



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas Departamento de
Genética, Ecologia E Evolução
Programa de Pós-Graduação em Genética

Giovanna Angeli Belo

**Efeitos da expressão heteróloga da proteína SlpB de *Propionibacterium freudenreichii* CIRM-
BIA 129 em *Lactococcus lactis* NCDO2118 e suas propriedades probióticas aplicadas em
modelo murino de colite induzida por DSS**

Belo Horizonte

2021

Giovanna Angeli Belo

Efeitos da expressão heteróloga da proteína SlpB de *Propionibacterium freudenreichii* CIRM-BIA 129 em *Lactococcus lactis* NCDO2118 e suas propriedades probióticas aplicadas em modelo murino de colite induzida por DSS

Versão Final

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientador: Prof. Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo

Coorientador: Dr. Fillipe Luiz Rosa do Carmo

Belo Horizonte

2021

043

Belo, Giovanna Angeli.

Efeitos da expressão heteróloga da proteína SlpB de *Propionibacterium freudenreichii* CIRM-BIA 129 em *Lactococcus lactis* NCDO2118 e suas propriedades probióticas aplicadas em modelo murino de colite induzida por DSS [manuscrito] / Giovanna Angeli Belo. – 2021.

108 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Vasco Ariston de Carvalho Azevedo. Coorientador: Dr. Fillipe Luiz Rosa do Carmo.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Genética. 2. Clonagem Molecular. 3. Proteínas Recombinantes. 4. Probióticos. 5. *Lactococcus lactis*. 6. *Propionibacterium*. I. Azevedo, Vasco Ariston de Carvalho. II. Carmo, Fillipe Luiz Rosa do. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título

CDU: 575



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO	305/2021 entrada
Giovanna Angeli Belo	1º/2019 CPF: 073.768.886-67

Às nove horas do dia **01 de março de 2021**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora de Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: "**Efeitos da expressão heteróloga da proteína SlpB de Propionibacterium freudenreichii CIRM-BIA 129 em Lactococcus lactis NCDO2118 e suas propriedades probióticas aplicadas em modelo murino de colite induzida por DSS**", requisito para obtenção do grau de Mestre em **Genética**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Vasco Ariston de Carvalho Azevedo**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	CPF	Indicação
Vasco Ariston de Carvalho Azevedo	UFMG	283.171.225-49	Aprovada
Fillipe Luiz Rosa do Carmo	UFMG	053.826.576-02	Aprovada
Aristóteles Góes Neto	UFMG	544.348.825-20	Aprovada
Ana Cristina Gomes Santos	UNA	055.108.706-98	Aprovada
Álvaro Cantini Nunes	UFMG	678.159.606-34	Aprovada
Christina Stewart Bittencourt Bogsan	USP	153.275.258-05	Aprovada

Pelas indicações, a candidata foi considerada: **APROVADA**

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 01 de março de 2021.

Vasco Ariston de Carvalho Azevedo - Orientador (UFMG)

Fillipe Luiz Rosa do Carmo - Coorientador (UFMG)

Aristóteles Góes Neto (UFMG)

Ana Cristina Gomes Santos (UNA)

Álvaro Cantini Nunes (UFMG)

Christina Stewart Bittencourt Bogsan (USP)

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Fillipe Luiz Rosa do Carmo, Usuário Externo**, em 01/03/2021, às 11:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alvaro Cantini Nunes, Membro**, em 01/03/2021, às 12:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vasco Ariston de Carvalho Azevedo, Professor do Magistério Superior**, em 01/03/2021, às 13:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cristina Stewart Bogsan, Usuário Externo**, em 02/03/2021, às 15:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Aristoteles Goes Neto, Professor do Magistério Superior**, em 04/03/2021, às 11:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Cristina Gomes Santos Hostt, Usuário Externo**, em 05/03/2021, às 08:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 0589363 e o código CRC F107CFF4.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética

FOLHA DE APROVAÇÃO

“Efeitos da expressão heteróloga da proteína SlpB de *Propionibacterium freudenreichii* CIRM-BIA 129 em *Lactococcus lactis* NCDO2118 e suas propriedades probióticas aplicadas em modelo murino de colite induzida por DSS”

Giovanna Angeli Belo

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Vasco Ariston de Carvalho Azevedo – Orientador
UFMG

Fillipe Luiz Rosa do Carmo – Coorientador
UFMG

Aristóteles Góes Neto
UFMG

Ana Cristina Gomes Santos
UNA

Álvaro Cantini Nunes
UFMG

Christina Stewart Bittencourt Bogsan
USP

Belo Horizonte, 01 de março de 2021.



Documento assinado eletronicamente por **Fillipe Luiz Rosa do Carmo, Usuário Externo**, em 01/03/2021, às 11:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#)



Documento assinado eletronicamente por **Alvaro Cantini Nunes, Membro**, em 01/03/2021, às 12:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#)



Documento assinado eletronicamente por **Vasco Ariston de Carvalho Azevedo, Professor do Magistério Superior**, em 01/03/2021, às 13:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#)



Documento assinado eletronicamente por **Cristina Stewart Bogsan, Usuário Externo**, em 02/03/2021, às 15:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#)



Documento assinado eletronicamente por **Aristoteles Goes Neto, Professor do Magistério Superior**, em 04/03/2021, às 11:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Cristina Gomes Santos Hostt. Usuário Externo**, em 05/03/2021, às 08:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0589363** e o código CRC **F107CFF4**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço meu orientador Prof. Dr. Vasco, por abrir as portas do seu laboratório, pela oportunidade e pelos ensinamentos;

Ao meu coorientador Dr. Fillipe, por toda paciência, pelo carinho, ensinamentos, pelo apoio científico e por ser um exemplo para todos nós;

Às grades amizadas que fiz, Barbara e Sara, com certeza o caminho até aqui foi muito mais fácil por ter vocês ao meu lado. Obrigada por me ensinarem tanto;

Aos meus queridos colegas que me ajudaram tanto, Marina, Gabriel, Bel e Emiliano;

A todo o grupo do LGCM pelo companheirismo;

À Pós-Graduação em Genética e aos programas de fomento;

Agradeço também aos meus pais por acreditarem em mim e nunca medirem esforços, pela educação, suporte e todo amor que me deram. Obrigada por tudo;

Meu irmão, Bernardo, e minha família, pelo carinho e apoio;

Ao César, pelo companheirismo, pelo carinho, apoio, amor e paciência mesmo com a distância;

A Ana Clara que esteve ao meu lado em todos os momentos durante esses dois anos;

E finalmente agradeço a Deus, por estar sempre presente e por me guiar até aqui!

RESUMO

As bactérias probióticas usadas na produção de produtos funcionais fermentados têm sido investigadas quanto às suas capacidades de modular respostas inflamatórias em distúrbios do trato gastrointestinal, como as doenças inflamatórias intestinais (DII) que causam alterações irreversíveis na estrutura e função dos tecidos. A colite ulcerativa (UC), é a DII mais frequente na população e é caracterizada por inflamação proeminente do cólon humano. Recentemente, a linhagem *Propionibacterium freudenreichii* CIRM-BIA 129 teve seu potencial anti-inflamatório e de adesão *in vitro* às células intestinais ligados a presença de proteína S-layer B (SlpB). As proteínas da camada S ou *S-layer proteins* (Slp) podem conferir características específicas à espécie, como resistência a alterações ambientais e adesão a superfícies (células e tecidos). Desta forma, afim de investigar o papel da proteína SlpB, clonamos sua sequência no vetor pXIES-SEC. O sistema de expressão XIES é induzido por xilose e tem como hospedeira a linhagem *Lactococcus lactis* NCDO2118, uma linhagem com propriedades probióticas. Após a confirmação da expressão da proteína, foram conduzidos ensaios *in vitro*, que apontaram um aumento da tolerância aos sais biliares e maior potencial de adesão da linhagem recombinante. O potencial probiótico de *L. lactis* NCDO2118 abrigando pXYSEC:slpB (*L. lactis*-SlpB) foi então avaliado em um modelo murino de UC induzido por Dextrano Sulfato de Sódio (DSS). Durante a UC, os camundongos que receberam *L. lactis*-SlpB exibiram uma redução significativa dos sintomas de gravidade da colite, com perda de peso atenuada, menor índice de atividade da doença, encurtamento limitado do comprimento do cólon e pontuação histopatológica reduzida em comparação com o grupo DSS e o grupo controle (*L. lactis* NCDO2118 WT). Além disso, a administração de *L. lactis*-SlpB aumentou a expressão gênica das proteínas de junção *zo-1*, *cln-1*, *cln-5* e *muc-2* no cólon. *L. lactis*-SlpB também aumentou a secreção de IL10 e TGF β , e diminuiu os níveis de IL17, TNF e IL12 no cólon. Desta forma, este trabalho demonstra que *L. lactis* NCDO 2118 albergando a proteína SlpB recombinante, previne o processo inflamatório durante a colite induzida por DSS em camundongos, evidenciando as propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras da proteína SlpB, que associada a linhagem demonstrou-se capaz de modular a inflamação.

Palavras chave: Clonagem; Proteínas recombinantes; Probióticos; Proteína S-layer B; *Lactococcus lactis*; *Propionibacterium freudenreichii*.

ABSTRACT

Probiotic bacteria used in the production of functional fermented products have been investigated for their ability to modulate inflammatory responses in disorders of the gastrointestinal tract, such as inflammatory bowel diseases (IBD) that cause irreversible changes in the structure and function of tissues. Ulcerative colitis (UC) is the most common IBD in the population and is characterized by prominent inflammation of the human colon. Recently, the *Propionibacterium freudenreichii* CIRM-BIA 129 strain had its anti-inflammatory potential and in vitro adhesion to intestinal cells linked to the presence of S-layer B (SlpB) protein. S-layer proteins or S-layer proteins (Slp) can give specific characteristics to the species, such as resistance to environmental changes and adhesion to surfaces (cells and tissues). Thus, in order to investigate the role of the SlpB protein, we clone its sequence in the pXIES-SEC vector. The XIES expression system is induced by xylose and its host is the strain *Lactococcus lactis* NCDO2118, a strain with probiotic properties. After confirming the protein expression, *in vitro* assays were conducted, which showed an increase in tolerance to bile salts and greater adhesion potential of the recombinant strain. The probiotic potential of *L. lactis* NCDO2118 harboring pXYSEC:slpB (*L. lactis*-SlpB) was then evaluated in a murine UC model induced by Dextran Sodium Sulphate (DSS). During UC, mice that received *L. lactis*-SlpB exhibited a significant reduction in the symptoms of colitis severity, with attenuated weight loss, lower disease activity index, limited shortening of the colon length and reduced histopathological score compared to the DSS group and the control group (*L. lactis* NCDO2118 WT). Also, the administration of *L. lactis*-SlpB increased the gene expression of the *zo-1*, *cln-1*, *cln-5* and *muc-2* junction proteins in the colon. *L. lactis*-SlpB also increased the secretion of IL10 and TGF β , and decreased the levels of IL17, TNF and IL12 in the colon. Thus, this work demonstrates that *L. lactis* NCDO 2118, harboring the recombinant SlpB protein, prevents the inflammatory process during DSS-induced colitis in mice, evidencing the anti-inflammatory and immunomodulatory properties of the SlpB protein, which is associated with the strain proved to be capable of modulating inflammation.

Keywords: Cloning; Recombinant proteins; Probiotics; S-layer protein B; *Lactococcus lactis*; *Propionibacterium freudenreichii*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação da barreira epitelial intestinal.....	19
Figura 2 - Ciclo de Wood-Werkman utilizado pelas <i>Propionibacterium</i> spp. para produção de ácido propiônico.....	24
Figura 3 - <i>P. freudenreichii</i> CIRM-BIA 118 coberta por uma camada superficial mais externa (A) que é removida por extração usando Cloreto de Guanidina (B).	26
Figura 4 - Disposição das subunidades da camada S organizadas na simetria oblíqua (p1, p2), tetragonal (p4) ou hexagonal (p3, p6)..	27
Figura 5 - Domínios funcionais previstos na proteína de superfície SlpB de <i>P. freudenreichii</i>	28
Figura 6 - Modelo de vetor de expressão..	30
Figura 7 - Representação esquemática do vetor de expressão induzível por xilose para a produção (a) extracelular de Nuc e (b) intracelular de Nuc..	32
Figura 8 - Fluxograma da metodologia utilizada para clonagem do inserto <i>slpB</i> no vetor pXYSEC.	36
Figura 9 - Representação esquemática do vetor pUC57 contendo o inserto <i>slpB</i>	39
Figura 10 - Representação esquemática do vetor pXYSEC portando a sequência codificadora da proteína nuclease.....	39
Figura 11 – Delineamento experimental utilizado para indução da colite utilizando DSS e tratamento utilizando <i>L. lactis</i> NCDO2118 WT e <i>L. lactis</i> NCDO2118 pXYSEC:slpB..	51
Figura 12 - Distribuição da frequência de uso de códons ao longo do comprimento da sequência do gene.....	60
Figura 13 - A distribuição percentual de códons em grupos de qualidade de códon computados após (A) e antes da otimização (B)..	60
Figura 14 – Conteúdo GC da sequência da proteína após (A) e antes da otimização (B)..	61
Figura 15 - Confirmação da purificação do DNA plasmidial pUC: <i>slpB</i>	61
Figura 16 - Digestão dos plasmídeos pUC: <i>slpB</i> e pXYSEC: <i>nuc</i> extraídos de <i>E. coli</i> TOP 10 com as enzimas de restrição EcoRI e NsiI.	62
Figura 17 - Representação esquemática do vetor pXYSEC portando o inserto de interesse <i>slpB</i>	63
Figura 18 - Screening de colônias de bactérias <i>E. coli</i> TOP10 após a transformação com o plasmídeo de pXYSEC:slpB.	64
Figura 19 - Screening de colônias de bactérias <i>L. lactis</i> NCDO2118 após a transformação com o plasmídeo de pXYSEC: <i>slpB</i>	64
Figura 20 - Digestão dos plasmídeos pXYSEC:slpB extraídos bactérias <i>L. lactis</i> NCDO2118.....	65
Figura 21 - Proteínas extraídas do sobrenadante.....	66
Figura 22 - Detecção da proteína SlpB por Western-Blot utilizando anti-slpB.	66
Figura 23 - Curvas de crescimento das bactérias <i>L. lactis</i> NCDO2118 WT, <i>L. lactis</i> PXYSEC: <i>nuc</i> e <i>L. lactis</i> PXYSEC: <i>slpB</i>	68
Figura 24 - Taxa de sobrevivência das linhagens de <i>L. lactis</i> NCDO2118 WT, <i>L. lactis</i> PXYSEC: <i>nuc</i> e <i>L. lactis</i> PXYSEC:slpB após estresse ao pH ácido (pH 2,0) (A) e aos sais biliares 0,5% (B).	69

