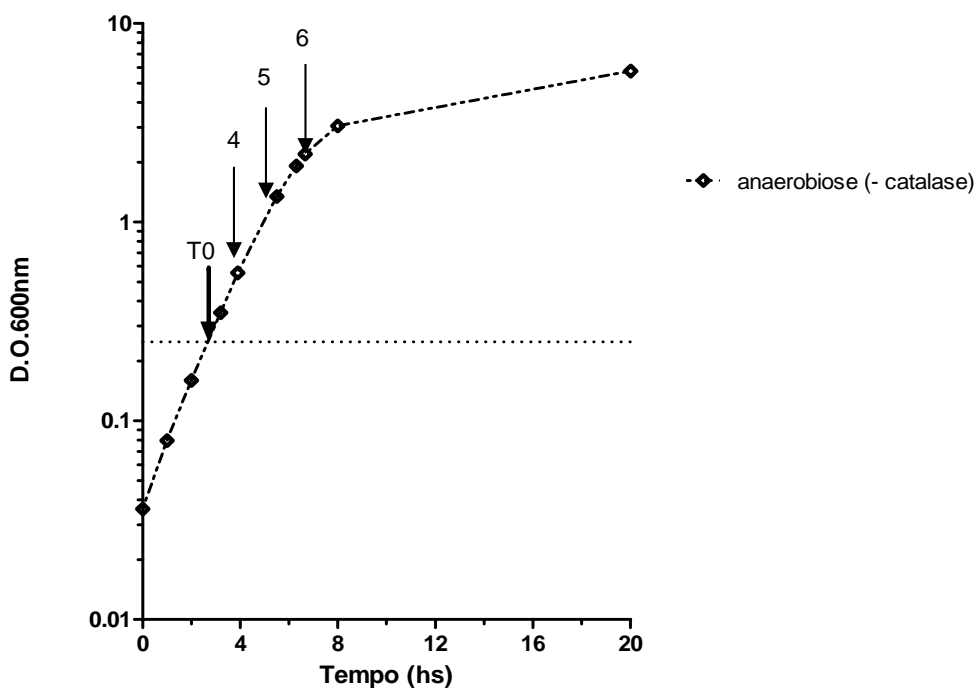


Figura 34 – Crescimento de *L. delbrueckii* UFV H2b20 em MRS 2% de glicose em anaerobiose. As setas indicam as amostras coletadas para análise da expressão gênica por PCR em tempo real

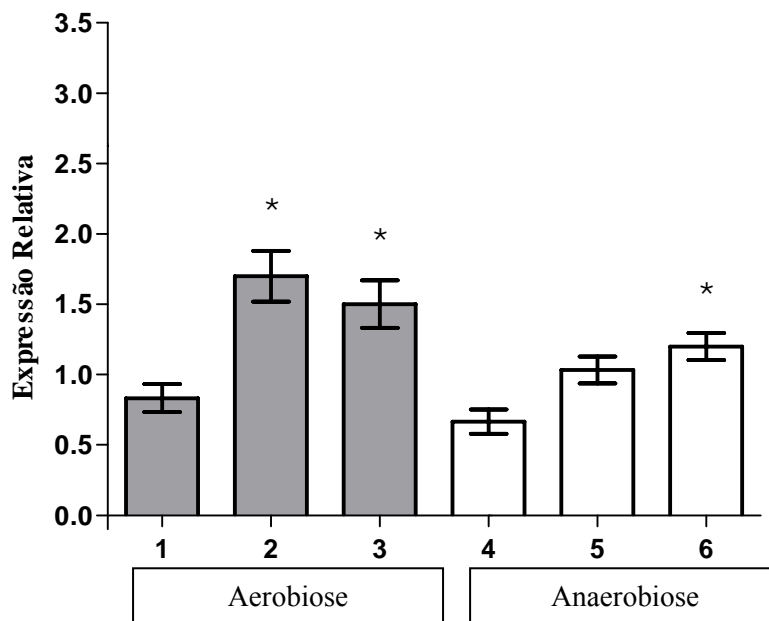


Figura 35 – Expressão relativa do gene *spx* em MRS contendo 2% de glicose sob aerobiose (1-3) e após a transferência para condição de anaerobiose (4-6), de acordo com os resultados obtidos pelo software REST[®]. (* $p < 0,05$).

Uma observação importante é que, de acordo com os dados disponíveis dos genomas de diversas bactérias lácticas, especialmente espécies de *Lactobacillus*, não foram encontrados homólogos das proteínas PerR ou YodB, as quais regulam negativamente a expressão de *spx*. Assim, futuras investigações a fim de se esclarecer os mecanismos de regulação deste gene em *Lactobacillus* seriam importantes para se conhecer melhor a resposta destes microrganismos ao estresse oxidativo.

Além de sua importância na resposta ao estresse oxidativo em *B. subtilis*, o gene *spx* também parece estar envolvido com a regulação de outras funções importantes em *Staphylococcus aureus*. Mutantes para este gene apresentaram alta sensibilidade a uma variedade de condições de estresse como choque frio e térmico, alta osmolaridade, além da presença de peróxido. Além disso, mesmo em condições normais de crescimento estes mutantes apresentavam tamanho reduzido de colônias e tempo de geração muito mais longo. Foram também observadas mudanças na agregação celular especialmente na entrada da fase estacionária de crescimento, sendo que estes mutantes formavam densos aglomerados de células, enquanto células superexpressando *Spx* apresentavam a tendência de permanecer isoladas. Assim, *Spx* parece afetar a adesão célula-célula durante a fase estacionária de crescimento (PAMP et al., 2006).

Portanto, estes fatores podem estar relacionados ao aumento da expressão de *spx* no início da fase estacionária quando *L. delbrueckii* UFV H2b20 foi cultivado em anaerobiose.

4.2.2. Avaliação da expressão do gene *dps* por PCR em tempo real em condições de estresse oxidativo.

A avaliação da expressão do gene *dps* de *L. delbrueckii* UFV H2b20 foi feita utilizando as mesmas condições e amostras descritas anteriormente para o gene *spx*.

A figura 36 apresenta a expressão relativa do gene *dps* ao longo do crescimento de *L. delbrueckii* UFV H2b20 em condições de anaerobiose e após a transferência do mesmo para condições de aerobiose. Os pontos de coleta estão indicados nas figuras 29 e 30 (1 a 3 - anaerobiose; 4 a 6 - aerobiose).

De acordo com os resultados apresentados, a expressão de *dps* foi significativamente ($p < 0,05$) afetada após a transferência para condições de aerobiose. Além disso, observa-se que a transcrição gene *dps* também é fortemente induzida no início da fase estacionária de crescimento. COHEN et al, 2006, analisando o proteoma de *L. plantarum* durante a fase logarítmica e estacionária de crescimento observou o aumento da expressão de várias proteínas de resposta a estresse no início da fase estacionária, dentre as quais está a proteína Dps. A proteína Dps foi inicialmente caracterizada em *E. coli* por formar cristais em células em condição de restrição de nutrientes como mecanismo de proteção ao DNA da célula. A proteção cruzada entre as respostas ao estresse oxidativo e nutricional já foi descrito para várias bactérias.

Assim, os resultados obtidos estão de acordo com o que já foi demonstrado para outras bactérias e confirmam que também em *L. delbrueckii* UFV H2b20 esta proteína parece estar envolvida na resposta ao estresse oxidativo e nutricional.

A figura 37 apresenta a expressão relativa do gene *dps* ao longo do crescimento de *L. delbrueckii* UFV H2b20 em condições de aerobiose e após a transferência do mesmo para condições de anaerobiose. Os pontos de coleta estão indicados nas figuras 33 e 34. (1 a 3 - aerobiose; 4 a 6 - anaerobiose).

Os resultados obtidos neste experimento confirmam os resultados anteriores, sendo que a expressão deste gene foi induzida pela presença de oxigênio. Na ausência de oxigênio o aumento da expressão foi gradual atingindo valores mais elevados no início da fase estacionária de crescimento.

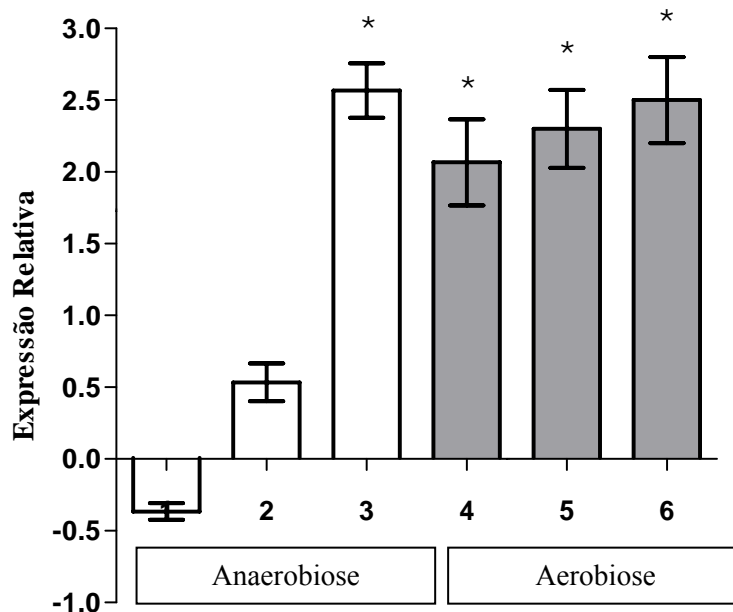


Figura 36 – Expressão relativa do gene *dps* em MRS contendo 2% de glicose sob anaerobiose (1-3) e após a transferência para condição de aerobiose (4-6), de acordo com os resultados obtidos pelo software REST[®]. (* p<0,05).

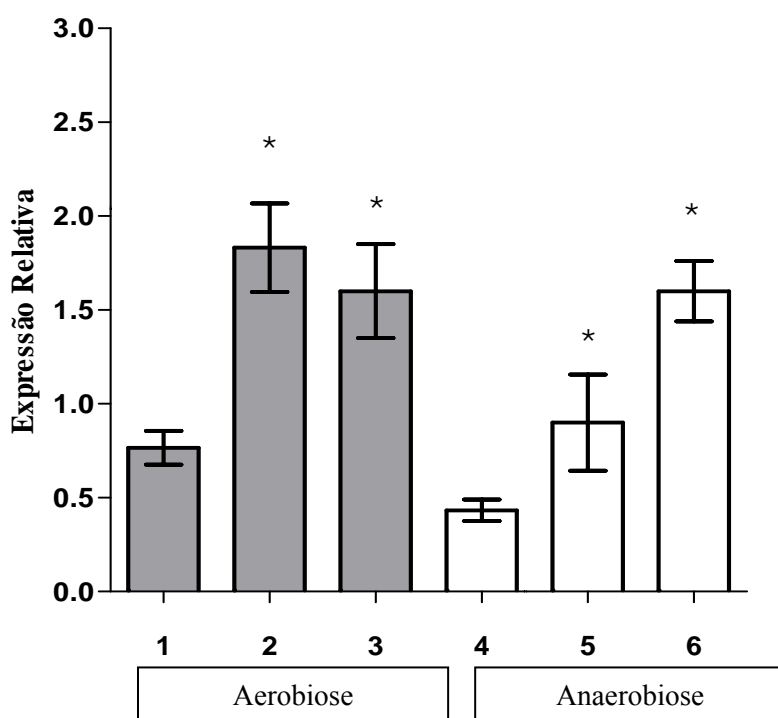


Figura 37 – Expressão relativa do gene *dps* em MRS contendo 2% de glicose sob aerobiose (1-3) e após a transferência para condição de anaerobiose (4-6) de acordo com os resultados obtidos pelo software REST[®]. (* p<0,05).