Figura 25 - Resultados obtidos a partir da análise do Potencial Zeta das amostras bacterianas de <i>L. lactis</i> NCDO2118 WT, <i>L. lactis</i> PXYSEC:nuc e <i>L. lactis</i> PXYSEC:slpB ressuspendidas em tampão KH ₂ PO ₄ em três diferentes pH 7.0 (A), 5.0 (B) e 2.0 (C)....	71
Figura 26 - Adesão microbiana a hidrocarbonetos (MATH), utilizando os solventes Clorofórmio (A), Acetato de etila (B) e Xilol (C).....	73
Figura 27 - Resultados do teste de auto-agregação bacteriana realizado com a <i>L. lactis</i> NCDO2118 WT, <i>L. lactis</i> PXYSEC:nuc e <i>L. lactis</i> PXYSEC:slpB.....	75
Figura 28 - Variação de peso corporal dos camundongos durante os 7 dias experimentais (A) e variação de peso corporal relacionando o primeiro ao último dia (B).....	77
Figura 29 - Avaliação do consumo hídrico (A) e alimentar (B) durante os 7 dias experimentais.....	78
Figura 30 - Índice de Atividade da Doença durante os 7 dias experimentais (A) e Índice de Atividade da Doença do último dia (B).....	79
Figura 31 - Análise do comprimento do cólon.....	80
Figura 32 - Imagens das micrografias das análises histopatológicas do tecido do cólon, representados pelos grupos <i>Naive</i> (A), DSS (B), NCDO WT + DSS (C) e NCDO pXYSEC:slpB (D).	81
Figura 33 - Análise do escore histopatológico do tecido do cólon.	82
Figura 34 - Profundidade das criptas intestinais do cólon nos animais saudáveis e inflamados com DSS.	82
Figura 35 - Imagens das micrografias para análise de células caliciformes no tecido do cólon, representados pelos grupos <i>Naive</i> (A), DSS (B), NCDO WT + DSS (C) e NCDO pXYSEC:slpB (D).....	83
Figura 36 - Quantificação de células caliciformes por campo..	84
Figura 37 - Quantificação das enzimas mieloperoxidase (MPO) (A) e peroxidase eosinofílica (EPO) (B) no tecido do cólon.	85
Figura 38 - Concentração de IgA secretória no intestino delgado..	86
Figura 39 - Análise da expressão gênica de <i>muc2</i> (A), <i>zo-1</i> (B), <i>zo-2</i> (C), <i>cln-1</i> (D), <i>cln-5</i> (E), <i>ocln</i> (F).	88
Figura 40 - Análise da expressão gênica de TGFβ (A), IL-10 (B), INFg (C), TNFa (D), IL-17 (E), IL-6 (F), IL-1β (G), IL-12 (H).....	89
Figura 41 - Análise da expressão gênica de iNOS (A), PPARg (B) HMOX (C).....	90
Figura 42 - Concentrações das citocinas IL-10 (A), TGFβ (B), IL-17 (C), INFg (D), IL-1b (E), TNFa (F), IL-12 (G) e IL-6 (H) quantificadas por ELISA.....	92
Figura 43 - Desenho esquemático representando os resultados obtidos a partir do tratamento da colite ulcerativa com <i>L. lactis</i> NCDO2118 portando a proteína recombinante SlpB.	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Mudanças na composição da microbiota intestinal de pacientes com DII....	21
Tabela 2 – Linhagens bacterianas e plasmídeos utilizados neste trabalho.	37
Tabela 3 - Primers utilizados para amplificação do gene da proteína recombinante SlpB.	42
Tabela 4 - Primers utilizados para sequenciamento do gene da proteína recombinante SlpB no plasmídeo pXYSEC:slpB.	43
Tabela 5 – Pontuação do escore macroscópico da colite (COOPER et al., 1993)	52
Tabela 6 – Pontuação do escore histopatológico da colite (WIRTZ et al., 2017)	53
Tabela 7 - Lista de primers utilizados no ensaio de qPCR.....	56

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

Amp – Ampicilina

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BL – Bactérias lácticas

BSA – Albumina de soro bovino (*Bovine serum albumin*)

Cm – Cloranfenicol

D.O. – Densidade ótica no comprimento de onda (λ)

DAI – Índice de Atividade da Doença

DII – Doenças Inflamatórias Intestinais

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DSS – Dextrano Sulfato de Sódio

E. coli - *Escherichia coli*

FAO - Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura, do inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations*

GRAS - Geralmente Reconhecidos como Seguros, do inglês *Generally Recognized As Safe*

IEC – Células do epitélio intestinal, do inglês *Intestinal Epithelial Cell*

IgA- Imunoglobulina do tipo A

IgG- Imunoglobulina do tipo G

L. lactis NCDO2118 - *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO2118

LB – Meio Luria Bertani

M17 Sac-Gli – Meio M17 suplementado com glicose (0,5%) e sacarose (0,5M)

MAMPs – padrões moleculares associados a micróbios, do inglês *Microbe-associated molecular patterns*

MATH – Adesão Microbiana a Hidrocarbonetos

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

Nuc – Nuclease

ORF- open reading frame

P. freudenreichii – *Propionibacterium freudenreichii* CIRM-BIA 129

PCR- Reação em cadeia da polimerase (Polimerase Chain Reaction)

PMSF – fluoreto de fenilmetilsulfonil (*phenylmethylsulfonyl fluoride*)

PRRs – receptores de reconhecimento de padrões, do inglês *Pattern Recognition Receptors*

RBS – Sítio de ligação com o ribossomo, do inglês *ribosomal binding site*

RNA – Ácido ribonucleico

SDS-PAGE- Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

Slp – Proteína da camada superficial, do inglês *Surface layer protein*

SlpB - proteína B da camada S, do inglês *S-layer protein B*

SP – Peptídeo sinal

TGI – Trato gastrointestinal

UC – Colite ulcerativa, do inglês *Ulcerative colitis*

UFC – unidade formadora de colónia

WB – Western Blot

WT – wild type, refere-se linhagem selvagem da bactéria

XIES – Sistema de expressão induzível por xilose, do inglês *Xylose-Inducible Expression System*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Trato gastrointestinal e Microbiota.....	18
1.1.1 Doenças Inflamatórias Intestinais	20
1.1.2 Colite	22
1.2 Probióticos	22
1.3 Propionibacteria	23
1.3.1 <i>Propionibacterium freudenreichii</i>	25
1.4 Proteínas de superfície.....	26
1.4.1 <i>Propionibacterium freudenreichii</i> 129 Surface layer protein B (SlpB)	27
1.5 <i>Lactococcus lactis</i>	28
1.5.1 Utilização para expressão de proteínas	30
1.5.2 XIES	31
2. JUSTIFICATIVA.....	34
3. OBJETIVO	35
3.1 Objetivo geral	35
3.2 Objetivos específicos.....	35
4. MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1 Estratégia Experimental de clonagem	36
Fluxograma da metodologia.....	36
4.2 Linhagens bacterianas, plasmídeos, condições de cultivo e estocagem	37
4.3 Manipulação do DNA.....	38
4.4 Desenho e otimização de códons da sequência do gene <i>slpB</i> de <i>Propionibacterium freudenreichii</i> CIRM-BIA 129	38
4.5 Purificação dos plasmídeos pUC: <i>slpB</i> e pXYSEC: <i>nuc</i>	38
4.6 Resolução Eletroforética	40
4.7 Digestão enzimática dos plasmídeos pUC: <i>slpB</i> e pXYSEC: <i>nuc</i>	40
4.8 Purificação dos fragmentos de DNA correspondentes ao gene <i>slpB</i> e ao vetor de expressão pXYSEC desprovido da ORF <i>nuc</i>	40
4.9 Ligação da ORF <i>slpB</i> no vetor pXYSEC.....	41
4. 10 Preparo de células competentes	41
4.11 Transformação por choque térmico de células quimiocompetentes.....	42
4.12 Reação em cadeia da Polimerase (PCR)	42
4.13 Sequenciamento nucleotídico da região codificadora da proteína de interesse.....	43
4.14 Preparação de <i>L. lactis</i> NCDO2118 eletrocompetente	43
4.15 Transformação da <i>L. lactis</i> NCDO2118	44

4.16	Produção da proteína recombinante SlpB em <i>L. lactis</i> NCDO2118	44
	Expressão do gene <i>slpB</i> , produção e extração de proteínas	44
4.16.1	Proteínas totais	45
4.16.2	Proteínas do sobrenadante	45
4.16.3	Proteínas de superfície	46
4.16.4	Eletroforese de proteínas em condição desnaturante em gel de poliacrilamida – SDS-PAGE.....	46
4.16.5	Detecção da proteína recombinante por Western blot (WB)	46
4.17	Avaliação <i>in vitro</i> de características probióticas.....	47
4.17.1	Curva de crescimento	48
4.17.2	Taxa de sobrevivência após estresse ácido e sais biliares	48
4.17.3	Análise do potencial zeta	49
4.17.4	Análise de hidrofobicidade da superfície celular.....	49
4.17.5	Análise da auto-agregação bacteriana.....	49
4.18	Avaliação dos efeitos da linhagem recombinante <i>L. lactis</i> NCDO2118 pXYSEC: <i>slpB</i> no modelo de colite induzida por DSS	50
4.18.1	Animais.....	50
4.18.2	Preparo das bactérias para administração intragástrica.....	50
4.18.3	Desenho experimental e colite induzida por DSS.....	50
4.18.4	Avaliação da colite	51
4.18.5	Quantificação do infiltrado de neutrófilos no intestino.....	53
4.18.6	Quantificação do infiltrado de eosinófilos no intestino	54
4.18.7	Avaliação dos níveis de sIgA	55
4.18.8	Análise de expressão gênica no cólon	55
4.18.9	Quantificação de citocinas através de ensaio imunoenzimático (ELISA)...	58
4.19	Análises estatísticas	58
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5.1	Otimização de códons da sequência do gene <i>slpB</i>	59
5.2	Clonagem do inserto da proteína SlpB no vetor pXYSEC	61
5.3	Transformação da <i>E. coli</i> TOP 10.....	63
5.4	Transformação da <i>Lactococcus lactis</i> NCDO 2118	64
5.5	Expressão da proteína SlpB.....	65
5.6	Avaliação <i>in vitro</i> de características probióticas.....	67
5.6.1	Curva de crescimento	67
5.6.2	Taxa de sobrevivência após estresse ácido e sal biliar	68
5.6.3	Análise do potencial zeta	70
5.6.4	Análise da hidrofobicidade da superfície celular	72
5.6.5	Análise da auto-agregação bacteriana.....	74

5.7 Avaliação dos efeitos da linhagem recombinante <i>L. lactis</i> NCDO2118 pXYSEC: <i>slpB</i> no modelo de colite induzida por DSS	76
5.7.1 Análise hídrica e alimentar e evolução do peso dos animais.....	76
5.7.2 Índice de Atividade da Doença.....	79
5.7.3 Análise do comprimento do cólon	80
5.7.4 Análise histomorfológica	81
5.7.5 Quantificação das enzimas mieloperoxidase e peroxidase eosinofílica.....	84
5.7.6 Quantificação da secreção de imunoglobulina A (sIgA) no intestino delgado	86
5.7.7 Modulação da expressão de genes implicados na resposta imunomodulatória e barreira epitelial no cólon.....	86
5.7.8 Quantificação de citocinas pró e anti-inflamatórias no cólon	91
6. CONCLUSÃO	94
7. PERSPECTIVAS	95
REFERÊNCIAS	96
ANEXOS.....	108

1. INTRODUÇÃO

1.1 Trato gastrointestinal e Microbiota

O trato gastrointestinal (TGI) dos mamíferos é um complexo sistema responsável pela digestão e absorção de alimentos. Este grande sistema se estende da boca ao anus, é totalmente revestido por mucosa e colonizado por 100 trilhões de microrganismos, entre vírus, fungos, protozoários e bactérias, sendo estas as mais abundantes (VALDES *et al.*, 2018). Esta grande variedade de microrganismos constituem a microbiota intestinal, que exerce um papel fundamental na maturação e desenvolvimento de células imunológicas, na coleta e armazenamento de energia, além de participam também de várias funções metabólicas (CLEMENTE *et al.*, 2012; PIWOWAREK *et al.*, 2018). Juntos, o tecido epitelial, a mucosa, que recobrem todo o TGI, e a microbiota, compõe um sistema que age na proteção contra patógenos, mantem a homeostase e evitam o aparecimento de diversas patologias (MALOY; POWRIE, 2011; PETERSON; ARTIS, 2014).

O epitélio intestinal (do inglês *Intestinal Epithelial Cell*, IECs) (FIG. 1) é formado por uma camada única de enterócitos ligadas entre si por proteínas de junção intercelulares em zonas de oclusão (*tight junctions*) (PETERSON; ARTIS, 2014). Nele estão presentes outros tipos celulares como os linfócitos intraepiteliais, as células M, as células de Paneth e as células caliciformes (GARCIA-CARBONELL *et al.*, 2019). As células caliciformes são IECs especializadas e, por sua vez, são responsáveis pela secreção de mucinas, que criam uma barreira de muco capazes de diminuir o contato entre os microrganismos luminiais e a superfície das células epiteliais do intestino (HILL; ARTIS, 2010). Células da lâmina própria produzem Imunoglobulina A (IgA) e secretam para o lúmen e compõe o mecanismo protetor das mucosas, pois possui atividade antimicrobiana para impedir que as bactérias ultrapassem a mucosa intestinal (GROOTJANS *et al.*, 2019).