Outro experimento foi realizado com o objetivo de avaliar se parte da indução observada para o gene *dps* se deve a presença de espécies reativas de oxigênio, como por exemplo peróxido de hidrogênio. Neste experimento, *L. delbrueckii* UFV H2b20 foi cultivado em anaerobiose e concentrações crescentes de peróxido de hidrogênio (0,1 mM, 0,2 mM e 0,4 mM) foram adicionadas a cultura durante a fase logarítmica de crescimento. As amostras foram coletadas após 30 e 60 minutos da adição do peróxido. A figura 38 apresenta o efeito do peróxido na indução do gene *dps*.

De acordo com os resultados obtidos, observa-se que houve um aumento significativo ($p < 0,001$) da expressão deste gene em resposta a presença de peróxido no meio de cultivo. O nível de indução na expressão deste gene foi dependente da concentração de peróxido utilizada, ou seja, à medida que a concentração de peróxido foi aumentada ocorreu também uma maior indução deste gene.

Observa-se também que, para todas as concentrações testadas, a indução foi gradual e alcançou níveis mais elevados após 60 minutos de incubação.

Estes resultados comprovam que a indução do gene *dps* se deve à presença de peróxido de hidrogênio gerado durante o crescimento desta bactéria em condição de aerobiose.

ALMIRON et al. (1992) demonstrou que a adição de baixas concentrações de peróxido durante a fase logarítmica resultava na indução do gene *dps* em *E.coli* e que mutantes para este gene eram extremamente sensíveis ao peróxido. Desta forma, estes resultados indicam que Dps é importante não apenas na fase estacionária, mas também na resposta ao estresse oxidativo independentemente da fase de crescimento.

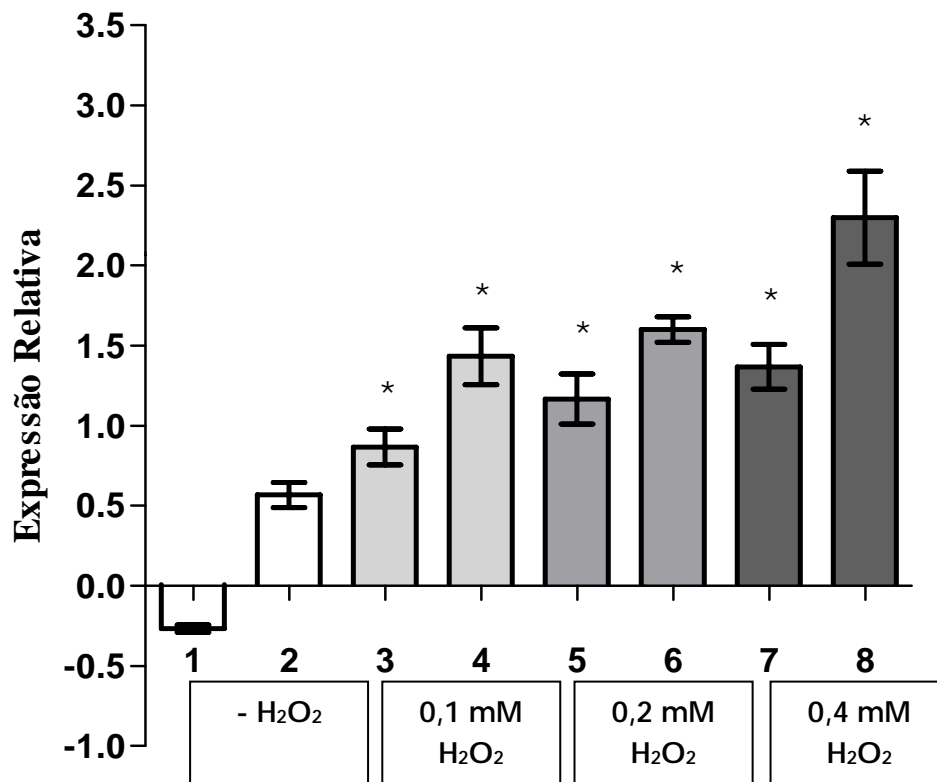


Figura 38 – Efeito de peróxido de hidrogênio na expressão do gene *dps* de *L. delbrueckii* UFV H2b20, de acordo com os resultados obtidos pelo software REST[®] (* p<0,001). (1) T30 sem adição de H₂O₂ (2) T60 sem adição de H₂O₂ (3) T30 0,1 mM H₂O₂ (4) T60 0,1 mM H₂O₂(5) T30 0,2 mM H₂O₂ (6) T60 0,2 mM H₂O₂ (7) T30 0,4 mM H₂O₂ (8) T60 0,4 mM H₂O₂.

4.2.3. Avaliação da expressão do gene *pox* por PCR em tempo real em condições de estresse oxidativo.

A avaliação da expressão do gene *pox* de *L. delbrueckii* UFV H2b20 foi feita utilizando as mesmas condições e amostras descritas anteriormente para o gene *spx*.

A figura 39 apresenta a expressão relativa do gene *pox* ao de *L. delbrueckii* UFV H2b20 em condições de anaerobiose e após a transferência do mesmo para condições de aerobiose. Os pontos de coleta estão indicados nas figuras 29 e 30 (1 a 3 - anaerobiose; 4 a 6 - aerobiose).

De acordo com os resultados apresentados, a expressão de *pox* foi significativamente reprimida sob condição de anaerobiose. Observa-se também que após a transferência para condições de aerobiose ocorreu um rápido e significativo ($p < 0,05$) aumento na expressão deste gene.

A figura 40 apresenta a expressão relativa do gene *pox* de *L. delbrueckii* UFV H2b20 em condições de aerobiose e após a transferência do mesmo para condições de anaerobiose. Os pontos de coleta estão indicados nas figuras 33 e 34. (1 a 3 - aerobiose; 4 a 6 - anaerobiose).

Os resultados obtidos neste experimento mostram que ocorreu uma significativa ($p < 0,05$) repressão da transcrição do gene *pox* em resposta a transferência da condição de aerobiose para a condição de anaerobiose, confirmando que o controle da transcrição do mesmo é extremamente sensível a presença ou ausência de oxigênio.

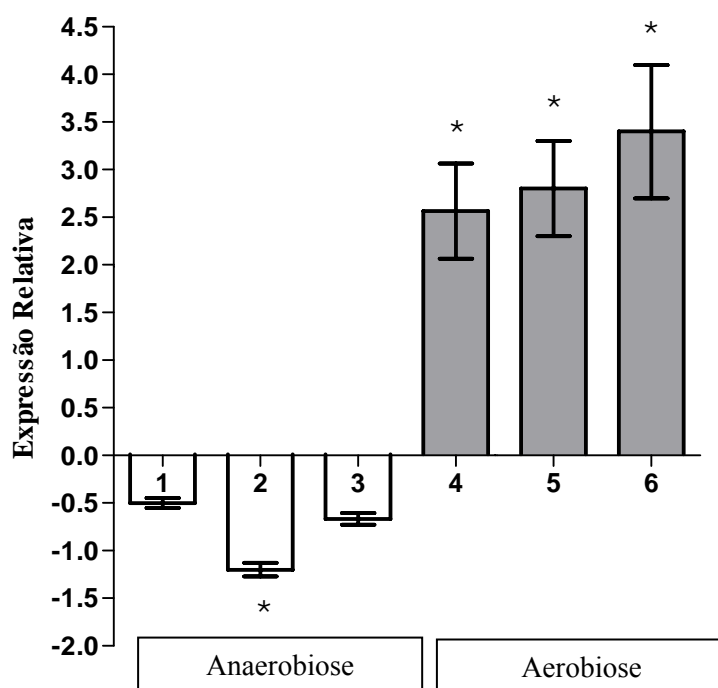


Figura 39 – Expressão relativa do gene *pox* em MRS contendo 2% de glicose sob anaerobiose (1-3) e após a transferência para condição de aerobiose (4-6), de acordo com os resultados obtidos pelo software REST[®]. (* p<0,05).

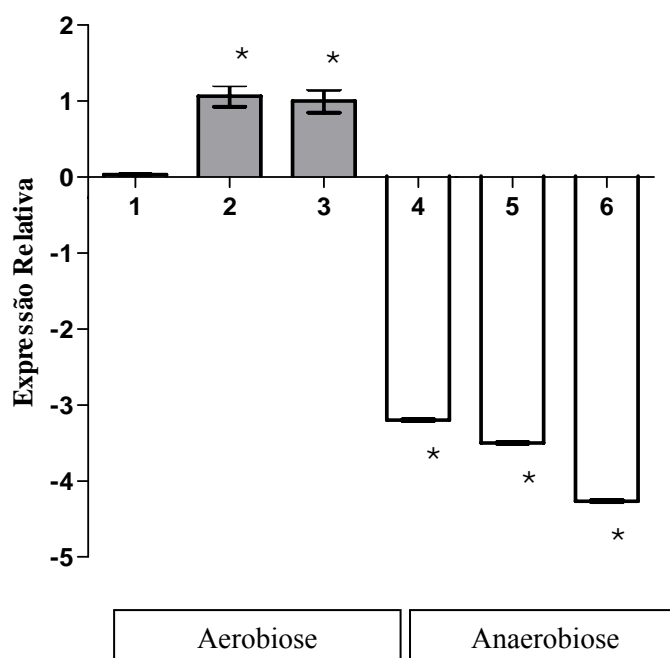


Figura 40 – Expressão relativa do gene *pox* em MRS contendo 2% de glicose sob aerobiose (1-3) e após a transferência para condição de anaerobiose (4-6), de acordo com os resultados obtidos pelo software REST[®]. (* p<0,05).

Segundo LORQUET et al. (2004) a expressão do gene *pox* em *L. plantarum* é induzida por oxigênio e peróxido e reprimida por glicose. Assim, para avaliar se os mesmos efeitos são encontrados em *L. delbrueckii* UFV H2b20, este foi cultivado em condições semelhantes às descritas anteriormente, porém utilizou-se meio de cultivo contendo apenas 0,2% de glicose.

A figura 41 apresenta as curvas de crescimento de *L. delbrueckii* UFV H2b20, inicialmente em anaerobiose, seguida pela transferência para condições de aerobiose em 0,2% de glicose.

Para avaliar a expressão do gene *pox* nestas condições, amostras foram coletadas conforme indicado nas curvas de crescimento (Figuras 42 e 43).

A figura 44 apresenta a expressão relativa do gene *pox* de *L. delbrueckii* UFV H2b20 em condições de anaerobiose e após a transferência do mesmo para condições de aerobiose quando cultivado em 0,2% de glicose. Os pontos de coleta estão indicados nas figuras 42 e 43. (1 a 3 - anaerobiose; 4 a 6 - aerobiose). De acordo com os resultados apresentados na figura 44, a expressão de *pox* foi significativamente ($p < 0,001$) induzida após a transferência para condições de aerobiose.

L. delbrueckii UFV H2b20 foi também cultivado em aerobiose e em seguida transferido para condições de anaerobiose em meio de cultivo contendo 0,2% de glicose. As figuras 45, 46 e 47 apresentam as curvas de crescimento de *L. delbrueckii* UFV H2b20 obtidas nestas condições e os pontos onde amostras foram coletadas para avaliação da expressão gênica.

A figura 48 apresenta a expressão relativa do gene *pox* de *L. delbrueckii* UFV H2b20 em condições de aerobiose e após a transferência do mesmo para condições de anaerobiose. Os pontos de coleta estão indicados nas figuras 46 e 47. (1 a 3 - aerobiose; 4 a 6 - anaerobiose).