A mucosa intestinal abriga também uma infinidade de microrganismos comensais permitindo a sua manutenção no interior do lúmen, a chamada microbiota, composta majoritariamente por bactérias, principalmente Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria e Bacteroidetes (THURSBY; JUGE, 2017). Em condições normais, as células do tecido epitelial intestinal indentificam os microrganismos comensais através de componentes microbianos (MAMPs, padrões moleculares associados a micróbios),

através de seus diferentes tipos de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs); e o tecido linfóide associado ao intestino gera tolerância para as bactérias comensais, principalmente através da ação de células T reguladoras (Treg) (GARCIA-CARBONELL *et al.*, 2019; HILL; ARTIS, 2010). Estes microrganismos comensais impedem o estabelecimento de bactérias patogênicas e auxiliam na maturação de células imunológicas (ZHANG; WEN, 2021). Desta forma a alteração da microbiota por fatores como dieta, o uso de drogas, estresses ambientais e os fatores genéticos, podem levar a um quadro de disbiose, caracterizado por perda da homeostase intestinal com redução da diversidade microbiana (ZIELIŃSKA; KOŁOŻYN-KRAJEWSKA, 2018) e consequentemente chegar a causar doenças gastrointestinais, como Colite Ulcerativa, Doença de Crohn (BASSO *et al.*, 2019).

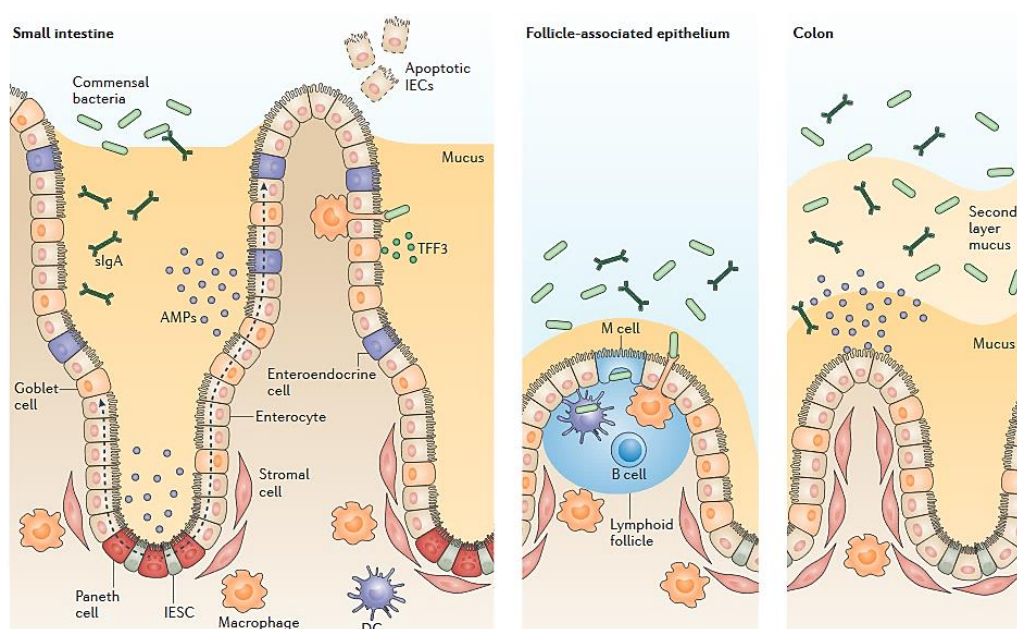


Figura 1 – Representação da barreira epitelial intestinal. As células caliciformes secretoras e as células de Paneth secretam muco e proteínas antimicrobianas (AMPs) para promover a exclusão de bactérias da superfície epitelial. A transcitose e a liberação luminal de IgA secretora (sIgA) contribuem ainda mais para essa função de barreira. Células em micro dobras (células M) e células caliciformes medeiam o transporte de antígenos luminiais e bactérias vivas através da barreira epitelial para células dendríticas (DCs), e macrófagos residentes no intestino amostram o lúmen através de dendritos transepiteliais. (PETERSON; ARTIS, 2014).

Contudo, algumas bactérias isoladas do trato gastrointestinal humano, que não chegam a colonizá-lo, mas podem constantemente transitar pelo TGI através da alimentação, podem exercer efeitos benéficos ao hospedeiro (VOIDAROU *et al.*, 2021). Estes microrganismos conhecidos como probióticos podem alterar a diversidade microbiana, aumentar a função da barreira epitelial e modular as respostas imunes do hospedeiro. Sendo exploradas hoje como importante recurso para reverter o quadro de disbiose em

doenças gastrointestinais (LIMKETKAI *et al.*, 2020; GARCIA-CARBONELL *et al.*, 2019; PENG *et al.*, 2020).

1.1.1 Doenças Inflamatórias Intestinais

Distúrbios inflamatórios crônicos que afetam o TGI são denominados Doenças Inflamatórias Intestinais (do inglês *Inflammatory Bowel Diseases*) (DII) e manifestam-se em duas formas clínicas principais: a Doença de Crohn (do inglês *Crohn's Disease*, CD), que pode afetar qualquer parte do trato gastrointestinal, e a Colite Ulcerativa (do inglês *Ulcerative Colitis*, UC), que afeta principalmente a mucosa do cólon (ZHENG; WEN, 2021). Três fatores principais contribuem para a patogênese das DII: fatores genéticos, o sistema imunológico do hospedeiro e fatores ambientais, como a microbiota intestinal (HILL; ARTIS, 2010). Os principais sintomas clínicos apresentados em comum pelas duas idiopatias são: dor abdominal, diarreia, sangramento retal, mal-estar e perda de peso (STEPANIUK *et al.*, 2015).

Sabe-se que a disbiose desempenha um papel fundamental na patogênese pelas DIIs acarretam numa mudança significativa como a redução de 25% da microbiota, com o aumento de microrganismos patogênicos e a diminuição microrganismos benéficos (CARVALHO; CARMO; JUNIOR, 2017), como demonstra a tabela 1. Estes mecanismos ainda não são completamente compreendidos, o desequilíbrio microbiano reduz os agentes anti-inflamatórios cruciais e favorece o desenvolvimento da inflamação. Entretanto, a inflamação por si também contribui para o início de um ambiente disbiótico. Independente de qual fator desencadeia o desenvolvimento das DII, pode-se perceber que há uma forte interação sinérgica entre eles. Desta forma então, torna-se crucial o desenvolvimento de terapias que estabeleçam o equilíbrio microbiano (BASSO *et al.*, 2019).

Os tratamentos convencionais para DII baseiam-se em amenizar a inflamação e suprimir a resposta imunológica intensificada com esteróides, tiopurinas e anticorpos anti-fator de necrose tumoral. Porém, apesar da eficácia razoável, estes tratamentos ainda apresentam muitos efeitos colaterais (VEERAPPAN; BETTERIDGE; YOUNG, 2012). Com o aumento dos casos e a falta de terapias seguras e eficazes, as DII tornaram-se um problema de saúde global (ANANTHAKRISHNAN, 2015). Desta forma, o tratamento

com probióticos tem sido explorado como um recurso para tentar reverter a disbiose nas DII (LIMKETKAI *et al.*, 2020; TAMAKI *et al.*, 2016).

Tabela 1 - Mudanças na composição da microbiota intestinal de pacientes com DII.

Microrganismos	Comensal (C) ou patogênico (P)	Colite Ulcerativa	Doença de Crohn
Verrucomicrobia	C	↓	↓
Bifidobacterium	C	↓	↓
Roseburia species	C	↓	?
Bacteroides	C	↓↑	↑
Firmicutes	C	↓	↓
Clostridium species (clusters IV e XIVa)	C	↓	↓↑
Saccharomyces cerevisiae	C	↓	↓
Pseudomonas	P	↓	↓
Proteobacteria	P	↑	↑
Fusobacterium	P	↑	↑
Ruminococcus gnavus	P	↑	↑
Candida albicans	P	↑	↑

Fonte: (BASSO *et al.*, 2019)

Contudo, os estudos que demonstram o uso de probióticos no modelo de Doença de Crohn ainda são limitados. Já foram utilizados linhagens como *Lactobacillus Rhamnosus* GG e uma combinação de espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (VEERAPPAN; BETTERIDGE; YOUNG, 2012), mas devido ao tamanho pequeno das amostras ainda é difícil obter conclusões definitivas (LIMKETKAI *et al.*, 2020).

Em contra partida, resultados promissores vem sendo apresentados no tratamento de Colite Ulcerativa com linhagem probióticas (BASSO *et al.*, 2019). A microbiota intestinal equilibrada e as respostas antiinflamatórias protetoras desempenham um papel fundamental na melhoria da UC em pacientes tratados com VSL#3 uma mistura de potente de oito diferentes linhagem probióticas: *Bifidobacterium* (*B. breve*, *B. infantis* and *B. longum*), *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. delbrueckii* ssp. *Bulgaricus*, *L. casei*, and *L. plantarum*) e *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* (DHILLON; SINGH, 2020; CONNELL *et al.*, 2018). Mas ainda estão sendo desenvolvidos estudos para amplificar a eficiência dos probióticos, através de linhagens recombinantes capazes de expressar moléculas anti-inflamatórias (PECINI *et al.*, 2020; CARVALHO *et al.*, 2017; CARVALHO *et al.*, 2016; BRAAT *et al.*, 2006).

1.1.2 Colite

Estudos vem sendo desenvolvidos com modelos de colite murino para avaliar as características fisiológicas da doença e as possíveis formas de tratamento. O modelo de colite in DSS foi originalmente descrito por Okayasu e colaboradores (1990) e tornou-se um dos principais modelos utilizados atualmente, pois induz facilmente a inflamação e desenvolve a colite aguda semelhante a UC humana. Na colite os sinais patológicos são evidentes, ocorre perda de peso, sangramento retal, diarreia, encurtamento do cólon e destruição da camada epitelial. Há também a presença do infiltrado inflamatório composto por neutrófilos e eosinófilos, além da destruição do conteúdo de mucina, causado pelo DSS, aumentando a exposição à antígenos presentes no lúmen intestinal (KUSHKEVYCH; MONIKA, 2021).

1.2 Probióticos

O termo probiótico foi utilizado pela primeira vez em 1965, pelos pesquisadores Lilly e Stillwell, que utilizaram o termo para definir microrganismos que tiveram efeitos positivos no crescimento de outros microrganismos (LILLY; STILLWELL, 1965). Entretanto, foi somente no início do século 20 que os pesquisadores sugeriram que a flora intestinal poderia ser alterada com bactérias benéficas substituindo outros patógenos e levando ao conceito de probiótico conhecido hoje (MARCO *et al.*, 2021). Atualmente, os probióticos são definidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e reconhecido pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) como “micro-organismo vivo que, quando administrado em quantidades adequadas, confere um benefício à saúde do indivíduo” (ANVISA, 2018).

Os microrganismos probióticos podem ser encontrados nos mais diversos tipos de ambiente, sendo mais comumente encontrados em produtos lácteos, como queijos e leites fermentados, mas também presentes em alimentos não lácteos. Além disso, são fundamentalmente encontrados no trato gastrointestinal, sendo a microbiota intestinal composta por trilhões de bactérias (REZAC *et al.*, 2018)

Diversos estudos já demonstraram a importância e o papel dos probióticos na manutenção da saúde humana, possuindo atividade antimicrobiana, efeitos imunológicos (efeito adjuvante, expressão de citocinas e IgA secretório), influência em atividades

enzimáticas e entrega de enzimas, e principalmente, atuam na estimulação da função da barreira epitelial (HEALTH, 2017; PENG *et al.*, 2020).

Com isso, nas duas últimas décadas foi possível observar um avanço exponencial de publicações na área, demonstrando um grande interesse científico, mercadológico e biotecnológico de novas linhagens probióticas (LEE *et al.*, 2018; LIU *et al.*, 2021). No Brasil, a ANVISA é responsável por certificar a segurança e eficácia de novas linhagens probióticas, seguindo as indicações Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (*Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO*) determinaram três critérios como fundamentais: Comprovação da identidade, comprovação da segurança e comprovação do benefício (FAO *et al.*, 2002; ANVISA, 2019).

Os probióticos podem ser pertencer à diferentes gêneros de bactérias, sendo mais populares *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*. Porém, além das bactérias do gênero *Lactobacillus*, outras bactérias lácticas (BL) tem se destacado como probióticas. Compõe também esse grupo bactérias dos gêneros *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* e *Weissella*, sendo *Lactobacillus ssp*, *Streptococcus ssp*, *Lactococcus ssp*. as espécies mais amplamente estudadas (MOKOENA, 2017).

Linhagens de bactérias lácticas têm uma longa história de uso seguro, e tem sido consumidas diariamente desde que os humanos começaram a se alimentar de leite fermentado. Algumas linhagens pertencentes ao grupo das bactérias lácticas possuem o *status* GRAS, ou seja, são reconhecidas pelo *Food and Drug Administration* (FDA) como Geralmente Reconhecidos como Seguros (*Generally Recognized As Safe - GRAS*) (SOCCOL *et al.*, 2013). Entretanto, outros microrganismos não pertencentes ao grupo das BL também possuem o *status* GRAS, como *Propionibacterium freudenreichii*, que é amplamente utilizada em produtos lácteos (COUSIN *et al.*, 2010; RABAH *et al.*, 2020).

1.3 Propionibacteria

As propionibacterias foram descritas no final do século 19 por E. von Freudenreich e S. Orla-Jensen, quando estudavam a fermentação do ácido propiônico no queijo Emmental. O gênero hoje conhecido por *Propionibacterium* é composto por Actinobactérias Gram-positivas, em formato de bastonetes pleomórficos, não esporulantes, sem motilidade e possuem alto teor de conteúdo G + C. As bactéria deste

gênero são anaeróbicas a aerotolerantes e geralmente catalase positivo (COUSIN *et al.*, 2011). A principal característica, que deu nome ao gênero, é a capacidade de produzir ácido propiônico através da via de fermentação envolve o ciclo Wood-Werkmann (WOOD *et al.*, 1981) (FIG. 2).

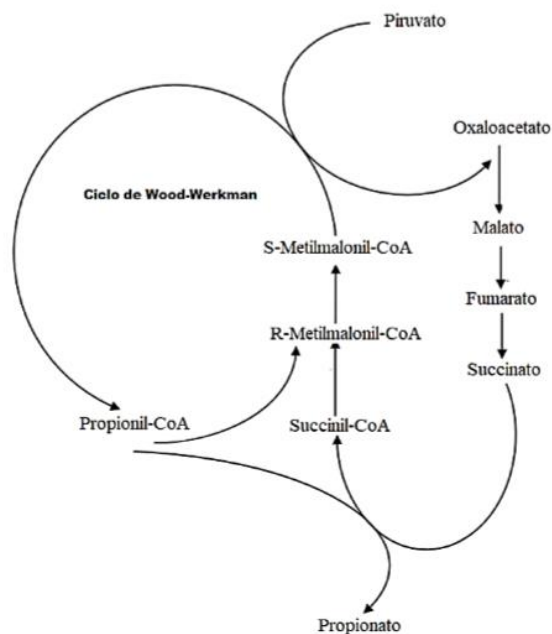


Figura 2 - Ciclo de Wood-Werkman utilizado pelas *Propionibacterium* spp. para produção de ácido propiônico (ASSIS, 2019).

As bactérias do gênero *Propionibacterium* podem ser classificadas como propionibactérias lácteas ou cutâneas, com base em seus *habitat* de origem. As propionibactérias lácteas são encontradas principalmente na pele, como *P. avidum*, *P. granulosum* e *P. acnes*, responsável por acnes cutâneas (BARNARD *et al.*, 2020). Já as propionibactérias cutâneas, como *P. freudenreichii* e *P. acidipropionici* são encontradas principalmente em queijos e produtos lácteos (RABAH; DO CARMO; JAN, 2017).

Propionibactérias lácteas são comumente usadas como culturas iniciais na indústria de laticínios. E a longa utilização de *P. freudenreichii* em queijos tipo Suíço, garantiu a esta linhagem o status GRAS de segurança. Devido a sua segurança e aplicabilidade em produtos lácteos, as propionibactérias lácteas tem chamado atenção como potenciais probióticos (FALENTIN *et al.*, 2010), apoiados em alguns estudos iniciais que demonstraram que a linhagem *P. freudenreichii* é capaz de produzir ácido 1,4-dihidroxi-2-naftóico (DHNA), um composto que estimula o crescimento de Bifidobactérias, sendo estas benéficas à saúde humana (FUKUMOTO *et al.*, 2014).

1.3.1 *Propionibacterium freudenreichii*

A linhagem *Propionibacterium freudenreichii* faz parte do grupo de propionibacterias lácticas e tem ganhado destaque como potencial probiótico, depois que estudos demonstraram características promissoras, como a produção de ácidos graxos de cadeia curta e ácido linoléico conjugado, além de produzir vitamina B12 em escala industrial (DEPTULA *et al.*, 2017; THIERRY *et al.*, 2011).

Propionibacterium freudenreichii demonstrou-se tolerante aos estresses ácidos e de sais biliares, além de boa adesão à células epiteliais, contribuindo para a persistência no hospedeiro, e propriedades imunomoduladoras (RABAH; DO CARMO; JAN, 2017). Além disso, em estudos recentes de Colliou e colaboradores (2017), foi identificada *P. freudenreichii* na microbiota de recém nascidos que consumiam leite materno, indicando a possível capacidade da mesma de colonizar o trato gastro-intestinal humano.

As propriedades imunomoduladoras da linhagem *P. freudenreichii* já foram eficientemente desmonstradas em modelos de doenças inflamatórias intestinais (DII) (FOLIGNE *et al.*, 2010; MA; YEOM; LIM, 2020; RABAH *et al.*, 2020) e em modelo de mucosite (DO CARMO *et al.*, 2020; CORDEIRO *et al.*, 2018). As propriedades probióticas de *P. freudenreichii* estão diretamente ligadas à presença de proteínas da camada superficial, as chamadas proteínas da camada S (*Surface Layer Proteins*), como demonstra o estudo de Do Carmo e colaboradores (2018), onde a mutação da proteína SlpB presente na superfície da linhagem probiótica *Propionibacterium freudenreichii* CIRM-BIA 129, foi capaz de alterar suas propriedades físico-químicas, capacidade de sobrevivência à estresses, proteoma da superfície e da célula inteira.

Ao todo foram identificadas cinco diferentes tipos de proteína de superfície de *P. freudenreichii*, através da extração com Cloreto de Guanidina, sendo estas as proteínas SlpA, SlpB, SlpE, Internalina A (Inl A) e LspA (*Large surface protein A*) (MARÉCHAL *et al.*, 2014). Entretanto, as diferentes linhagens de *P. freudenreichii* podem apresentar uma variação entre as a expressão destas proteínas, como por exemplo, as linhagens *P. freudenreichii* CIRM-BIA 118 e CIRM-BIA 508, apresentam uma camada de superfície composta por SlpA (FIG. 3), contudo, a proteína SlpB é a principal proteína de superfície em *P. freudenreichii* CIRM BIA 129 (DO CARMO *et al.*, 2018).

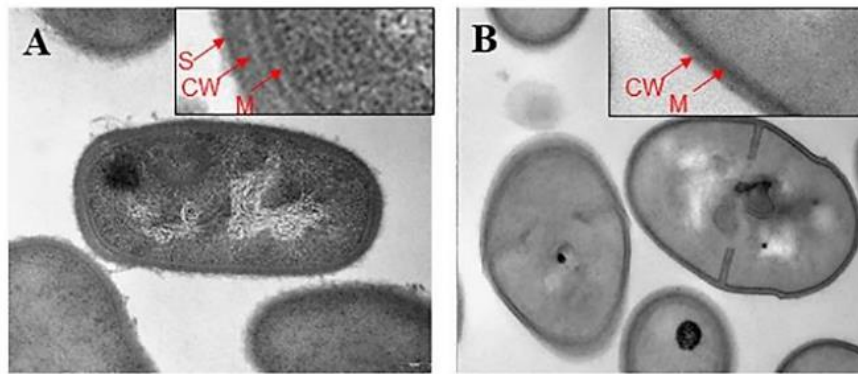


Figura 3 - *P. freudenreichii* CIRM-BIA 118 coberta por uma camada superficial mais externa (A) que é removida por extração usando Cloreto de Guanidina (B). As setas vermelhas indicam a membrana (M), a parede celular (CW) e a camada S (S). Adaptado de Le Maréchal *et al.* (2014).

1.4 Proteínas de superfície

As camadas S é formada por um conjunto de proteínas, conhecidas como proteínas da camada S (SLPs), que se auto-organizam para formar uma matriz na superfície da célula. Estas proteínas estão ligadas não covalentemente à superfície celular, em forma de arranjo paracristalino (COUSIN *et al.*, 2010). Esta rede de proteínas formando uma monocamada macromolecular externa foi identificada pela primeira vez em *Spirillum* sp. por Houwink em 1953 (HOUWINK, 1953).

A SLPs possuem um peso molecular que varia de 25 a 200 kDa e são tipicamente ricos em aminoácidos ácidos e hidrofóbicos exibindo um ponto isoelétrico geralmente baixo (pI) e já foram identificadas em Archeas, bactérias Gram-Positivas e bactérias Gram-Negativas (DO CARMO *et al.*, 2018). A camada S formada por elas pode exibir uma espessura de 5-25nm, são altamente porosas e pode ser organizada em diferentes simetrias: simetria oblíqua (p1, p2), tetragonal (p4) ou hexagonal (p3, p6) (FIG. 4) (KLINGL, 2014). A ancoragem não covalente das SLPs aos polímeros secundários da parede celular (SCWP) podem ocorrer de três maneiras: três domínios SLH (*S-layer homology domain*) podem dobrar em um pseudo-trímero e cooperar na ligação a SCWPs, como acontece na maioria das espécies de *Bacillus* e *Propionibacterium freudenreichii*; outro mecanismo de ancoragem conservado é mediado por três módulos de domínio de ligação da parede celular 2 (CWB2), encontrado em muitas espécies de *Clostridium*, e ligação a compostos da parede celular que ainda não estão totalmente elucidados; ou a ligação pode ocorrer através de CWBD conservado, que pode ser C-terminal (*L.*

acidophilus, *L. crispatus*) ou N-terminal (*L. brevis*), enquanto a parte oposta da proteína, mais variável, está envolvida na automontagem. (DO CARMO *et al.*, 2018).

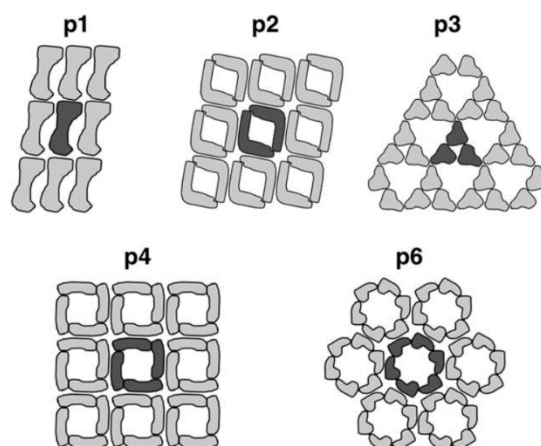


Figura 4 - Disposição das subunidades da camada S organizadas na simetria oblíqua (p1, p2), tetragonal (p4) ou hexagonal (p3, p6). Adaptado de KLINGL (2014).

As Slp's podem ser extraídas utilizando agentes caotrópicos, capazes de decompor o desdobramento de proteínas e transformando-as em suas cadeias polipeptídicas originais, como Cloreto de Guanidina e Cloreto de Lítio (KOVAL; MURRAY, 1984). Esses agentes também podem extrair outras proteínas, tanto associadas à estrutura da camada S, quanto ancoradas à parede celular por meio de domínios de interação não covalentes. Essas proteínas incluem CWBDs ou domínios SLH (DO CARMO *et al.*, 2018)

Estas proteínas estão envolvidas em funções cruciais nas bactérias, como manutenção da forma celular, atividades enzimáticas, contribuição para a adesão, coagregação, fatores de virulência, transporte de moléculas, mascaramento de receptores para fagos, e até mesmo na proteção contra tensões ambientais e imunomodulação de células imunes intestinais (RABAH; DO CARMO; JAN, 2017; HYNÖNEN; PALVA, 2013)

1.4.1 *Propionibacterium freudenreichii* 129 Surface layer protein B (SlpB)

A proteína B de camada S (SlpB) (FIG. 5), é uma proteína de 56 kDa, que apresenta três domínios SLH (*S-layer homology*) em seu domínio C-terminal e como dito anteriormente é a principal proteína de superfície extraível da linhagem probiótica *P. freudenreichii* 129 (MARÉCHAL *et al.*, 2014). Sua presença também já foi detectada

em outras linhagens de *P. freudenreichii* (CIRM 118 e 122) e em linhagens do gênero *Lactobacillus* ssp. como, *L. brevis* ATCC14869, *L. acidophilus* e *L. buchneri* CD034 (WAKAI *ET AL.*, 2021; DEUTSCH *ET AL.*, 2017; ANZENGRUBER *ET AL.*, 2014; JAKAVA-VILJANEN *et al.*, 2002).

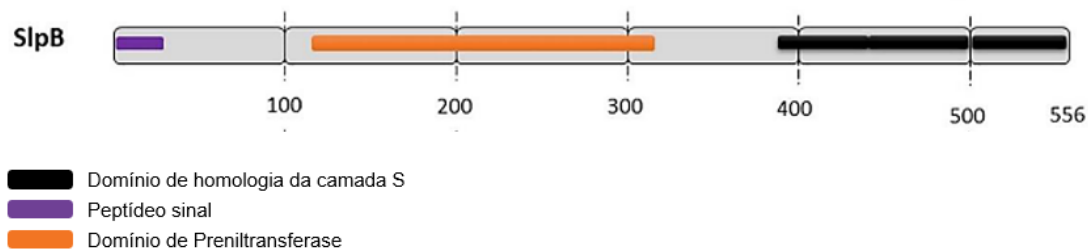


Figura 5 - Domínios funcionais previstos na proteína de superfície SlpB de *P. freudenreichii*. A proteína B de camada S (SlpB) exibe três domínios SLH conservados no terminal C, permitindo a interação com parede celular de peptidoglicano. Figura adaptada de DO CARMO *et al* (2018).

Embora sua presença seja identificada em várias linhagens, como as citadas anteriormente, as propriedades da proteína SlpB começaram a ser exploradas há pouco tempo. Primeiramente, DEUTSCH e colaboradores (2017) demonstraram que as proteínas SlpB e SlpE de *P. freudenreichii* 129 contribuem para a propriedade anti-inflamatória da linhagem, demonstrando através da inativação deste genes em *P. freudenreichii* CIRM 129, leva há uma diminuição dos níveis da citocina IL-10. Posteriormente, também através da inativação do gene *slpB* de *P. freudenreichii* 129, Do Carmo e colaboradores conduziram uma série de estudos e demonstraram que: a linhagem probiótica tem sua capacidade de adesão a células HT-29 comprometida com a ausência da proteína SlpB; a ausência da proteína impacta não apenas a superfície, mas em toda a proteômica da célula, além de alterar também a capacidade de sobrevivência à ambientes hostis e característica físico-químicas; e em modelo murino de mucosite confirmou-se o papel fundamental do SlpB frente ao potencial probiótico de *P. freudenreichii* (CARMO *et al.*, 2017, 2018, 2020).

1.5 *Lactococcus lactis*

As bactérias lácticas (BL) compõe um grande grupo de bactérias microaerófilos, não esporulantes e não móveis e capazes de converterem açúcares (hexoses) em ácido láctico (CAVANAGH *et al*, 2015; MOKOENA, 2017). São amplamente implementadas

na fermentação de vários produtos alimentícios, principalmente queijos e iogurtes (DONOHUE *et al.*, 2012); e incluem uma grande variedade de espécies probióticas como *Lactobacillus brevis*, *L. bulgaricus*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. casei*, *L. helveticus*, *L. salivarius*, *L. reuteri*, *L. johnsonii*, *L. fermentum*, e *L. acidophilus* (ZIELINSKA; SIONEK; KOLOHYN-KRAJEWSKA, 2018).