Observa-se que semelhante ao resultado encontrado para 2% de glicose, ocorreu uma forte repressão em resposta a remoção da condição de aerobiose.

Comparando-se os resultados obtidos para ambas as concentrações de açúcar, observa-se que ao contrario do resultado obtido com 2% de glicose (Figuras 39 e 40), ocorreu uma indução na expressão deste gene na presença de 0,2% de glicose mesmo em condições de anaerobiose (Figura 44). Além disso, quando a cultura foi transferida da condição de anaerobiose para aerobiose observou-se uma indução da expressão gênica mais elevada na presença de 0,2% de glicose (Figura 44). Estes resultados sugerem que a expressão do gene *pox* é controlado não apenas pela presença ou ausência de oxigênio, mas também por repressão catabólica.

LORQUET et al. 2004 caracterizou em *L. plantarum*, a regulação da transcrição do gene *poxB*, que codifica a enzima piruvato oxidase, em relação a repressão por glicose e aeração. A

regulação por glicose foi confirmada por análises de *Northern blot* e *primer extension* que demonstraram que a transcrição do gene *poxB* é reprimida por excesso de glicose. O envolvimento da proteína CcpA nos mecanismos de regulação foi demonstrado pelo alívio da repressão catabólica em mutantes nulos para o gene *ccpA*. Além disso, uma análise de *footprinting in vivo* demonstrou que ocorria uma proteção dependente de CcpA do sítio *cre* encontrado na região -35 do gene *poxB*. Outro aspecto observado por análises de *Northern Blot* é que a indução deste gene pelo oxigênio ocorre a nível de transcrição, entretanto, a direta função do oxigênio não foi determinada.

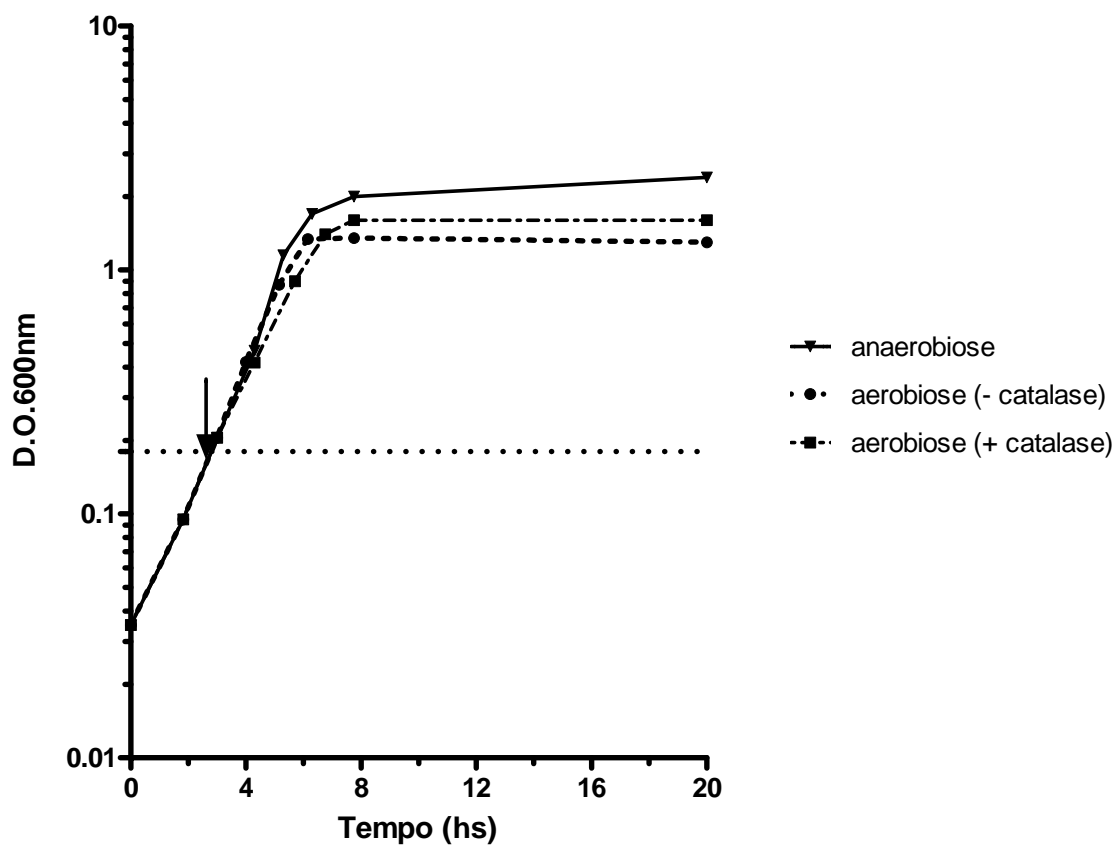


Figura 41 – Crescimento de *L. delbrueckii* UFV H2b20 em MRS contendo 0,2% de glicose sob anaerobiose, seguida pela transferência para aerobiose (130 rpm). A seta indica o momento da transferência.

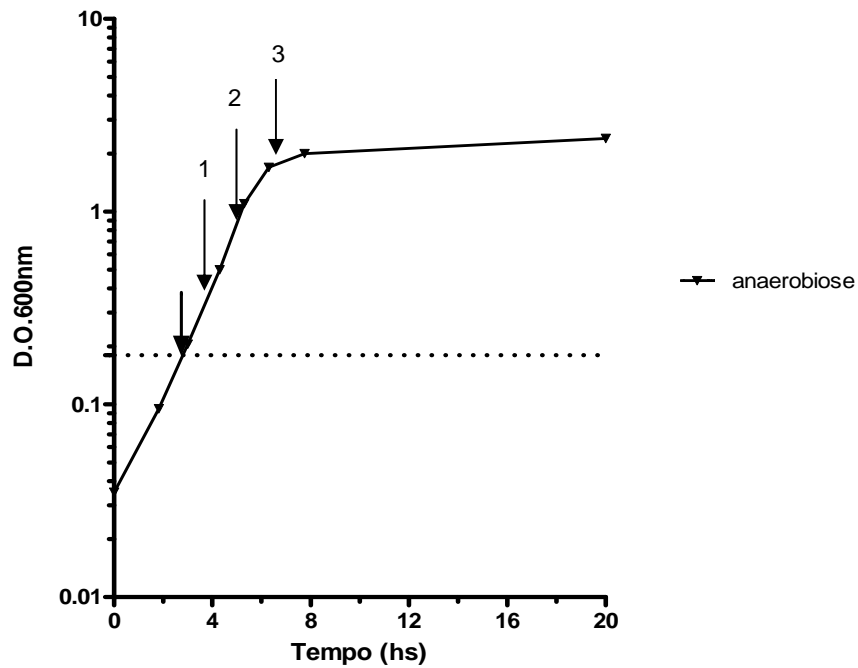


Figura 42 – Crescimento de *L. delbrueckii* UFV H2b20 em MRS contendo 0,2% de glicose sob anaerobiose. As setas indicam as amostras coletadas para análise da expressão gênica por PCR em tempo real.

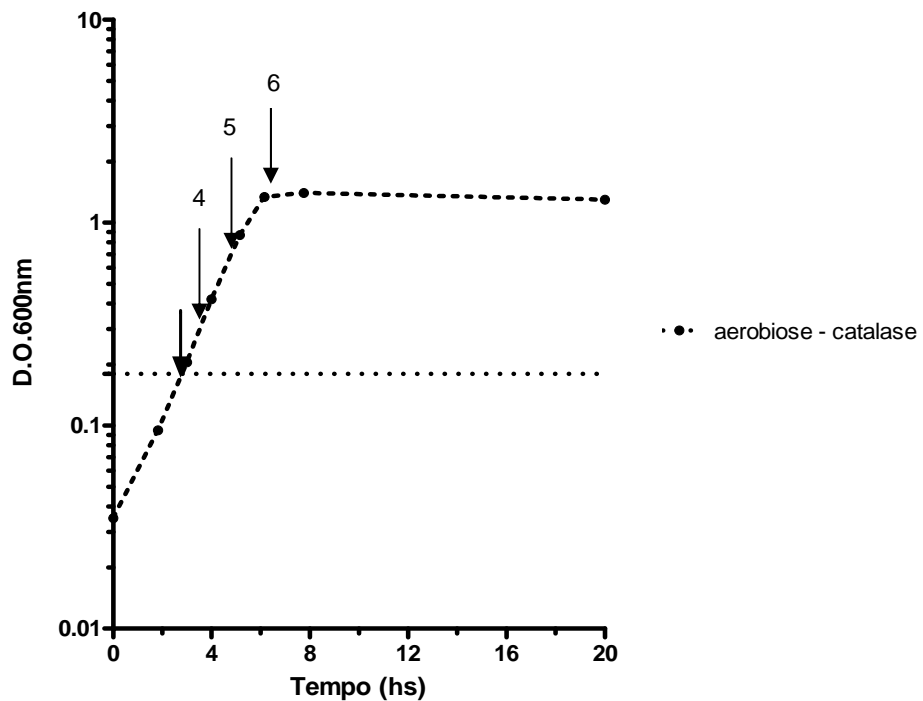


Figura 43 – Crescimento de *L. delbrueckii* UFV H2b20 em MRS contendo 0,2% de glicose sob aerobiose. As setas indicam as amostras coletadas para análise da expressão gênica por PCR em tempo real.

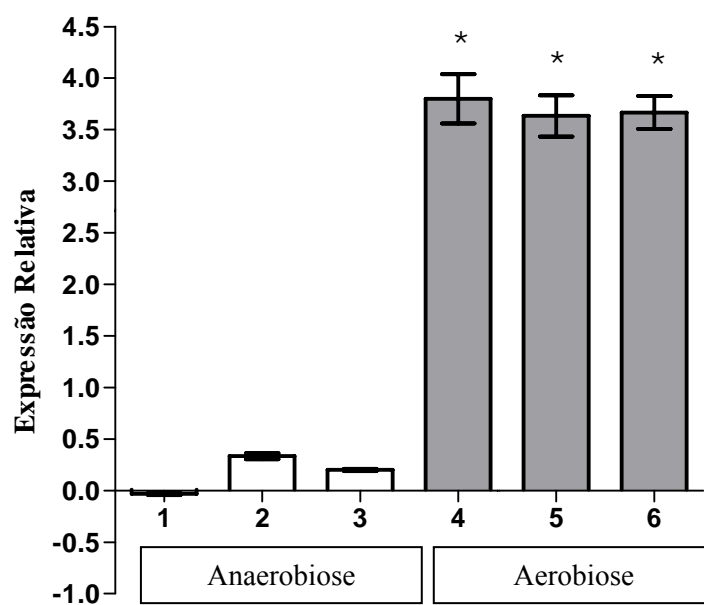


Figura 44 – Expressão relativa do gene *pox* em MRS contendo 0,2% de glicose sob anaerobiose (1-3) e após a transferência para condição de aerobiose (4-6), de acordo com os resultados obtidos pelo software REST[®] (* p<0,001).