O grupo de bactérias lácticas são amplamente conhecido entre os probióticos pois contribuem com a homeostase da microbiota, através do lactato, ácido acético, peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono e bacteriocinas produzidos a partir de sua fermentação. Além disso, as BL possuem pH ótimo de crescimento entre 3,5 e 6,5, apresentando uma boa capacidade de sobrevivência ao pH ácido do estômago, o que confere a elas uma vantajosa característica para sobreviver ao longo do trato gastrointestinal (BARLA *et al.*, 2016)

As bactérias da espécie *Lactococcus lactis* compõe um grupo de grande importância, pois são as mais bem caracterizadas dentre as BL. Estes microrganismos possuem *status* “GRAS”, são de fácil manipulação e como foi a primeira BL a ter seu genoma sequenciado, hoje possui grande número de ferramentas genéticas compatíveis com sucesso, como sistemas de clonagem e expressão com opções personalizáveis, tornaram-se um modelo desejável (SONG *et al.*, 2017; PONTES *et al.*, 2011; LOIR *et al.*, 2005).

L. lactis foi originalmente descrita em 1919 por Orla and Jensen e apesar da associação comum da espécie com laticínios, a bactéria foi originalmente isolada de plantas (CARR *et al.*, 2017). Possuem o formato de cocos e são divididos em duas subespécies *L. lactis* subsp. *lactis* e *L. lactis* subsp. *cremoris* (SCHLEIFER *et al.*, 1985). *L. lactis* subsp. *lactis* NCDO 2118, a linhagem de interesse utilizada neste estudo, foi isolada de ervilhas congeladas, é produtora de ácido gama-aminobutírico (GABA) e, recentemente, suas propriedades probióticas vem sendo exploradas (OLIVEIRA *et al.*, 2017; MAZZOLI *et al.*, 2010).

LUERCE e colaboradores (2014) demonstraram que *L. lactis* NCDO 2118 possui atividade anti-inflamatória em uma cultura *in vitro* de células epiteliais intestinais (IECs) e em modelo de colite crônica induzida por DSS. Contudo, a linhagem vem sendo intensamente utilizada para a produção de proteínas heterólogas (PECINI *et al.*, 2020; CARVALHO *et al.*, 2017).

1.5.1 Utilização para expressão de proteínas

Cada vez mais espécies como *L. lactis* estão sendo modificadas através de engenharia genética, utilizando ferramentas para clonagem, afim de expressar proteínas heterólogas de interesse, especialmente proteínas com propriedades anti-inflamatórias (CARVALHO *et al.*, 2017).

A espécie *L. lactis* dentre as outras tem chamado atenção e despertado grande interesse biotecnológico, pois não produzem endotoxinas, LPS ou qualquer outro produto metabólico tóxico (LEBLANC *et al.*, 2015) e apresentam poucas proteínas secretadas, sendo que apenas a proteína Usp45 (Unknown Secreted Protein of 45kDa) é secretada em quantidades suficientes para ser detectada em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (MIYOSHI *et al.*, 2004; VAN ASSELDONK *et al.*, 1990).

Para obter elevados níveis de expressão e de endereçamento celular em diferentes localizações celulares são utilizados plasmídeos que possui uma constituição básica (FIG. 6): (i) origem de replicação, (ii) marcador de seleção (gene de resistência a antibiótico), (iii) sítio de clonagem múltipla e (iv) um promotor de expressão funcional em procariotos (LE LOIR, 2001).

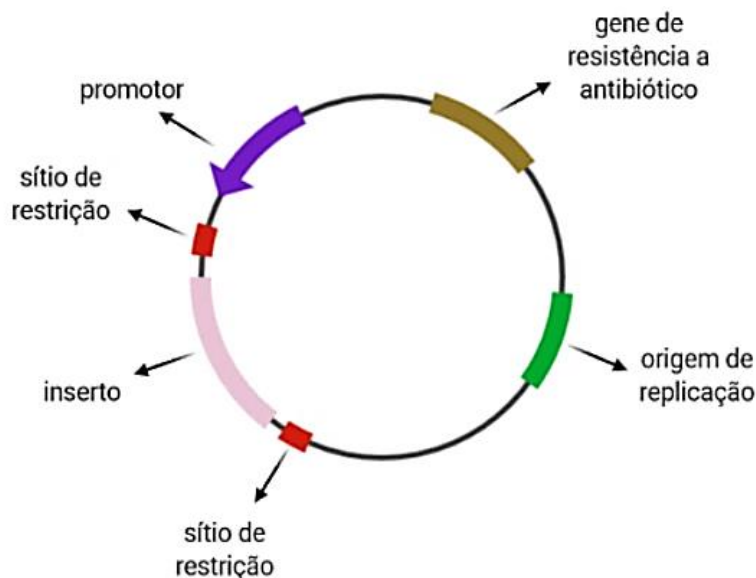


Figura 6 - Modelo de vetor de expressão. Constituição básica de um plasmídeo para a expressão de determinado gene.

O sistema de expressão mais bem caracterizado e o mais utilizado em *L. lactis* é o sistema NICE (*Nisin Controlled Expression System*) induzido pela bacteriocina nisina (MOHSENI *et al.*, 2017). A nisina é um peptídeo antibacteriano produzido naturalmente por algumas linhagens de *L. lactis* e utilizado como conservante de alimentos

(GHARSALLAOUI *et al.*, 2016). O sistema NICE utiliza o promotor PnisA e dos genes regulatórios nisRK (DE RUIYTER *et al.*, 1996) e devido às suas poderosas características de indução, este sistema pode ser transferido com sucesso para outras bactérias Gram-positivas, permitindo o estabelecimento da expressão gênica regulada onde não existia até então (WANG; ZENG, 2014).

Entretanto, cada bactéria apresenta diferentes variações na sensibilidade à nisina, o que demonstrou a necessidade de desenvolvimento de novos sistemas de expressão, independentes da nisina (TAVARES *et al.*, 2020). Sendo assim, vários sistemas de expressão e de endereçamento celular de proteínas heterólogas em bacterias lácticas foram desenvolvidos, como o sistema de expressão controlada induzível por estresse (SICE), com base no uso do promotor do operon groESL da proteína de choque térmico (pGroESL) de *L. lactis* (BENBOUZIANE *et al.*, 2013); o sistema de expressão heteróloga dirigida por PZ_nzitR (Lull; Poquet, 2004), baseado no promotor PZn e no repressor ZitR do operon zit *L. lactis* (zitRSQP), que está envolvido na regulação do zinco; Zirex, é outro sistema de expressão indutível por zinco, é baseado na proteína reguladora SczA e no promotor P_{czcD} de *Streptococcus pneumoniae* D39 (Mu *et al.*, 2013); ACE - Sistema de Expressão Controlada de Agmatina, baseado na expressão do operon AGDI de *L. lactis* subsp. cremoris CECT 8666 (Linares *et al.*, 2015). E finalmente o XIES, sistema de expressão induzido por xilose, este sistema foi escolhido para ser utilizado neste trabalho e possui boas características para se trabalhar pois é totalmente seguro, de fácil manipulação e menos dispendioso (LE LOIR *et al.*, 2001; MIYOSHI *et al.*, 2004a).

1.5.2 XIES

O sistema de expressão e de endereçamento proteico XIES (*Xylose-Inducible Expression System*) foi desenvolvido por Miyoshi e colaboradores (2004) (FIG. 7), com a intenção de se obter um sistema de produção controlada para direcionar proteínas heterólogas ao citoplasma ou meio extracelular para *L. lactis* NCDO2118. Este sistema utiliza o promotor PxyIT que é altamente indutível por xilose e é fortemente reprimido na presença de açúcares transportados por PTS (*phosphotransferase system*), como glicose, frutose e manose. O promotor PxyIT é combinado com o sítio de ligação ao ribossomo (RBS), o gene da nuclease de *Staphylococcus aureus* (*NUC*) como repórter, e o peptídeo sinal (SP) da proteína secretada de *Lactococcus*, Usp45, apenas para o sistema secretor. Desta foram formados dois sistemas de expressão, um para expressão citoplasmática, o

vetor pXYCYT:nuc, e outro sistema contendo o peptídio sinal para obter a proteína secretada para o meio extracelular, o vetor pXYSEC:nuc (MIYOSHI *et al.*, 2004a).

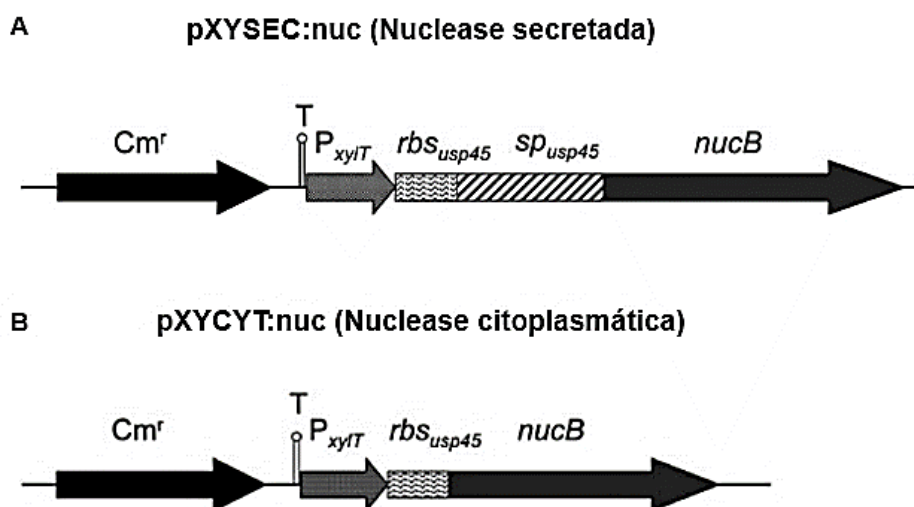


Figura 7 - Representação esquemática do vetor de expressão induzível por xilose para a produção (a) extracelular de Nuc e (b) intracelular de Nuc. P_{xyIT}: promotor indutível por xilose; RBS_{usp45}: sítio de ligação ao ribossomo de usp45; nucB: sequência de codificação nucB de *S. aureus*; Cm^r: resistência ao cloranfenicol; T: terminador transcricional do gene xylX (fora da escala). Adaptado de MIYOSHI *et al.* (2004b).

Desta forma, o sistema XIES, na presença de xilose, demonstrou-se tão eficiente quanto o sistema NICE com elevados níveis de produção da proteína Nuc, além de ser facilmente manipulável, pois permite “ligar ou desligar” a expressão do gene de interesse pela simples adição de xilose ou glicose, respectivamente (LEITE, 2014).

Desde seu desenvolvimento o XIES já foi utilizado para produção enterotoxina B atenuada de estafilococos, para posteriormente ser utilizada como vacina (ASENSI *et al.*, 2013), produção da proteína Hsp65 (PECINI *et al.*, 2020), da interleucina 10 (DEL CARMEN *et al.*, 2012) e da enzima 15 Lipoxigenase-1 (CARVALHO *et al.*, 2016). O XIES chegou também a ser utilizado por HOLLMANN e colaboradores (2012) para expressar a proteína de superfície SlpA de *Lactobacillus brevis* demonstrando a versatilidade e eficácia do sistema.

A linhagem probiótica, *L. lactis* NCDO2118, selecionada para este trabalho, apresentou bons resultados no modelo de colite, sendo capaz de atenuar a inflamação, diminuindo a pontuação dos *scores* histológico e macroscópicos, além de aumentar a secreção da citocina IL-10 e diminuir a secreção de TNF (LUERCE *et al.*, 2014). Devido a capacidade de expressar proteínas recombinantes, *L. lactis* geneticamente modificadas estão sendo utilizadas para aprimorar os efeitos probióticos da linhagem no tratamento da

colite. Foram testadas no modelo murino de colite linhagens recombinantes de *L. lactis* expressando enzimas antioxidantes, como a catalase (ROCHAT *et al.*, 2007), enzima 15 Lipoxigenase-1(15-LOX-1) (CARVALHO *et al.*, 2016), citocinas IL-10 (DEL CARMEN *et al.*, 2012) e IL-27 (HANSON *et al.*, 2014), nanocorpos neutralizantes de TNF utilizados como proteínas terapêuticas (VANDENBROUCKE *et al.*, 2010), foram secretados também por *L. lactis*, fatores trevo (TFF - *Trefoil Factor Family*), um produto de células produtoras de mucina (CALUWAERTS *et al.*, 2010), inibidor da protease do leucócito secretor (BERMUDEZ-HUMARAN *et al.*, 2015) e também a proteína Hsp65 (GOMES-SANTOS *et al.*, 2017), e em todos estes casos foram demonstrados sinais de atenuação dos efeitos da colite. Finalmente, a combinação do modelo de colite, com a expressão em *L. lactis* demonstrou no estudo CAI *et al.*, 2018 um eficaz mecanismo para estudo das propriedades na proteína SlpA no contexto inflamatório.

Desta forma, com tantos indícios apontando *L. lactis* como um bom modelo para expressão de proteínas heterólogas, já bem caracterizada em modelo murino de colite, esta se torna um bom veículo para clonagem e expressão da proteína SlpB, para que possam ser avaliados os efeitos desta proteína fora de seu organismo de origem e indenficidadas suas principais características.

2. JUSTIFICATIVA

Os probióticos vem sendo hoje aplicados como um tratamento alternativo e/ou adjuvante em diversos cenários. A influência benéfica dos probióticos sobre a microbiota intestinal humana inclui fatores como efeitos antagônicos, competição e efeitos imunológicos (MARTA; SAAD, 2006). Além disso, as funções de proteção estão conectadas com o efeito de barreira e proteção contra patógenos (REZAC *et al.*, 2018).

Nesse contexto, a linhagem *P. freudenreichii* CIRM-BIA 129 (*Pf* 129) vem apresentando um grande potencial probiótico nas doenças inflamatórias intestinais (RABAH; DO CARMO; JAN, 2017). Estudos apontam que a atividade imunomoduladora, confirmado *in vitro* e *in vivo*, através da capacidade da linhagem de reduzir danos da colite induzida quimicamente em camundongos, está correlacionada a grande quantidade da proteína de superfície SlpB expressa em sua parede celular (DO CARMO *et al.*, 2020).

Nos últimos anos, estudos realizados com a linhagem *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO2118 também aprontaram características probióticas e uma grande importância biotecnológica (OLIVEIRA *et al.*, 2017). Esta linhagem vem sendo fundamentalmente utilizada para a expressão de proteínas heterólogas, principalmente devido à pequena quantidade de proteínas secretadas pela linhagem (sendo conhecida apenas a proteína Usp45 - *Unknown Secreted Protein of 45kDa* - detectável por Coomassie blue) (NOUAILLE *et al.*, 2003). Por essa razão, hoje existem várias ferramentas bem definidas para produção intra ou extracelular de proteínas otimizadas para *L. lactis* (LE LOIR *et al.*, 2005). Uma dessas ferramentas é o sistema de expressão endereçamento proteico XIES (*Xylose-Inducible Expression System*), desenvolvido por Miyoshi e colaboradores (2004). O sistema XIES utiliza o protomor PxyIT, do sítio de ligação do ribossomo (RBS) e a sequência codificadora do peptídeo sinal (SP) da proteína Usp45. Desta forma, esse sistema consegue ser facilmente manipulado, permitindo ativar a expressão gênica apenas com a adição de xilose e consegue endereçar corretamente o produto final para o citoplasma ou para o meio extracelular (MIYOSHI *et al.*, 2004).

Portanto, com a perspectiva de compreender as propriedades da proteína de superfície B (SlpB) e seu papel na modulação de inflamações intestinais induzidas por substâncias química, este trabalho propõe o uso da linhagem *L. lactis* NCDO2118 produzindo a proteínas recombinante SlpB, para avaliar seus efeitos em ensaios *in vitro* e *in vivo* em modelo murino de colite ulcerativa.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Clonagem e expressão da proteína de superfície SlpB da linhagem *Propionibacterium freudenreichii* CIRM-BIA 129 em *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO2118 e a avaliação de suas propriedades *in vitro* e *in vivo* no modelo murino de colite ulcerativa.

3.2 Objetivos específicos

- Clonar o gene *slpB* no vetor pXYSEC;
- Avaliar a produção proteína de superfície SlpB em *L. lactis* subsp. *lactis* NCDO2118;
- Avaliar a capacidade de sobrevivência da linhagem recombinante *L. lactis* NCDO2118 pXYSEC:*slpB* sob condições de estresse encontradas no Trato Gastrointestinal (estresse ácido e sais biliares);
- Verificar a mobilidade eletroforética de *L. lactis* NCDO2118 pXYSEC:*slpB* através da avaliação do potencial zeta;
- Comparar a afinidade de *L. lactis* NCDO2118 pXYSEC:*slpB* a diferentes hidrocarbonetos, através do ensaio de Adesão Microbiana a Hidrocarbonetos (MATH);
- Averiguar a capacidade de auto-agregação de *L. lactis* NCDO2118 pXYSEC:*slpB*;
- Investigar os efeitos da linhagem recombinante *L. lactis* NCDO2118 pXYSEC:*slpB* em um modelo murino de colite induzida por DSS.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Estratégia Experimental de clonagem

Fluxograma da metodologia

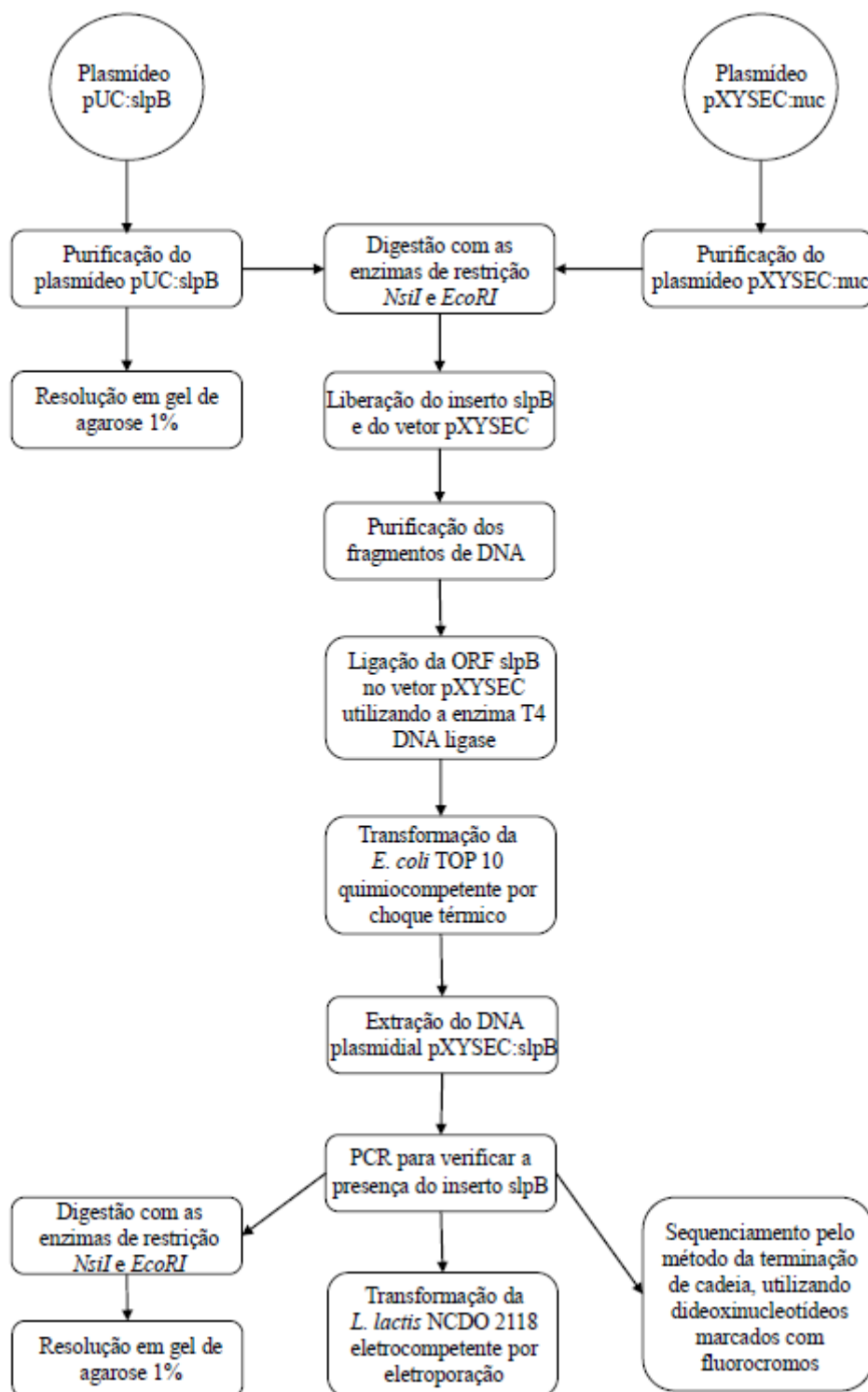


Figura 8 - Fluxograma da metodologia utilizada para clonagem do inserto *slpB* no vetor pXYSEC.

4.2 Linhagens bacterianas, plasmídeos, condições de cultivo e estocagem

As linhagens bacterianas e os plasmídeos usados no presente trabalho estão listadas e representadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Linhagens bacterianas e plasmídeos utilizados neste trabalho.

Linhagem	Características	Fonte
<i>Escherichia coli</i> TOP 10	(hsdR; mcrA; lacZΔM15; endA1; recA1)	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i> pUC: <i>slpB</i>	<i>E. coli</i> TOP 10 portando o plasmídeo pUC: <i>slpB</i> , Amp ^R	Esse estudo
<i>Escherichia coli</i> TOP 10 PXYSEC: <i>slpB</i>	<i>E. coli</i> TOP 10 portando o plasmídeo pXYSEC: <i>slpB</i> , Cm ^R	Esse estudo
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO2118	<i>L. lactis</i> tipo selvagem (wt) <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	LGCM
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO2118 PXYSEC: <i>nuc</i>	<i>L. lactis</i> NCDO2118 portando o plasmídeo pXYSEC: <i>nuc</i> , Cm ^R	MIYOSHI <i>et al.</i> , 2004
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NCDO2118 PXYSEC: <i>slpB</i>	<i>L. lactis</i> NCDO2118 portando o plasmídeo pXYSEC: <i>slpB</i> , Cm ^R	Esse estudo
Plasmídeo	Características	Fonte
PXYSEC: <i>nuc</i>	pWV01/Cm ^R ; vetor de expressão contendo a fusão <i>rbs</i> _{Usp45} :: <i>spUsp45</i> :: <i>nucB</i> , sob o controle de P _{xyIT}	MIYOSHI <i>et al.</i> , 2004
PXYSEC: <i>slpB</i>	PXYSEC portando a ORF <i>slpB</i> /Cm ^R	Esse estudo
pUC: <i>slpB</i>	ori ColE1/Amp ^R	Esse estudo

Linhagens de *E. coli* e *L. lactis* pertencentes ao Laboratório de Genética Celular e Molecular (LGCM), da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)

Amp^R: gene que confere resistência à ampicilina

Cm^R: gene que confere resistência à cloranfenicol

ori ColE1: origem de replicação.

As linhagens de *E. coli* foram cultivadas em meio Luria-Bertani (LB) sob agitação, à 37°C, por 16 horas (*overnight*). E, no caso das bactérias recombinantes, quando necessário, foi adicionado 10 µg/mL de cloranfenicol (Cm) ou 100 µg/mL de ampicilina (Amp). Para culturas em meio sólido, 1,5% de ágar bacteriológico foi adicionado ao meio LB. Para estocagem, as linhagens de *E. coli* foram cultivadas e diluídas em uma solução estéril de glicerol 25% (concentração final). As amostras foram acondicionadas em um ultrafreezer à -80°C.

Já as linhagens de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO2118 foram cultivadas à 30°C, por 24 horas em meio M17 suplementado com glicose (0,5%) ou xilose (1%), e quando necessário, 10 µg/mL de Cm ou 100 µg/mL Amp. Para culturas em meio sólido,

1,5% de ágar bacteriológico foi adicionado ao meio M17. Para fins de estocagem, as linhagens de *L. lactis* NCDO2118 foram cultivadas em meio líquido e diluídas uma solução estéril de glicerol 15% (concentração final). As amostras foram acondicionadas em um *ultrafreezer* à -80°C.

4.3 Manipulação do DNA

Todos os procedimentos de biologia molecular empregados na manipulação dos DNAs plasmídicos foram realizados de acordo com métodos pré-estabelecidos (Sambrook et al., 1989) com algumas modificações (especificadas quando necessário) e/ou segundo a recomendação dos fabricantes. A qualidade do material obtido, incluindo sua concentração e pureza, foi estimada através da resolução eletroforética em gel de agarose à 1% e também por leitura em espectrofotômetro NanoDrop® 1000 v3.5.2 (Thermo Fisher Scientific) nos comprimentos de onda de 260 e 280nm. As enzimas de modificação e restrição, quando utilizadas, seguiram as recomendações dos fabricantes e as sequências nucleotídicas dos insertos foram confirmadas através de sequenciamento (Sanger et al., 1977).

4.4 Desenho e otimização de códons da sequência do gene *slpB* de *Propionibacterium freudenreichii* CIRM-BIA 129

A sequência nucleotídica codificadora da proteína superfície SlpB foi obtida do banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), depositada sob o número de acesso CDP48273.1 (CDS 5503..7173). À sequência foram incluídos dois sítios de restrição, um na posição 5' para a enzima *NsiI* e outro na posição 3' para a enzima *EcoRI*, para auxiliar nos processos de clonagem. A sequência foi otimizada para a expressão em bactérias *Lactococcus lactis* NCDO2118 no programa OptimumGene™ (GenScript Corporation) e sintetizada pela empresa GenScript Corporation (Piscataway, NJ, EUA) e clonada no vetor de pUC57 (FIG. 8).

4.5 Purificação dos plasmídeos pUC:*slpB* e pXYSEC:*nuc*

Para a obtenção do plasmídeo de interesse pUC:*slpB*, foi realizado a expansão clonal das colônias de bactérias TOP10 transformadas com o plasmídeo recombinante

pUC:*slpB* em 5 mL de meio LB líquido contendo ampicilina (100 µg/ml). Já para obtenção do plasmídeo com o vetor de expressão de interesse, as bactérias *L. lactis* NCDO2118 pXYSEC:*nuc* (MIYOSHI *et al.*, 2004) (FIG. 10) foram expandidas em 5mL de meio M17 suplementado com 0,5% de glicose e CM (10µg/mL), ambas sob as condições de cultivo descritas no item 4.1. A extração do DNA plasmidial foi realizada usando kit MiniPrep Plasmid (Qiagen, EUA) ou o kit QIAfilter Plasmid Midi Kit (Qiagen, EUA), para quantidades maiores de DNA, seguindo as recomendações do fabricante.

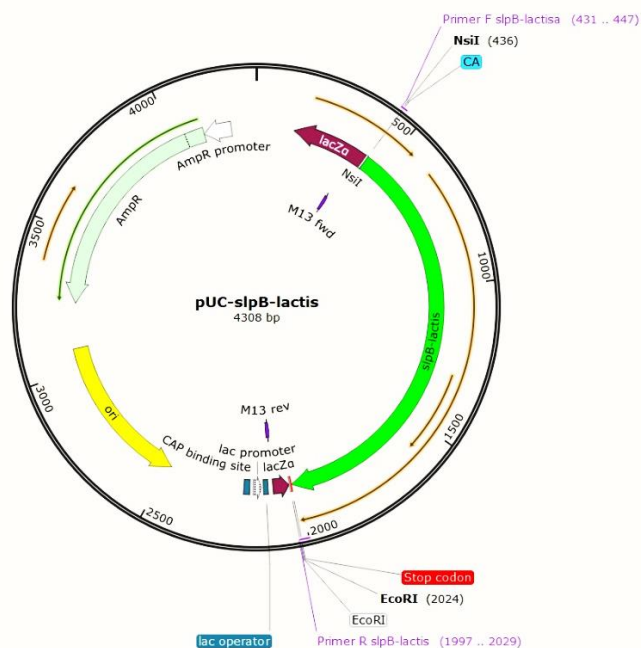


Figura 9 - Representação esquemática do vetor pUC57 contendo o inserto *slpB*.