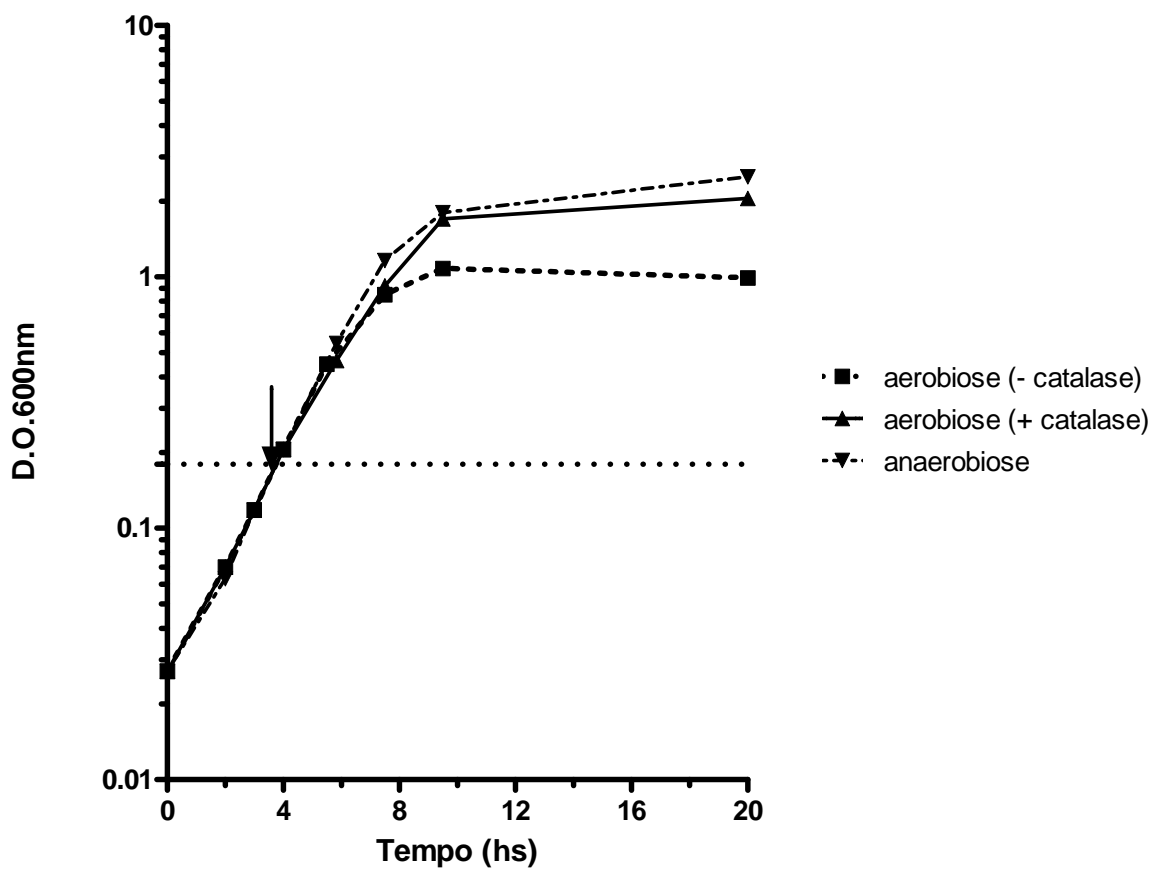


Figura 45 – Crescimento de *L. delbrueckii* UFV H2b20 em MRS contendo 0,2% de glicose sob aerobiose (130 rpm), seguida pela transferência para condição de anaerobiose. A seta indica o momento da transferência.

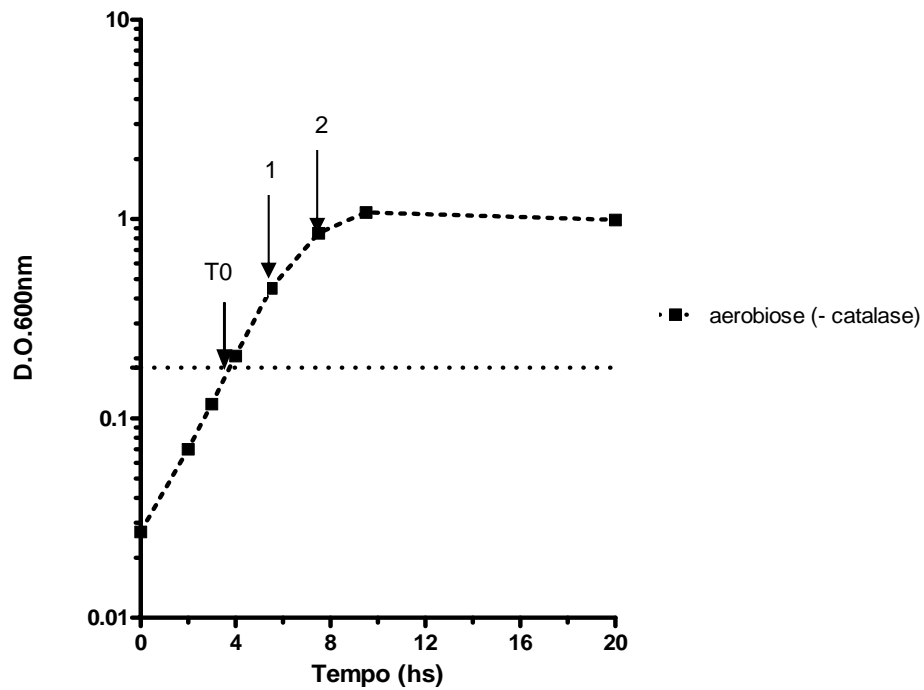


Figura 46 – Crescimento de *L. delbrueckii* UFV H2b20 em MRS contendo 0,2% de glicose sob aerobiose (130 rpm). As setas indicam as amostras coletadas para análise da expressão gênica por PCR em tempo real

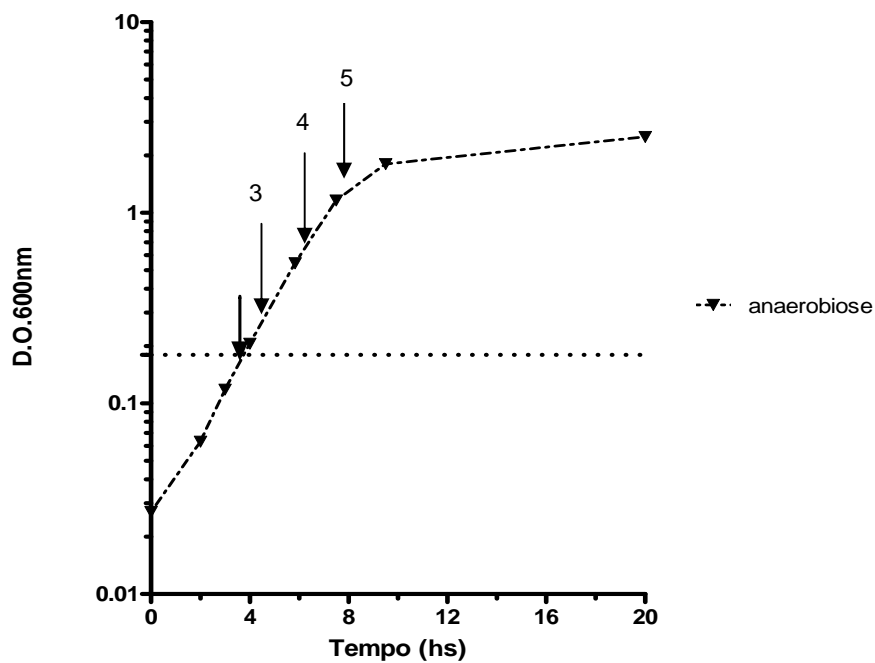


Figura 47 – Crescimento de *L. delbrueckii* UFV H2b20 em MRS contendo 0,2% de glicose sob anaerobiose. As setas indicam as amostras coletadas para análise da expressão gênica por PCR em tempo real

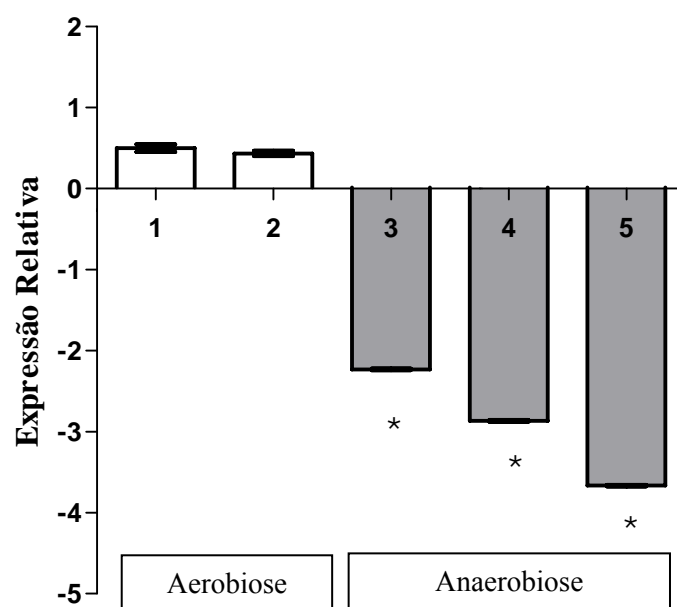


Figura 48 – Expressão relativa do gene *pox* em MRS contendo 0,2% de glicose sob aerobiose (1-2) e após a transferência para condição de anaerobiose (3-5), de acordo com os resultados obtidos pelo software REST[®] (* $p < 0,05$).

4.2.4. Avaliação da atividade enzimática de piruvato oxidase em *L. delbrueckii* UFV H2b20.

A atividade da enzima piruvato oxidase em *L. delbrueckii* UFV H2b20 foi avaliada em condições de aerobiose e anaerobiose, em meio de cultivo contendo glicose ou galactose nas concentrações de 2% e 0,2%. Amostras foram coletadas durante a fase logarítmica e início da fase estacionária.

Os resultados obtidos para atividade da enzima piruvato oxidase seguiram o mesmo perfil encontrado na avaliação da expressão gênica a nível transcricional. Observa-se na figura 49 que a atividade enzimática foi mais elevada quando *L. delbrueckii* UFV H2b20 foi cultivado na presença de 0,2% de glicose em aerobiose. Comparando os resultados obtidos para ambas as concentrações de açúcar, observa-se que tanto na presença como ausência de oxigênio, a atividade desta enzima foi sempre mais elevada na condição de restrição de glicose. Observa-se também que na condição de excesso de glicose em anaerobiose a atividade detectada foi muito baixa.

Quanto a atividade desta enzima na presença de galactose observa-se um padrão semelhante ao encontrado para glicose, entretanto o valor absoluto da atividade foi sempre mais elevado na presença deste açúcar do que de glicose (Figuras 50)

Estes resultados confirmam que a expressão desta enzima é regulada tanto por oxigênio como por repressão catabólica, sendo que a repressão é aliviada quando a concentração de glicose se torna limitante para o crescimento, sendo que esta repressão dependente de CcpA muitas vezes não é observada na presença de açúcares não-PTS (GOFFIN *et al.*, 2006; LORQUET *et al.*, 2004).

Bactérias do ácido láctico desenvolveram duas diferentes estratégias para metabolizar galactose que dependem do modo de transporte, o qual pode ocorrer por um sistema fosfotransferase dependente de fosfoenolpiruvato (PEP-PTS) ou por um sistema de permease. O transporte de galactose via PEP-PTS resulta na fosforilação da galactose, que é metabolizada por enzimas da via tagatose-6-P, que inclui galactose-6-P isomerase, tagatose-6-P quinase e tagatose 1,6-diP aldolase. Em caso da captação via permease, o açúcar não é modificado e a galactose é catabolisada pela via Leloir, na qual estão incluídas três enzimas: galactokinase, galactose- 1-P uridililtransferase e UDP-galactose 4-epimerase. Essas enzimas estão envolvidas na conversão de galactose a glicose-1-P e são codificadas pelos genes *gal*, os quais são

controlados por repressão catabólica em várias bactérias gram-positivas (GROSSIORD et al., 1998).