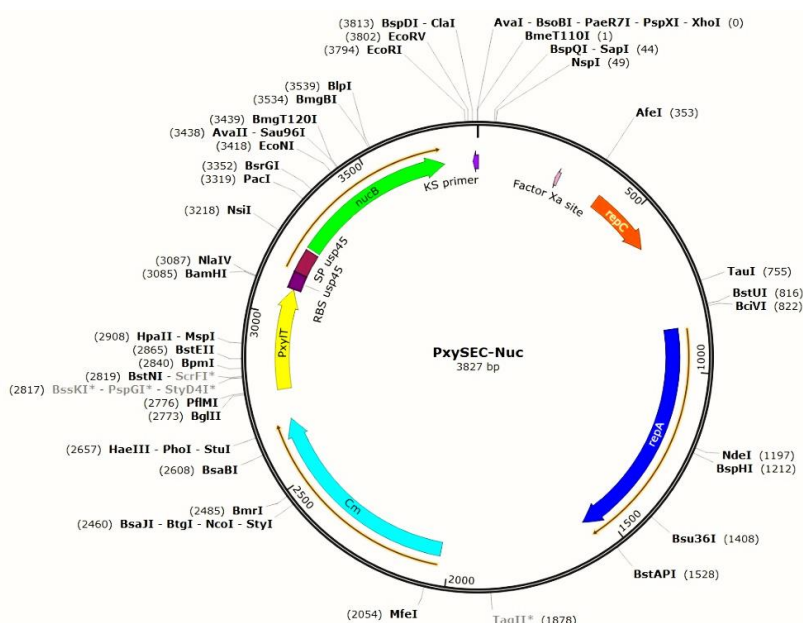


Figura 10 - Representação esquemática do vetor pXYSEC portando a sequência codificadora da proteína nucleases.

4.6 Resolução Eletroforética

Todas as amostras de DNA foram resolvidas em gel de agarose, da seguinte maneira: ao DNA foi adicionado tampão de amostra 5X e o mesmo foi resolvido em gel de agarose à 1% em tampão TBE 0,5X, contendo 3,5% de brometo de etídio (0,5 µg/mL). As resoluções eletroforéticas foram realizadas a 100 Volts durante aproximadamente 1 hora. O DNA foi visualizado em fotodocumentador MultiDoc-It Digital Imaging System (UVP), onde o gel foi fotografado sobre um transluminador de luz ultravioleta a 320 nm, através do sistema de documentação fotográfica Doc-It® LS Image Acquisition Software (UVP). O tamanho dos fragmentos foi estimado comparando-se ao marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

4.7 Digestão enzimática dos plasmídeos pUC:*slpB* e pXYSEC:*nuc*

Para a clonagem da ORF (*open reading frame*) *slpB* no vetor de expressão pXYSEC, os plasmídeos pUC:*slpB* e pXYSEC:*nuc* foram extraídos e submetidos a uma reação de digestão enzimática, com as enzimas de restrição *NsiI* e *EcoRI*. Para realizar a reação, primeiramente foram utilizados 10 µL do plasmídeo (100 ng/µL), 1,5 µL do tampão One For All (GE Healthcare), 1 µL de *EcoRI* (10 U/µL) por 1 hora à 37°C e, em seguida, uma segunda reação enzimática foi feita com 1 µL da enzima *NsiI* (10 U/µL) usando o produto da reação anterior. Esta reação foi mantida à 37°C *overnight*. Para verificar a qualidade da digestão, 3 µL de cada reação foram depositados e resolvidos em gel de agarose à 1%.

4.8 Purificação dos fragmentos de DNA correspondentes ao gene *slpB* e ao vetor de expressão pXYSEC desprovido da ORF *nuc*

Para purificação dos fragmentos de DNA correspondentes ao vetor pXYSEC (3251 pb), desprovidos da sequência codificadora da proteína nuclease (*nuc*, 584 pb), e da ORF *slpB* (1588 pb), o volume total das reações de digestão foram depositados e resolvidos em gel de agarose à 1%, em seguida foi utilizando o Kit illustra™ GFX™ PCR DNA e Gel Band Purification (GE), de acordo com as especificações do fabricante. A concentração e a pureza dos produtos purificados foram estimadas através de resolução eletroforética em gel de agarose à 1% e também em espectrofotômetro.

4.9 Ligação da ORF *slpB* no vetor pXYSEC

Os produtos da digestão enzimática correspondentes ao inserto *slpB* e ao vetor pXYSEC foram purificados e submetidos a uma reação de ligação com auxílio da enzima T4 ligase de acordo com o seguinte protocolo: 5 μL do inserto *slpB* purificado (10 ng/ μL); 3 μL de pXYSEC purificado (30 ng/ μL), o que resultou em uma proporção equimolar (3:1) de inserto/vetor; 1 μL de Ligase Buffer 10X (Promega); 1 μL da enzima T4 DNA ligase (Promega). A reação foi mantida à temperatura de 16°C durante 18 horas. Após este período, a ligação foi dialisada utilizando-se membrana Millipore (filtro de 0,025 μm), durante 30 minutos em água destilada.

4. 10 Preparo de células competentes

A linhagem de *Escherichia coli* TOP10 para transformação do plasmídeo pXYSEC:slpB foi preparada para a quimiocompetência como descrito a seguir: As bactérias foram plaqueadas em meio ágar Luria-Bertani (LB: 1% triptona, 0,5% extrato de levedura, 1% NaCl, 1,5% ágar, pH 7,0) e mantidas a 37°C por 16 horas. Uma colônia isolada desta placa foi selecionada, transferida para um tubo cônico de 50mL, expandida em 5 mL de meio líquido LB e incubada a 37°C sob agitação a 200 rpm em incubadora de bancada ES-20 Shaker-incubator Environmental (Grant) por 16 horas.

Após incubação, todo o conteúdo (5mL) do caldo foi inoculado em 50 mL de meio LB líquido em Erlenmeyer estéril e novamente incubado a 37°C, sob agitação, até a densidade óptica entre 0,5 e 0,6 a 600 nm (DO_{600}). Ao atingir a DO, o conteúdo foi transferido para um tubo cônico de 50 mL, estéril, previamente imerso em gelo, e centrifugado (4.000g a 4°C por 15 min). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado foi ressuspensionado gentilmente em 10 mL de solução R1 (KCl 100 mM, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 50 mM, KAc 30 mM, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10 mM, Glicerol 15%(v/v)). Após um repouso de 15 minutos, a suspensão de células foi novamente centrifugada (4000g a 4°C por 12 min). Descartou-se o sobrenadante, e o *pellet* foi gentilmente ressuspensionado em 2 mL de solução R2 (KCl 10 mM, Na-MOPS 10 mM, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 75 mM, Glicerol 15%(v/v)). A suspensão de células competentes foi fracionada em alíquotas de 200 μL e armazenadas a -80°C na presença de glicerol.

4.11 Transformação por choque térmico de células quimiocompetentes

A linhagem de *Escherichia coli* TOP10 nesse trabalho foi transformada pela metodologia de transformação bacteriana por choque térmico. As células competentes foram descongeladas e mantidas em gelo por 15 minutos. A essas células foram adicionados 10 µL dos plasmídeos (recombinados ou não), e a mistura foi mantida em repouso por 30 minutos no gelo. Em seguida, as células foram levadas no banho-maria a 42°C por 1 minuto e novamente colocadas no gelo por 2 a 3 minutos. Foram adicionados 250 µL do meio de cultura SOC (2% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de MgCl₂, 10 mM MgSO₄ e 20 mM de glicose) e feita uma incubação no equipamento ES-20 Shaker-incubator Environmental (Grant) a 37°C por 1 hora, sob agitação (250 rpm). Todo o conteúdo foi plaqueado em meio de cultura LB ágar contendo o antibiótico adequado e específico para a seleção, e acondicionados em estufa a 37°C por 16 horas. Em seguida, colônias resistentes foram isoladas e foi realizado a expansão clonal das colônias de bactérias em 5 mL de meio LB líquido contendo cloranfenicol (10 µg/ml) ou ampicilina (100 µg/ml) à 37°C sob agitação a 200 rpm por 16 horas para posteriormente realizar a extração de DNA plasmidial.

4.12 Reação em cadeia da Polimerase (PCR)

Os clones obtidos que tiveram seu DNA plasmidial extraído, foram submetidos ao ensaio de PCR para verificar a presença do inserto SlpB. Para as reações de amplificação da sequência nucleotídica correspondente à proteína de interesse SlpB foram utilizados *primers* da tabela 3.

Tabela 3 - Primers utilizados para amplificação do gene da proteína recombinante SlpB.

Primer	Sequência (‘5 – ‘3)	Tamanho do Fragmento
F-slpB	CCATGCATCAGATACTGCTCCAGCTCCAAAA	1632 pb
R-slpB	CCGAATTCTCATGAAGCATGTTTCATACGAT	

A amplificação foi realizada pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Para reação foram adicionados os seguintes componentes: tampão da polimerase (Ludwig Biotec, Brasil), 1,5 mM de MgCl₂ (Ludwig Biotec, Brasil), 1,0 µL de mix de dNTP (Ludwig Biotec, Brasil), 1µL de *primer forward* (10pmol/µL), 1µL de *primer reverse*

(10pmoL/ μ L), 2,5 U da enzima Taq polimerase (Ludwig Biotec, Brasil), quantidade aproximada de 100 ng de material genético a ser amplificado e água ultrapura estéril suficiente para completar o volume para 25 μ L.

Os fragmentos de DNA foram amplificados por PCR pela ação da enzima Taq polimerase, após a padronização das condições de reação, no termociclador T100™ Thermal Cycler (BIO-RAD, EUA). Após uma etapa de desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, realizou-se 35 ciclos de amplificação: desnaturação de 95°C por 45 segundos, anelamento de 65°C por 40 segundos e extensão de 72°C por 45 segundos. Uma última etapa de extensão foi realizada na temperatura de 72°C por 10 minutos para o término da extensão e manteve-se a reação a 4°C até o uso.

4.13 Sequenciamento nucleotídico da região codificadora da proteína de interesse

O vetor de expressão recombinante (pXYSEC:*slpB*) foi sequenciado pelo método da terminação de cadeia, utilizando dideoxinucleotídeos marcados com fluorocromos (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing, Applied Biosystems, EUA). Para o sequenciamento foi utilizado o par de *primers* mostrados na Tabela 4. As reações de amplificação ocorreram de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante e o sequenciamento foi realizado em sequenciador automático 3500 Genetic Analyzer® 8-capillary (Applied Biosystems, EUA). A sequência obtida foi analisada com o auxílio do programa Bioedit Sequence Alignment Editor vs7.2.5 (Hall, 2013) e da ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, NCBI).

Tabela 4 - *Primers* utilizados para sequenciamento do gene da proteína recombinante SlpB no plasmídeo pXYSEC:slpB.

Primer	Sequência (‘5 – ‘3)	Tamanho do Fragmento
Seq F-slpB	GATCCCCCGTCTGAACGAACTT	1816 pb
Seq R-slpB	CGACATCATTGAACATGCTGAAGAGC	

4.14 Preparação de *L. lactis* NCDO2118 eletrocompetente

Uma colônia de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO2118 foi selecionada e inoculada em 5mL de meio M17 suplementado com glicose (0,5%) e sacarose (0,5M)

(M17 Sac-Gli) e incubada a 30°C sem agitação *overnight*. Uma alíquota de 100µL dessa cultura foi inoculada em 5mL de M17 Sac-Gli e incubada por mais 8-10 horas. Passado o tempo desejado, 1µL da cultura de 8 horas e foi novamente inoculado em 200mL de M17 Sac-Gli suplementado com Glicina (1%) e essa nova cultura foi incubada a 30° sem agitação *overnight*. Ao atingir a densidade ótica (DO_{600nm}) de 0.4 e 0.6, o inóculo foi então centrifugado a 8.000 rotações por minuto (rpm) a 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento celular for ressuspendido em 200mL da solução de Sacarose (0,5M) mais Glicerol (10%) previamente resfriada. O processo de centrifugação de lavagem do *pellet* (precipitado) com a solução Sacarose-Glicerol foi repetido mais quatro vezes. Após a última centrifugação, o *pellet* celular foi ressuspendido em 1mL de PEG3000 (30%) mais Glicerol (10%). As bactérias ressuspendidas foram armazenadas em alíquotas de 100µL e armazenadas a -80°C.

4.15 Transformação da *L. lactis* NCDO2118

As alíquotas de células de *L. lactis* NCDO2118 eletrocompetentes foram retiradas do estoque e mantidas no gelo por 5 minutos. Em cada uma das amostras foi adicionada 5µL de DNA plasmidial pXYSEC:*slpB*. As células foram deixadas em contato com o DNA por mais 5 minutos no gelo e então o conteúdo foi transferido para as cubetas de eletroporação (distância entre os eletrodos: 0,2cm), já previamente resfriados no gelo. As amostras foram eletroporadas a um pulso de 2400V, capacitância de 25 µF e resistência de 200 Ω, utilizando o eletroporador Gene Pulser SystemTM (Biorad, CA, USA). Imediatamente após o pulso foi adicionado as amostras 1mL de meio M17 Sac-Gli, estas foram incubadas à 30°C, sem agitação, por três horas. Finalmente, as bactérias foram semeadas em placas de M17 Sac-Gli ágar suplementado com cloranfenicol (10 µg/mL) e incubadas a 30°C por 24-48 horas. Os clones obtidos foram submetidos ao ensaio de PCR e digestão enzimática (*NsiI* e *EcoRI*) par confirmação do inserto.

4.16 Produção da proteína recombinante SlpB em *L. lactis* NCDO2118

Expressão do gene *slpB*, produção e extração de proteínas

Para expressão da proteína uma colônia de *L. lactis* NCDO2118 recombinante foi inoculada em 5mL de meio M17 suplementado com glicose (0,5%) e CM (10µg/mL) e incubada a 30°C, sem agitação, *overnight*. Posteriormente, 1µL da cultura *overnight* foi

inoculado em 10mL de M17 suplementado com xilose (1%) e CM (10 μ g/mL), e incubado por aproximadamente 18 horas a 30°C, sem agitação. Ao atingir a densidade ótica (DO_{600nm}) desejada de 1,0-1,5 iniciou-se a extração das proteínas.