Em muitos casos, a presença de uma fonte de carbono rapidamente metabolizável no meio de cultivo reduz a expressão de genes envolvidos na utilização de outras fontes de carbono. Este fenômeno, denominado repressão catabólica (RC) é bem entendido em *Escherichia coli* e outras bactérias gram-negativas. Em bactérias gram-positivas foi estabelecido que RC é mediada por um mecanismo regulatório negativo (HUECK & HILLEN, 1995) Em *B. subtilis*, a proteína CcpA foi descoberta como sendo o fator que desencadeia a repressão por glicose do gene *amyE*, que codifica uma amilase, pela ligação a uma sequência *cis-acting* denominada elemento catabólito-responsivo (*cre*) (HUECK et al., 1995; MIWA et al., 2000) .

A proteína CcpA pertence a família LacI/GalR de proteínas regulatórias bacterianas e a inativação do gene *ccpA* reduz a repressão catabólica de vários genes envolvidos no metabolismo de carboidratos. A inativação de genes *ccpA* em outros organismos não apenas reduz a repressão catabólica de vários genes mas também diminui a taxa de crescimento, sugerindo o envolvimento de CcpA na regulação de outras vias metabólicas. Outros genes codificando proteínas com alta homologia de sequências a CcpA foram identificadas em *Lactobacillus delbrueckii* e *Clostridium actobutylicum* (DAVIDSON et al., 1995; STUCKY et al., 1996).

A ligação de CcpA aos sítios *cre* é potencializada pelas elevadas concentrações de intermediários da via glicolítica como glicose-6-P, o qual é um indicador do estado energético da célula. Outro sinal envolvido na ativação de CcpA é o fosfocarreador do sistema PTS, denominado HPr. HPr em sua forma fosforilada interage com CcpA e esta interação aumenta a ligação de CcpA aos sítios *cre* localizados na região promotora dos genes controlados por repressão catabólica (LUESINK et al., 1998).

A inativação do gene *ccpA* em *Lactococcus lactis* resultou na redução da taxa de crescimento tanto na presença de açúcares PTS como não-PTS. A taxa de crescimento do mutante *ccpA* em galactose foi afetada mais severamente do que em qualquer outra fonte de carbono testada. A inativação do gene *ccpA* pode resultar na alteração da expressão de genes diretamente ou indiretamente envolvidos no catabolismo de galactose, levando a redução da taxa de crescimento. Os genes *gal* de *L. lactis* estão sujeitos a repressão catabólica e a presença de um sítio *cre* na região promotora do gene *galA* indica o envolvimento de CcpA nesta repressão. Esta sugestão foi confirmada pelo aumento da transcrição dos genes *gal* quando o mutante *ccpA* foi cultivado em uma mistura de glicose e galactose. A inativação do gene *ccpA*

não resultou em uma completa desrepressão da transcrição de *galA*, uma vez que o nível de transcrição desse gene no mutante *ccpA* na mistura de glicose e galactose não atingiu o nível da estirpe selvagem crescendo em galactose. Isto sugere que a transcrição de *gal* é reduzida devido inativação de *ccpA* ou que um sistema adicional de repressão a glicose possa estar ativo (LUESINK et al., 1998).

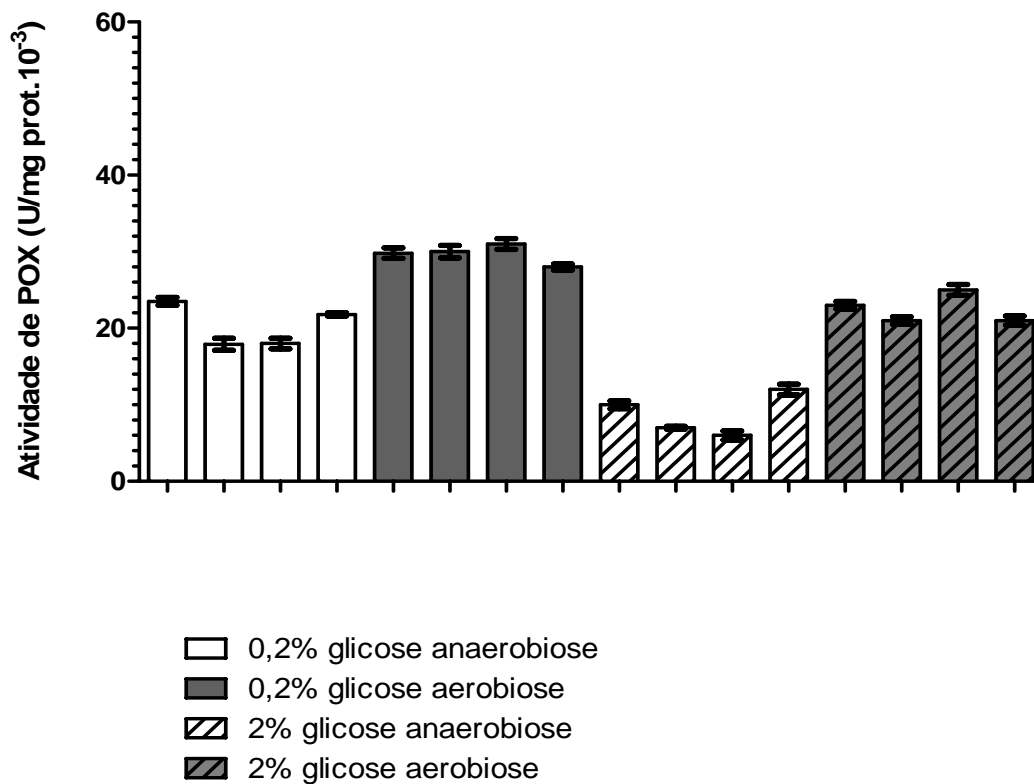


Figura 49 – Atividade da enzima piruvato oxidase de *L. delbrueckii* UFV H2b20 em condições de aerobiose e anaerobiose em MRS modificado contendo 2% ou 0,2% de glicose

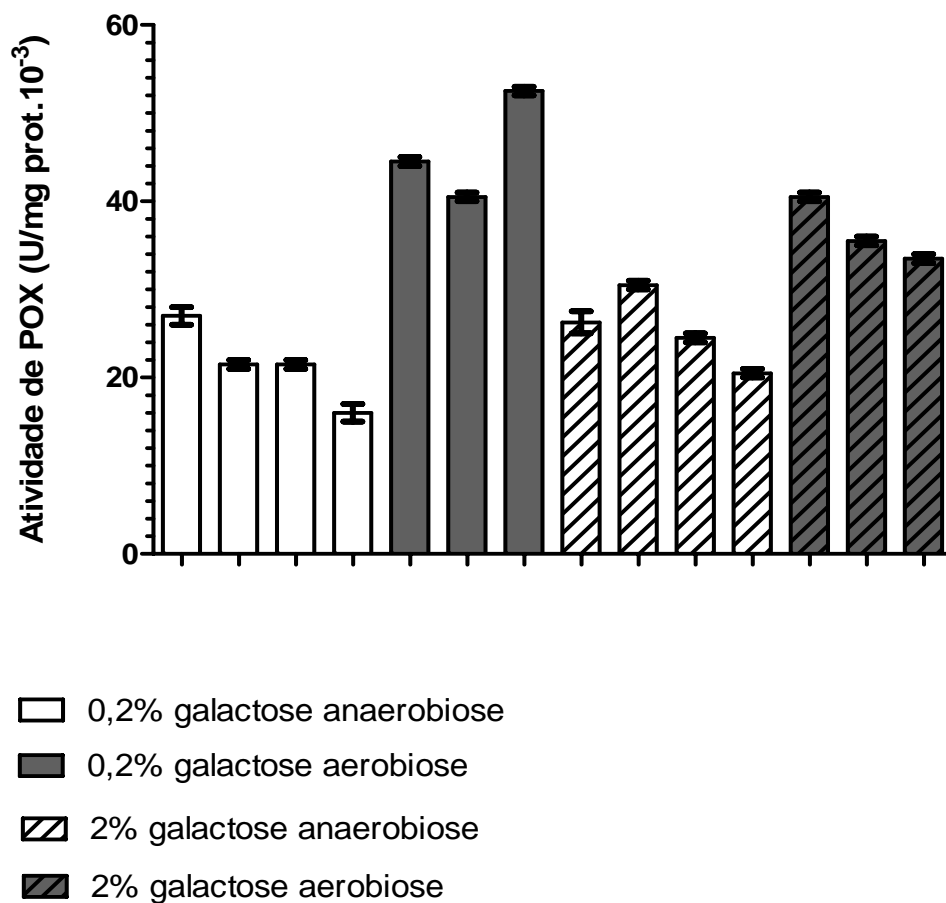


Figura 50 – Atividade da enzima piruvato oxidase de *L. delbrueckii* UFV H2b20 em condições de aerobiose e anaerobiose em MRS modificado contendo 2% ou 0,2% de galactose

CONCLUSÕES

O gene *spx* de *L. delbrueckii* UFV H2b20, é extremamente conservado em termos de seqüência e organização gênica não apenas em relação a outras estirpes de *L. delbrueckii*, e também em relação a outras bactérias Gram-positivas. Da mesma forma, evidenciou-se que o gene *pox* também é bastante conservado em relação a outras estirpes de *L. delbrueckii*, e, possivelmente seja parte de um regulon de repressão catabólica.

A identidade dessa linhagem foi confirmada por filogenia dos genes *spx* e *pox*.

O gene *dps* apresenta alta identidade com homólogos presentes em espécies pouco relacionadas à *L. delbrueckii*, como *L.plantarum*, *L. rhamnosus*, *L.sakei* e *L. reuteri*, bactérias que possuem em comum com *L.delbrueckii* UFV H2b20 o fato de serem todas bactérias probióticas.

Transferência horizontal de genes foi possivelmente a forma de aquisição de *dps* por *L. delbrueckii* UFV H2b20 e sugere-se que esse gene possa ser um indicador de probiose em outros *Lactobacillus*.

Conclui-se que *spx*, *dps* e *pox* estão envolvidos na resposta ao estresse oxidativo em *L. delbrueckii* UFV H2b20.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINHO, S.M.M. Comportamento do *L. acidophilus* UFV H2b20 sob condições do trato digestivo *in vitro* e efeito de métodos de preservação em sua atividade. Viçosa: UFV, 70p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1988.

ADOLFSSON, O., MEYDANI, S.N., RUSSELL. R.M. Yogurt and gut function. **Am. J. Clinical Nutrition**, v.80, p.245, 2004.

ALMIRON, M., LINK, A. J., FURLONG, D., AND KOLTER, R., A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved Escherichia coli. **Genes & Development**, v.6, p.2646, 1992.

ALTUVIA, S., ALMIRON, M., HUISMAN, G., KOLTER, R., AND STORZ, G., The dps promoter is activated by OxyR during growth and by IHF and sigma S in stationary phase. **Mol Microbiol**, v.13, p.265, 1994.

AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: Classification and physiology. In: **Lactic acid bacteria - Microbiological and functional aspects**. 3ª edição. 2004.

BARYNIN, V. V., WHITTAKER, M. M., ANTONYUK, S. V., LAMZIN, V. S., HARRISON, P. M., ARTYMIUK, P. J., AND WHITTAKER, J. W. Crystal structure of manganese catalase from *Lactobacillus plantarum*. **Structure**, v.9, p.725, 2001.

BOLOTIN, A., WINCKER, P., MAUGER, S., JAILLON, O., MALARME, K., WEISSENBACH, J., EHRLICH, S. D., AND SOROKIN, A. The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. **Genome Res.**, v.11, p.731, 2001.

BOZZI, M., MIGNOGNA, G., STEFANINI, S., BARRA, D., LONGHI, C., VALENTI, P., AND CHIANCONE, E. A novel non-heme iron-binding ferritin related to the DNA-binding proteins of the Dps family in *Listeria innocua*. **J. Biol. Chem.**, v.272, p.3259, 1997.

- BRIOUKHANOV, A., AND NETRUSOV, A. Aerotolerance of strictly anaerobic microorganisms and factors of defense against oxidative stress: A review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v.43, p.567, 2007.
- BRON, P. A., MARCO, M., HOFFER, S. M., VAN MULLEKOM, E., DE VOS, W. M., AND KLEEREBEZEM, M. Genetic characterization of the bile salt response in *Lactobacillus plantarum* and analysis of responsive promoters *in vitro* and *in situ* in the gastrointestinal tract, **J. Bacteriol.**, v.186, p.7829, 2004.
- BRY, L., FALK, P. G., MIDTVEDT, T., AND GORDON, J. I. A model of host-microbial interactions in an open mammalian ecosystem. **Science**, v.273, p.1380, 1996.
- BUSBY, S., EBRIGHT, R.H. Transcription activation by catabolite activator protein (CAP). **J. Mol. Biol.**, v. 293, p.199, 1999.
- BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, v.25, p. 169, 2000.
- CABISCOL, E., TAMARIT, J., AND ROS, J., Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. **Int Microbiol**, v.3, p.3, 2000.
- CHATTERJEE, S. S., HOSSAIN H., OTTEN S., KUENNE C., KUCHMINA K., MACHATA S., DOMANN E., CHAKRABORTY T., HAIN T. Intracellular gene expression profile of *Listeria monocytogenes*. **Infect. Immun.** v.74, p.1323, 2006.
- CHEN, L., AND HELMANN, J. D., *Bacillus subtilis* MrgA is a Dps(PexB) homologue: evidence for metalloregulation of an oxidative-stress gene. **Mol Microbiol**, v.18, p.295, 1995.
- CHEN, L., KERAMATI, L., AND HELMANN, J. D., Coordinate regulation of *Bacillus subtilis* peroxide stress genes by hydrogen peroxide and metal ions. **PNAS**, v.92, p.8190, 1995.
- CLARKE, L. A., AMARAL, M. D. An RNase-retarding solution for storage and transport of cell samples prior to RNA extraction. Provided through: The European Working Group on CFTR Expression. Disponível online: <http://central.igc.gulbenkian.pt/cftr/index.html>.
- COHEN, D. P., RENES, J., BOUWMAN, F. G., ZOETENDAL, E. G., MARIMAN, E., DE VOS, W. M., AND VAUGHAN, E. E., Proteomic analysis of log to stationary growth phase *Lactobacillus plantarum* cells and a 2-DE database. **Proteomics**, v.6, p.6485, 2006.
- DAL BELLO, F., WALTER, J., HAMMES, W. P., AND HERTEL, C., Increased complexity of the species composition of lactic acid bacteria in human feces revealed by alternative incubation condition. **Microbial Ecology**, v.45, p.455, 2003.
- DAVE, R. I., SHAH, N.P. Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made commercial starter cultures. **Int. Dairy J.**, v.7, p.31, 1997.

- DAVIDSON, S. P., J. D. SANTANGELO, S. J. REID, AND D. R. WOODS. A *Clostridium acetobutylicum* regulator gene (*regA*) affecting amylase production in *Bacillus subtilis*. **Microbiology** v.141 p.989, 1995.
- DE ANGELIS, M., GOBETTI, M. Environmental stress responses in *Lactobacillus*: A review, **Proteomics**, v.4, p.106, 2004.
- DE VOS, W. M., BRON, P. A., AND KLEEREBEZEM, M., Post-genomics of lactic acid bacteria and other food-grade bacteria to discover gut functionality. **Current Opinion in Biotechnology**, v.15, p.86, 2004.
- DUBOS, R., SCHAEGLER, R. W., COSTELLO, R., AND HOET, P., Indigenous, normal, and autochthonous flora of the gastrointestinal tract. **J. Exp. Med.**, v.122, p.67, 1965.
- DOGI, C. A., PERDIGON, G. Importance of the host specificity in the selection of probiotic bacteria. **Journal of Dairy Research** , v.73, p.357, 2006.
- DUWAT, P., SOURICE, S., CESSÉLIN, B., LAMBERET, G., VIDO, K., GAUDU, P., LE LOIR, Y., VIOLET, F., LOUBIERE, P., AND GRUSS, A. Respiration capacity of the fermenting bacterium *Lactococcus lactis* and its positive effects on growth and survival. **J. Bacteriol.**, v.183, p.4509, 2001.
- DUNNE, C., MURPHY, L., FLYNN, S., O'MAHONY, L., O'HALLORAN, S., FEENEY, M., THORNTON, D.M.G., FITZGERALD, G., DALY, C., KIELY, B., QUIGLEY, E.M.M., O'SULLIVAN, G.C., SHANAHAN, F., COLLINS, J.K. Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. **Antonie Leeuwenhoek**, v.76, p.279, 1999.
- ECK, R. V.; DAYHOFF, M. O. Atlas of protein sequence and structure. **National Biomedical Research Foundation**, Silver Springs, Maryland, 1966.
- ECKBURG, P. B., BIK, E. M., BERNSTEIN, C. N., PURDOM, E., DETHLEFSEN, L., SARGENT, M., GILL, S. R., NELSON, K. E., AND RELMAN, D. A., Diversity of the human intestinal microbial flora. **Science**, v.308, p.1635, 2005.
- EGERT, M., DE GRAAF, A. A., SMIDT, H., DE VOS, W. M., AND VENEMA, K., Beyond diversity: functional microbiomics of the human colon. **Trends in Microbiology**, v.14, p.86, 2006.
- FAO/WHO Evaluation of health and nutritional properties of powder milk with live lactic acid bacteria. **Report from FAO/WHO Expert Consultation**, 1-4 October 2001, Cordoba, Argentina, 2001.
- FILHO-LIMA, J. V. M.; 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, 2000.

- FLINT H. J., DUNCAN, S. H., SCOTT K. P., LOUIS. P., Interactions and competition within the microbial community of the human colon: links between diet and health. **Environmental Microbiology**, v.9, p.1101, 2007.
- FRANZ, C. M. A. P., HOLZAPFEL, W. H., AND STILES, M. E., Enterococci at the crossroads of food safety? **International Journal of Food Microbiology**, v.47, p.1, 1999.
- FREES, D., VARMANEN, P., AND INGMER, H., Inactivation of a gene that is highly conserved in Gram-positive bacteria stimulates degradation of non-native proteins and concomitantly increases stress tolerance in *Lactococcus lactis*. **Mol Microbiol**, v.41, p.93, 2001.
- FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. **Annual Review of Biochemistry**, v.64, p.97, 1995.
- FRIDOVICH, I. Oxygen toxicity: a radical explanation. **J Exp Biol**, v.201, p.1203, 1998.
- FRIDOVICH, I. Fundamental aspects of reactive oxygen species, or What's the matter with oxygen? **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v.893, n.1, p.13, 1999.
- FURTADO, W.C.A. Efeito de choques térmico e ácido na resistência de *Lactobacillus* UFV H2b20 em leite em pó. Viçosa: UFV, 34p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2001.
- GOFFIN, P., MUSCARIELLO, L., LORQUET, F., STUKKENS, A., PROZZI, D., SACCO, M., KLEEREBEZEM, M., AND HOLS, P., Involvement of pyruvate oxidase activity and acetate production in the survival of *Lactobacillus plantarum* during the stationary phase of aerobic growth. **Appl. Envir. Microbiol.**, v.72, p.7933, 2006.
- GRANT, R. A., FILMAN, D. J., FINKEL, S. E., KOLTER, R., AND HOGLE, J. M., The crystal structure of Dps, a ferritin homolog that binds and protects DNA. **Nat Struct Biol**, v.5, p.294, 1998.
- GROSSIORD, B., VAUGHAN, E. E., LUESINK, E., VOS, W. M. Genetics of galactose utilization via the Leloir pathway in lactic acid bacteria. **Lait**, v.78, p.74, 1998.
- HARMSSEN, H. J. M., RAANGS, G. C., HE, T., DEGENER, J. E., AND WELLING, G. W., Extensive set of 16S rRNA-based probes for detection of bacteria in human feces. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.68, p.2982, 2002.
- HARTL, D. L., OCHMAN, H., Inverse polymerase chain reaction. In: **Protocols for gene analysis**, pp. 187, 1994.
- HELLER, K. J. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. **Am. J. Clinical Nutrition**, v.73, n.2, p.374S, 2001.

- HIGUCHI, M., YAMAMOTO, Y., AND KAMIO, Y., Molecular biology of oxygen tolerance in lactic acid bacteria: Functions of NADH oxidases and Dpr in oxidative stress. **J Biosci Bioeng**, v.90, p.484, 2000.
- HOLZAPFEL, W. H., HABERER, P., GEISEN, R., BJORKROTH, J., SCHILLINGER, U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **Am J Clin Nutr**, v.73, p.365S, 2001.
- HOOPER, L. V., AND GORDON, J. I., Commensal host-bacterial relationships in the gut. **Science**, v.292, p.1115, 2001.
- HOOPER, L. V., WONG, M. H., THELIN, A., HANSSON, L., FALK, P. G., AND GORDON, J. I., Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. **Science**, v.291, p.881, 2001.
- HOOPER, L. V., MIDTVEDT, T., AND GORDON, J. I., How host-microbial interactions shape the environment of mammalian intestine. **Annual Review of Nutrition**, v.22, p.283, 2002.
- HOOPER, L. V., Bacterial contributions to mammalian gut development. **Trends in Microbiology**, v.12, p.129, 2004.
- HUECK C. J., HILLEN W. Catabolite repression in *Bacillus subtilis*: a global regulatory mechanism for the gram-positive bacteria? **Mol Microbiol.** 15(3):395–401, 1995.
- ILARI, A., STEFANINI, S., CHIANCONE, E., AND TSERNOGLOU, D., The dodecameric ferritin from *Listeria innocua* contains a novel intersubunit iron-binding site. **Nat Struct Biol**, v.7, p.38, 2000.
- ISHIKAWA, T., MIZUNOE, Y., KAWABATA, S., TAKADE, A., HARADA, M., WAI, S. N., YOSHIDA, S. The iron-binding protein Dps confers hydrogen peroxide stress resistance to *Campylobacter jejuni*. **J. Bacteriol.**, v.185, p.1010, 2003.
- ISOLAURI, E.; SUTAS, Y.; KANKAANPÄÄ, P.; ARVILOMMI, H.; SALMINEN, S. Probiotics: effects on immunity. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.73, p.444S, 2001
- JAIN, R.; RIVERA, M. C.; MOORE, J. E.; LAKE, J.A. Horizontal gene transfer accelerates genome innovation and evolution. **Mol. Biol. Evol.**, v. 20, p. 1598, 2003.
- KASSEN, R., AND RAINEY, P. B., The ecology and genetics of microbial diversity. **Annual Review of Microbiology**, v.58, p.207, 2004.
- KAUKO, A., HAATAJA, S., PULLIAINEN, A.T., FINNE, J., PAPAGEORGIOU, A.C. Crystal structure of *Streptococcus suis* Dps-like peroxide resistance protein Dpr: Implications for iron incorporation **Journal of Molecular Biology**, v.338 (3), p 547-558, 2004.

- KLAENHAMMER, T. R., BARRANGOU R., BUCK L. B., AZCARATE-PERIL A. M., ALTERMANN E. Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. **FEMS Microbiology Reviews**, v.29, p. 393, 2005.
- KLEIN, G., PACK, A., BONAPARTE, C., AND REUTER, G., Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.41, p.103, 1998.
- KONO, Y., AND FRIDOVICH, I., Functional significance of manganese catalase in *Lactobacillus plantarum*. **J. Bacteriol.**, v.155, p.742, 1983.
- KUROKAWA, K., ITOH, T., KUWAHARA, T., OSHIMA, K., TOH, H., TOYODA, A., TAKAMI, H., MORITA, H., SHARMA, V. K., SRIVASTAVA, T. P., TAYLOR, T. D., NOGUCHI, H., MORI, H., OGURA, Y., EHRLICH, D. S., ITOH, K., TAKAGI, T., SAKAKI, Y., HAYASHI, T., AND HATTORI, M., Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. **DNA Res**, v.14, p.169, 2007.
- LEELAKRIANGSAK, M., KOBAYASHI, K., AND ZUBER, P., Dual negative control of spx transcription initiation from the P3 promoter by repressors PerR and YodB in *Bacillus subtilis*. **J. Bacteriol.**, v.189, p.1736, 2007.
- LEELAKRIANGSAK, M., AND ZUBER, P., Transcription from the P3 promoter of the *Bacillus subtilis* spx gene is induced in response to disulfide stress. **J. Bacteriol.**, v.189, p.1727, 2007.
- LEITE, M.O. Desenvolvimento de processos para a produção de probióticos com *Lactobacillus delbrueckii* UFVH2b20. Viçosa: UFV, 76p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2005.
- LEY, R. E., PETERSON, D. A., GORDON, J. I. Ecological and Evolutionary Forces Shaping Microbial Diversity in the Human Intestine. **Cell**, v. 124, p.837, 2006.
- LI, Y., HUGENHOLTZ, J., ABEE, T., AND MOLENAAR, D., Glutathione protects *Lactococcus lactis* against oxidative stress. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.69, p.5739, 2003.
- LOREAU, M., NAEEM, S., INCHAUSTI, P., BENGTSSON, J., GRIME, J. P., HECTOR, A., HOOPER, D. U., HUSTON, M. A., RAFFAELLI, D., SCHMID, B., TILMAN, D., AND WARDLE, D. A., Biodiversity and ecosystem functioning: current knowledge and future challenges. **Science**, v.294, p.804, 2001.
- LORQUET, F., GOFFIN, P., MUSCARIELLO, L., BAUDRY, J.-B., LADERO, V., SACCO, M., KLEEREBEZEM, M., AND HOLS, P., Characterization and functional analysis of the *poxB* gene, which encodes pyruvate oxidase in *Lactobacillus plantarum*. **J. Bacteriol.**, v.186, p.3749, 2004.
- LUSEINK, E. J., HERPEN, R. E. M. A. V., GROSSIORD, B. P., KUIPERS, O. P., VOS, W. M. Transcriptional activation of the glycolytic *las* operon and catabolite repression of the *gal* operon in *Lactococcus lactis* are mediated by the catabolite control protein CcpA. **Molecular Microbiology**, v.30, p.789, 1998.
- MADSEN, K. Probiotics and the immune response. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 40, p.232, 2006.

MAKAROVA, K., SLESAREV, A., WOLF, Y., SOROKIN, A., MIRKIN, B., KOONIN, E., PAVLOV, A., PAVLOVA, N., KARAMYCHEV, V., POLOUCHINE, N., SHAKHOVA, V., GRIGORIEV, I., LOU, Y., ROHKSAR, D., LUCAS, S., HUANG, K., GOODSTEIN, D. M., HAWKINS, T., PLENGVIDHYA, V., WELKER, D., HUGHES, J., GOH, Y., BENSON, A., BALDWIN, K., LEE, J. H., DÑ-AZ-MUÑ±IZ, I., DOSTI, B., SMEIANOV, V., WECHTER, W., BARABOTE, R., LORCA, G., ALTERMANN, E., BARRANGOU, R., GANESAN, B., XIE, Y., RAWSTHORNE, H., TAMIR, D., PARKER, C., BREIDT, F., BROADBENT, J., HUTKINS, R., O'SULLIVAN, D., STEELE, J., UNLU, G., SAIER, M., KLAENHAMMER, T., RICHARDSON, P., KOZYAVKIN, S., WEIMER, B., AND MILLS, D., Comparative genomics of the lactic acid bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.103, p.15611, 2006.

MARTY-TEYSSET, C., DE LA TORRE, F., AND GAREL, J. R., Increased production of hydrogen peroxide by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* upon aeration: involvement of an NADH oxidase in oxidative stress, **Appl. Environ. Microbiol.**, v.66, p.262, 2000.

MATTILA-SANDHOLM, T., MYLLÄRINEN, P., CRITTENDEN, R., MOGENSEN, G., FONDÉN, R., AND SAARELA, M., Technological challenges for future probiotic foods, **International Dairy Journal**, v.12, p.173, 2002.

MCCARTNEY, A. L. Application of molecular biological methods for studying probiotics and the gut flora. **British Journal of Nutrition**, v. 88: p.s29, 2002.

MCCORMICK, M. L., BUETTNER, G. R. Endogenous Superoxide Dismutase Levels Regulate Iron-Dependent Hydroxyl Radical Formation in *Escherichia coli* Exposed to Hydrogen Peroxide. **J. Bacteriol.**, v.180, n.3, p.622, 1998.

MCCRACKEN, A., TIMMS, P. Efficiency of transcription from promoter sequence variants in *Lactobacillus* is both strain and context dependent. **J. Bacteriol.** v.181, p. 6569, 1999

METCHNIKOFF, E. The prolongation of life. Optimistic studies. William Heinemann, London, United Kingdom. 1907.

MIYOSHI, A., ROCHAT, T., GRATADOUX, J., LOIR, Y. L., OLIVEIRA, S. C., LANGELLA, P., AZEVEDO, V. Oxidative stress in *Lactococcus lactis*. **Genetics and Molecular Research**, 2003.

MIYOSHI, Y., OKADA, S., UCHIMURA, T., AND SATOH, E., A Mucus adhesion promoting protein, MapA, mediates the adhesion of *Lactobacillus reuteri* to Caco-2 human intestinal epithelial cells. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**. v.70, p.1622, 2006.

MIWA, Y., NAKATA, A., OGIWARA, A., YAMAMOTO, M., FUJITA, Y. Evaluation and characterization of catabolite-responsive elements (*cre*) of *Bacillus subtilis*. **Nucl. Acids Res.** v.28, p.1206, 2000.

MONTEIRO, R.C.B. Resposta ao estresse em *Lactobacillus acidophilus* UFVH2b20. Viçosa: UFV, 57p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1999.

MORELLI, L., In vitro assessment of probiotic bacteria: From survival to functionality, **International Dairy Journal**, v.17, p.1278, 2007.

- MULLER Y. A., SCHULZ, G. E. Structure of the thiamine- and flavin-dependent enzyme pyruvate oxidase. **Science** v. 259 (5097), p.965, 1993
- NAIDU, A.S., BIDLACK, W.R., CLEMENS, R.A., Probiotic spectra of lactic acid bacteria. **Critical Reviews in food Science and Nutrition**: v.38, n.1, p.13,1999.
- NAKANO, M. M., HAJARIZADEH, F., ZHU, Y., ZUBER, P. Loss-of-function mutations in *yjbD* result in ClpX- and ClpP-independent competence development of *Bacillus subtilis*. **Mol. Microbiol.** v.42:p.383, 2001.
- NAKANO, M. M., NAKANO, S., AND ZUBER, P., Spx (YjbD), A negative effector of competence in *Bacillus subtilis*, enhances ClpC-MecA-ComK interaction, **Mol Microbiol**, v.4, p.1341, 2002.
- NAKANO, S., ZHENG, G., NAKANO, M. M., AND ZUBER, P., Multiple Pathways of Spx (YjbD) Proteolysis in *Bacillus subtilis*, **J. Bacteriol.**, v.184, p.3664, 2002.
- NAKANO, S., GROSSMAN, A. D., AND ZUBER, P., Spx-dependent global transcriptional control is induced by thiol-specific oxidative stress in *Bacillus subtilis*, **PNAS**, v.100, p.13603, 2003
- NAKANO, S., NAKANO, M. M., ZHANG, Y., LEELAKRIANGSAK, M., AND ZUBER, P., A regulatory protein that interferes with activator-stimulated transcription in bacteria, **PNAS**, v.100, p.4233, 2003.
- NAKANO, S., ERWIN, K. N., RALLE, M., AND ZUBER, P., Redox-sensitive transcriptional control by a thiol/disulphide switch in the global regulator, Spx, **Mol Microbiol**, v.55, p.498, 2005.
- NAKANO, S., Redox-sensitive transcriptional control by a thiol/disulphide switch in the global regulator, Spx. **Molecular Microbiology**, v.55, p.498, 2005.
- NEU, J., DOUGLAS-ESCOBAR, M., AND LOPEZ, M., Microbes and the Developing Gastrointestinal Tract, **Nutr Clin Pract**, v.22, p.174, 2007.
- NEUMANN, E., OLIVEIRA, M.A.P., CABRAL, C.M., MOURA, L.N., NICOLI, J.R., VIEIRA, E.C., CARA, D.C., PODOPRIGODRA, G.I., VIEIRA, L.Q. Monoassociation with *Lactobacillus acidophilus* UFV H2b20 stimulates the immune defense mechanisms of germfree mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.3, p.1565, 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.

NEWBERRY, K. J., NAKANO, S., ZUBER, P., AND BRENNAN, R. G., Crystal structure of the *Bacillus subtilis* anti-alpha, global transcriptional regulator, Spx, in complex with the alpha C-terminal domain of RNA polymerase, **PNAS**, v.102, p.15839, 2005.

NOVICHKOV, P. S. et al. Genome-wide molecular clock and horizontal gene transfer in bacterial evolution. *J. Bacteriol.*, v. 186, p. 6575, 2004.

OCHMAN, H. Lateral and oblique gene transfer. **Curr. Opin. Genet. Devel.**, v. 11, p. 616, 2001.

OLSEN, K. N., LARSEN, M. H., GAHAN, C. G., KALLIPOLITIS, B., WOLF, X. A., REA, R., HILL, C., INGMER, H. The Dps-like protein Fri of *Listeria monocytogenes* promotes stress tolerance and intracellular multiplication in macrophage-like cells. **Microbiology**, v.151, p.925, 2005.

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

PAMP, S. J., FREES, D., ENGELMANN, S., HECKER, M., AND INGMER, H., Spx Is a Global Effector Impacting Stress Tolerance and Biofilm Formation in *Staphylococcus aureus*. **J. Bacteriol.**, v.188, p.4861, 2006.

PAPINUTTO, E., DUNDON, W. G., PITULIS, N., BATTISTUTTA, R., MONTECUCCO, C., AND ZANOTTI, G., Structure of Two Iron-binding Proteins from *Bacillus anthracis*, **J. Biol. Chem.**, v.277, p.15093, 2002.

PEACOCK, T. J.. Biological Role of Mn-catalase in Select *Lactobacilli*. Thesis. North Carolina State University. 2008

PENAUD, S., FERNANDEZ, A., BOUDEBBOUZE, S., EHRlich, S. D., MAGUIN, E., AND VAN DE GUCHTE, M., Induction of Heavy-Metal-Transporting CPX-Type ATPases during Acid Adaptation in *Lactobacillus bulgaricus*, **Appl. Envir. Microbiol.**, v.72, p.7445, 2006.

PERDIGON, G., GALDEANO, C.M., VALDEZ, J.C., MEDICI, M. Interaction of lactic acid bacteria with the gut immune system. **Eur J Clin Nutr**, v.56, n.4, p.S21, 2002.

PFAFLL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR. **Nucleic Acid Research**, v.29, n.9, p.45, 2001.

PFAFLL, M. W., HORGAN, G. W., DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST) for group wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real time PCR. **Nucleic Acid Research**, v.30, n.9, p.36, 2002.

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

RAJILI-STOJANOVIĆ, M. H. S. W. M. D. V., Diversity of the human gastrointestinal tract microbiota revisited, **Environmental Microbiology**, v.9, p.2125, 2007.

- REID, G., JASS, J., SEBULSKY, M. T., AND MCCORMICK, J. K., Potential Uses of Probiotics in Clinical Practice, **Clin. Microbiol. Rev.**, v.16, p.658, 2003.
- REID, G. Probiotics and prebiotics – Progress and challenges. **International Dairy Journal**, v.18, p. 969, 2008
- RIBEIRO, M.A., Aspectos da produção de peróxido de hidrogênio e inibição de bactérias por *Lactobacillus acidophilus* UFV H2b20. Viçosa, MG: UFV, 1995. 60p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola)- Universidade Federal de Viçosa, 1995.
- SALMINEN, S., WRIGHT, A. V., OUWEHAND, A. C. Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects. 3rd edition. Publisher: Taylor & Francis, Inc., 2004.
- SANTOS, N. S. Isolamento e caracterização de *Lactobacillus acidophilus* de fezes de crianças alimentadas ao seio e de bezerros, visando sua utilização como adjunto dietético. 1984. 69 pg. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1984.
- SATOKARI, R. M., VAUGHAN, E. E., FAVIER, C. F., DORÃO, J. L., EDWARDS, C., AND DE VOS, W. M., Diversity of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* spp. in Breast-Fed and Formula-Fed Infants as Assessed by 16S rDNA Sequence Differences, *Microbial Ecology in Health and Disease*. v.14, p.97, 2002.
- SAVAGE, D. C. Associations and physiological interactions of indigenous microorganisms and gastrointestinal epithelia. **Am. J. Clin. Nutr.** v.25, p.1372,1972.
- SCHELL, M. A., KARMIRANTZOU, M., SNEL, B., VILANOVA, D., BERGER, B., PESSI, G., ZWAHLEN, M.-C., DESIERE, F., BORK, P., DELLEY, M., PRIDMORE, R. D., AND ARIGONI, F., The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract, **PNAS**, v.99, p.14422, 2002.
- SCHIFFRIN, E. J. E S. BLUM. Food processing: probiotic microorganisms for beneficial foods. **Curr Opin Biotechnol**, v.12, n.5, p.499, 2001.
- SCHICK, J., B. WEBER, J. R. KLEIN, AND B. HENRICH. PepR1, a CcpA-like transcription regulator of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*. **Microbiology** v.145, p.3147, 1999.
- SEAMUS, C., Responses of lactic acid bacteria to oxygen, *FEMS Microbiology Letters*, v.46, p.269, 1987.
- SEDEWITZ, B., SCHLEIFER, K H, GOTZ, F. Purification and biochemical characterization of pyruvate oxidase from *Lactobacillus plantarum*. **J. Bacteriol.** v.160, p.273,1984.
- SHAH, N. P. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy food. **J Dairy Sci**, v.83, p.894, 2000.
- SMITH, J. L. The physiological role of ferritin-like compounds in bacteria. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 30, n. 3, p.173, 2004.

- STANTON, C., DESMOND, C., FITZGERALD, G., ROSS, R.P. Probiotic health benefits - reality or myth. **Aust Journal Dairy Technol**, v.58, p.107, 2003.
- STANTON, C., GARDINER, G., MEEHAN, H., COLLINS, K., FITZGERALD, G., LYINCH, P.B., ROSS, R.P. Market potencial for probiotics. **Am. J. Clinical Nutrition**, v.73, p.476, 2001.
- STORZ, G., IMLAY, J.A. Oxidative stress. **Curr. Opin. Microbiology**, v.2, p.188, 1999.
- STILES, M. E., AND HOLZAPFEL, W. H., Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy, **International Journal of Food Microbiology**, v.36, p.1, 1997.
- STORZ, G., AND IMLAY, J. A., Oxidative stress, **Current Opinion in Microbiology**, v.2, p.188, 1999.
- STUCKY, K., SCHICK, J., KLEIN, J. R., HENRICH, B., PLAPP, R. Characterization of *pepR1*, a gene coding for a potential transcriptional regulator of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* DSM7290. **FEMS Microbiol. Lett.** v.136, p.63, 1996.
- TALWALKAR, A., KAILASAPATHY, K. A Review of oxygen toxicity in probiotic yogurts: influence on the survival of probiotic bacteria and protective techniques. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.3, p. 117, 2004.
- TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p. 1596, 2007.
- TANNOCK, G. W., A Special Fondness for Lactobacilli, **Appl. Environ. Microbiol.**, v.70, p.3189, 2004.
- TANNOCK, G. W., MUNRO, K., HARMSSEN, H. J. M., WELLING, G. W., SMART, J., GOPAL, P. K., Analysis of the Fecal Microflora of Human Subjects Consuming a Probiotic Product Containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20, **Appl. Environ. Microbiol.**, v.66, p.2578, 2000.
- THIBESSARD, A., FERNANDEZ, A., GINTZ, B., LEBLOND-BOURGET, N., DECARIS, B. Hydrogen peroxide effects on *Streptococcus thermophilus* CNRZ 368 cell viability. **Res. Microbiology**, v.152, p.593, 2001.
- TSUJI, N. M., Antigen-Specific CD4 Regulatory T Cells in the Intestine, Inflammation; Allergy - Drug Targets (Formerly Current Drug Targets - Inflammation 8; Allergy), v.5, p.191, 2006.
- VAN DE GUCHTE, M., SERROR, P., CHERVAUX, C., SMOKVINA, T., EHRlich, S., AND MAGUIN, E., Stress responses in lactic acid bacteria, **Antonie van Leeuwenhoek**, v.82, p.187, 2002.

- VAN DE GUCHTE, M., PENAUD, S., GRIMALDI, C., BARBE, V., BRYSON, K., NICOLAS, P., ROBERT, C., OZTASJJ.S., MANGENOT, S., COULOUX,A., LOUX,V., DERVYN, R., BOSSY,R., BOLOTIN,A., BATTO, J.-M., WALUNAS,T.,GIBRAT, J.-F., E P. BESSIÈRES, WEISSENBACH, J., EHRLICH, S. D., MAGUIN, E. The complete genome sequence of *Lactobacillus bulgaricus* reveals extensive and ongoing reductive evolution. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.103, p.9274, 2006
- VANDAMME, P., POT, B., GILLIS, M., DE VOS, P., KERSTERS, K., AND SWINGS, J., Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics, **Microbiol. Rev.**, v.60, p.407, 1996.
- VASILJEVIC, T., AND SHAH, N. P., Probiotics--From Metchnikoff to bioactives, **International Dairy Journal**, v.18, p.714, 2008.
- VOSKUIL, M.I., CHAMBLISS, G. H. The -16 region of *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacterial promoters. **Nucl. Acids Res.** v.26, p.3584, 1998.
- WALTER, J., Ecological Role of Lactobacilli in the Gastrointestinal Tract: Implications for Fundamental and Biomedical Research, **Appl. Envir. Microbiol.**, v.74, p.4985, 2008.
- WALTER, J., HENG, N. C. K., HAMMES, W. P., LOACH, D. M., TANNOCK, G. W., AND HERTEL, C., Identification of *Lactobacillus reuteri* Genes Specifically Induced in the Mouse Gastrointestinal Tract, **Appl. Environ. Microbiol.**, v.69, p.2044, 2003.
- WALTER, J., HERTEL, C., TANNOCK, G. W., LIS, C. M., MUNRO, K., AND HAMMES, W. P., Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* Species in Human Feces by Using Group-Specific PCR Primers and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, **Appl. Envir. Microbiol.**, v.67, p.2578, 2001.
- WOOD, B. J. B.; WARNER, P. J. Genetics of Acid Lactic Bacteria. Ed. Springer, 2003. 394 p.
- XU, J. et al. Evolution of symbiotic bacteria in the distal human intestine. **PLOS Biology**, v. 5, p. 1574, 2007.
- YAMAMOTO, Y., FUKUI, K., KOUJIN, N., OHYA, H., KIMURA, K., AND KAMIO, Y., Regulation of the Intracellular Free Iron Pool by Dpr Provides Oxygen Tolerance to *Streptococcus mutans*, **J. Bacteriol.**, v.186, p.5997, 2004.
- YAMAMOTO, Y., HIGUCHI, M., POOLE, L. B., AND KAMIO, Y., Identification of a new gene responsible for the oxygen tolerance in aerobic life of *Streptococcus mutans*, **Biosci Biotechnol Biochem**, v.64, p.1106, 2000.
- YAMAMOTO, Y., POOLE, L. B., HANTGAN, R. R., AND KAMIO, Y., An Iron-Binding Protein, Dpr, from *Streptococcus mutans* Prevents Iron-Dependent Hydroxyl Radical Formation In Vitro, **J. Bacteriol.**, v.184, p.2931, 2002.
- YANG, X., CHIANCONE, E., STEFANINI, S., ILARI, A., AND CHASTEEN, N. D., Iron oxidation and hydrolysis reactions of a novel ferritin from *Listeria innocua*, **Biochem J**, v.349 Pt 3, p.783, 2000.

YOU, C. SEKOWSKA, A. FRANCETIC, O., MARTIN-VERSTRAETE, I. M., WANG, Y., DANCHIN, A. Spx mediates oxidative stress regulation of the methionine sulfoxide reductases operon in *Bacillus subtilis*. **BMC Microbiology**, v.8, p.128, 2008.

YUAN, J., ZHU, L., LIU, X., LI, T., ZHANG, Y., YING, T., WANG, B., WANG, J., DONG, H., FENG, E., LI, Q., WANG, J., WANG, H., WEI, K., ZHANG, X., HUANG, C., HUANG, P., HUANG, L., ZENG, M., AND WANG, H., A Proteome Reference Map and Proteomic Analysis of *Bifidobacterium longum* NCC2705, **Mol Cell Proteomics**, v.5, p.1105, 2006.

ZHAO, G., CECI, P., ILARI, A., GIANGIACOMO, L., LAUE, T. M., CHIANCONE, E., AND CHASTEEN, N. D., Iron and Hydrogen Peroxide Detoxification Properties of DNA-binding Protein from Starved Cells. **J. Biol. Chem.**, v.277, p.27689, 2002.

ZOETENDAL, E. G., RAJILIC-STOJANOVIC, M., AND DE VOS, W. M., High-throughput diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota, **Gut**, v.57, p.1605, 2008.

ZOETENDAL, E. G., VAUGHAN, E. E., AND DE VOS, W. M., A microbial world within us, **Molecular Microbiology**, v.59, p.1639, 2006.

ZUBER, P., Spx-RNA Polymerase Interaction and Global Transcriptional Control during Oxidative Stress, **J. Bacteriol.**, v.186, p.1911, 2004.