4.16.1 Proteínas totais

Ao atingir a DO_{600nm} o inóculo de *L. lactis* NCDO 2118 pXYSEC:slpB induzido por xilose (1%) foi centrifugado a 12.000xg, por 5 minutos a 4°C. O *pellet* formado foi duas vezes lavado com 5mL de tampão PBS pH 7,4 e 1 μ L de PMSF e centrifugado a 8.000xg, por 10 minutos a 4°C. Após as lavagens, o *pellet* foi ressuscitado com 1mL do tampão TES (sacarose 25%, EDTA 1mM e Tris-HCl 50mM pH 8,0) gelado, 1 μ L de PMSF e ditiotreitól (concentração final de 10mM). As amostras foram novamente centrifugadas a 8.000xg à 4°C por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado ressuscitado em 100 μ L de tampão TES e 900 μ L de lisozima (10mg/mL). As amostras foram então sonicadas em gelo, com cinco ciclos de 10 segundos, a uma amplitude de 60 Htz, onde cada ciclo foi intercalado com intervalos de 60 segundos no gelo. Após a sonicação, as amostras foram centrifugadas a 8.000xg à 4°C por 5 minutos e os *pellets* formados foram lavados com 1mL de acetona P.A. gelada. As amostras foram então deixadas para secar em temperatura ambiente, ressuscitadas em 70 μ L de tampão TES e 30 μ L de lisozima (1mg/mL) incubadas a 37°C por 30 minutos e finalmente adicionado 30 μ L de SDS 20%. As amostras foram armazenadas em microtubos a -20°C.

4.16.2 Proteínas do sobrenadante

Ao atingir a DO_{600nm} o inóculo de *L. lactis* NCDO 2118 pXYSEC:slpB induzido por xilose (1%) foi centrifugado a 12.000xg, por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e filtrado em filtro de 0,2mm e transferido para outro tubo cônico de 15mL. Foi adicionada ao filtrado 1 μ L de fluoreto de fenilmetilsulfonil (*phenylmethylsulfonyl fluoride* - PMSF) (1mM) e 500 μ L de Ácido tricloroacético 100%, e então, deixou-se a solução precipitando no gelo por 60 minutos. Após a precipitação, as amostras foram centrifugadas a 1.000xg, por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* dissolvido em 200 μ L de NaOH (50mM). As amostras foram armazenadas a -20°C.

4.16.3 Proteínas de superfície

Ao atingir a DO_{600nm} o inóculo de *L. lactis* NCDO 2118 pXYSEC:slpB induzido por xilose (1%) foi centrifugado a 12.000xg, por 5 minutos a 4°C. O *pellet* formado foi duas vezes lavado com 5mL de tampão PBS pH 7,4 e 1μL de PMSF e centrifugado a 8.000xg, por 10 minutos a 4°C. Após as lavagens, o sobrenadante foi descartado e o novo *pellet* formado foi ressuspendido em 4mL de Cloreto de Guanidina (5M) e incubado em banho-maria à 50°C por 15 minutos. As amostras foram então divididas em tubos de 2mL e centrifugadas a 21.000xg à temperatura ambiente por 20 minutos. O sobrenadante foi coletado e transferido para tubos concentradores de 10 kDa e centrifugado mais uma vez a 12.000xg à 4°C por 30 minutos. Foram adicionados 3mL de tampão PBS pH 7,4 para lavar e centrifugado por mais 10 minutos, nas mesmas condições anteriores. As amostras foram lavadas mais duas vezes, de modo a concentrar a amostra para 500μL. Os 500μL obtidos foram transferidos para microtubos e armazenados a -20°C.

4.16.4 Eletroforese de proteínas em condição desnaturante em gel de poliacrilamida – SDS-PAGE

As amostras foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida na concentração de 10%. Antes de serem aplicadas no gel, foi acrescentado as amostras o Tampão de Amostra (0,5M Tris-HCl pH 6.8, SDS 10%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0.5%, β-mercaptoetanol 5%) e em seguida aquecidas a 100°C por 5 minutos. A corrida foi realizada em Tampão Tris-glicina (250mM Tris base, pH 8.3, 2,5M Glicina e SDS 1%) a 120 Volts. O gel foi incubado sob agitação à temperatura ambiente por 2 horas na solução corante de azul brilhante de Coomassie (Metanol 50%, ácido acético 10%, e Coomassie Brilliant Blue 0.25%). Em seguida, o gel foi transferido para a Solução Descorante (Metanol 50%, Ácido Acético 10%) até que o padrão de bandas pudesse ser visualizado. O padrão de peso molecular utilizado foi o Precision Plus Protein™ Dual Color Standards (Bio-rad).

4.16.5 Detecção da proteína recombinante por Western blot (WB)

Para a detecção da proteína recombinante produzida, as amostras foram transferidas para uma membrana de PVDF (Bio-Rad, EUA), previamente ativada com

metanol por 10 segundos, a transferência também foi realizada em um sistema de eletrotransferência Mini Trans-Blot® (Bio-Rad Laboratories, USA) contendo tampão de transferência (Tris-HCl 0,58% pH 8,4-9,4, metanol 20%, SDS 0,037% e glicina 0,29%). O período de transferência por durante 60 minutos à 100 V.

A membrana foi incubada durante a noite a 4°C com anticorpos primários purificados a partir de soros de coelho (AGRO-BIO, França). Estes foram obtidos injetando o seguinte peptídeo slpB em coelhos e utilizado na diluição 1: 10.000. Após a lavagem, as membranas foram incubadas com anticorpos secundários: IgG anti-coelho conjugada com peroxidase de rábano silvestre (1: 15.000, AGRO-BIO, França) por 2 h em temperatura ambiente. Posteriormente, a membrana passou por três lavagens consecutivas com TBS-Tween, sendo em seguida incubada em temperatura ambiente durante 60 minutos com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase Amersham™ ECL™ Anti-mouse IgG, Horseradish Peroxidase-Linked Whole Antibody (GE Healthcare, EUA) diluído 1:3000 em 5% de leite desnatado em TBS-Tween. Após a membrana ser submetida a três lavagens com TBS-Tween, conforme descrito anteriormente e a revelação foi feita pelo kit Amersham™ ECL™ Prime Western blotting reagente (Bio-Rad Laboratories, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Após o período de incubação com os reagentes para detecção, a membrana foi colocada em cassete para exposição com um filme fotográfico durante 30 segundos para captação da imagem, o procedimento foi realizado na câmera escura.

4.17 Avaliação *in vitro* de características probióticas

Para realizar os ensaios *in vitro*, as bactérias foram cultivadas sempre nas mesmas condições, sendo elas:

- *L. lactis* NCDO2118 WT → inóculos preparados com 2% de bactéria, inoculado em meio M17 suplementado com glicose (0,5%) ou xilose (1%). Cultivados a 30°C, sem agitação, por 18 horas;
- *L. lactis* NCDO2118 pXYSEC:*nuc* → inóculos preparados com 2% de bactéria, inoculado em meio M17 suplementado com cloranfenicol (10µg/mL) e glicose (0,5%) ou xilose (1%), para controle e indução do plasmídeo, respectivamente. Cultivados a 30°C, sem agitação, por 18 horas;
- *L. lactis* NCDO2118 pXYSEC:*slpB* → inóculos preparados com 2% de bactéria, inoculado em meio M17 suplementado com cloranfenicol (10µg/mL) e glicose

(0,5%) ou xilose (1%), para controle e indução do plasmídeo, respectivamente. Cultivados a 30°C, sem agitação, por 18 horas.

4.17.1 Curva de crescimento

Para monitorar o crescimento das bactérias 100µL de pré-inóculo foram diluídos em 900µL de M17 e incubados a 30°C por uma hora. Após a incubação, 20µL de cada amostra foram novamente diluídos em 980µL de meio M17 suplementado com glicose (0,5%) ou xilose (1%). As amostras foram homogeneizadas e aplicadas nos poços de uma microplaca de ELISA de 96 poços de fundo chato (200µL por poço). A placa foi incubada a 30°C no leitor de ELISA, que realizou leituras da densidade ótica a 600nm das amostras por 48 horas (intervalos de 1 hora). Foram realizadas contagens de UFC de acordo com as condições de cultivo. O experimento foi realizado em triplicatas técnicas e biológicas.

4.17.2 Taxa de sobrevivência após estresse ácido e sais biliares

Os testes de tolerância ao pH gástrico e aos sais biliares foram realizados de acordo com a metodologia de CORDEIRO *et al* (2018). Para testar a tolerância das linhagens ao pH gástrico, 100µL de cultura foram inoculados em 900µL de meio M17 pH 2,0 (o pH do meio foi ajustado utilizando solução HCl 2M) e incubados a 30°C por uma hora. Após a incubação, as amostras foram homogeneizadas, diluídas em água peptonada 1%, em 3 diferentes concentrações e com 50µL de cada concentração foi realizado o plaqueamento em M17 ágar (1,5%) suplementado com glicose (0,5%) e CM (10µg/mL), no caso das linhagens recombinantes. O mesmo foi realizado para testar a tolerância aos sais biliares, com o ajuste de que os 100µL de cultura foram inoculados com 850µL de meio M17 e 50µL de solução de sais biliares 100mg/mL (mistura equimolar de colato e desoxicolato; Sigma Chemical, St. Louis, MO, EUA). As placas foram incubadas a 30°C por 24h e a contagem de UFC foi realizada.

A taxa de sobrevivência de cada bactéria foi determinada comparando contagens de UFC anterior e posterior ao estresse, de acordo com FERREIRA *et al.*, 2017, através da equação: $Taxa\ de\ sobrevivência\ (\%) = (\log\ UFC\ N_1 / \log\ UFC\ N_0) \times 100$. Onde: N_1 corresponde à contagem de células viáveis após os estresses e N_0 corresponde à contagem de células viáveis no grupo controle (antes dos estresses).

4.17.3 Análise do potencial zeta

Foi utilizado para averiguar a mobilidade eletroforética (potencial zeta) o equivalente a 1×10^9 UFC/mL por amostra de bactéria. As amostras foram lavadas três vezes com 5mL da solução tampão KH_2PO_4 pH 7,0. O *pellet* final formado foi suspenso em 5mL de solução tampão KH_2PO_4 em três diferentes pH: 7,0, 5,0 e 2,0. A mobilidade eletroforética das amostras foi medida pelo ZetaSizer nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, United Kingdom) e convertida para potencial zeta utilizando a equação de Helmholtz-Smoluchowski (SCHÄR-ZAMMARETTI; UBBINK, 2003). Todos os experimentos foram realizados em triplicatas técnicas e biológicas.

4.17.4 Análise de hidrofobicidade da superfície celular

Para determinar o grau de hidrofobicidade da superfície celular das bactérias, foi realizado o ensaio de Adesão Microbiana a Hidrocarbonetos (MATH) como descrito por KOS *et al.* (2003). Foram preparados inóculos de 15mL e suas densidades óticas ajustadas para $\text{DO}_{600\text{nm}} = 1,0$. As amostras foram centrifugadas e os *pellets* lavados com PBS pH 7,0, por duas vezes e ressuspensas no final em 15mL de tampão KNO_3 0,1M pH 6,2. Alíquotas de 4mL da suspensão de bactérias foram colocadas em tubos de vidro, juntamente com 1mL do solvente (xilol, clorofórmio e acetato de etila), incubadas 5 minutos em temperatura ambiente e misturadas em vórtex por 2 minutos. Após a agitação das amostras, as mesmas foram incubadas por mais 60 minutos, para permitir a separação das fases. A fase aquosa de cada uma das amostras foi separada e a absorvância medida através da $\text{DO}_{600\text{nm}}$. A porcentagem de hidrofobicidade da superfície celular (H%) foi calculada utilizando a fórmula: $H \% = (1 - A1/A0) \times 100$. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas técnicas e biológicas.

4.17.5 Análise da auto-agregação bacteriana

O ensaio de auto-agregação executado foi adaptado de CHOI *et al.* (2018). Para realizar o ensaio, primeiramente as linhagens foram cultivadas por 24 horas, centrifugadas, 3.500 rpm por 10 minutos, lavadas e ressuspensas em PBS 1x. Após a lavagem a densidade ótica (DO) (600nm) de cada bactéria foi ajustada para $0,30 \pm 0,02$ e as amostras incubadas a 30°C sem agitação. Nos intervalos de 1, 3, 6, 12 e 24 horas de

incubação, a D.O. foi novamente avaliada e a porcentagem de auto-agregação determinada de acordo com a seguinte fórmula: $A \% = 100 \times (1 - A_t / A_0)$, onde A_t refere a valor da DO_{600} nos pontos de tempo indicados e A_0 indica o valor da DO_{600} na hora 0. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas técnicas e biológicas.

4.18 Avaliação dos efeitos da linhagem recombinante *L. lactis* NCDO2118 pXYSEC:*slpB* no modelo de colite induzida por DSS

4.18.1 Animais

Camundongos fêmeas convencionais C57BL/6 de 8 semanas de idade foram obtidos na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG, Belo Horizonte, Brasil). Eles foram alojados em plástico gaiolas em uma sala controlada (temperatura 18-23°C., ciclo de luz de 14 h de luz / 10 h de escuridão, umidade relativa de 40–60%) com comida e água *ad libitum*. Todos experimentais procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA-UFMG, Brasil, protocolo 148/2020).

4.18.2 Preparo das bactérias para administração intragástrica

Diariamente, foram preparadas doses das linhagens *L. lactis* NCDO2118 WT e *L. lactis* NCDO2118 pXYSEC:*slpB* para os animais, sendo utilizada a gavagem intragástrica como forma de administração. As duas linhagens foram cultivadas em meio M17 (Difco) acrescido com glicose (0,5%), para a linhagem selvagem, e xilose (1%) + 10 µg/mL de Cm, para a linhagem recombinante.

Após 24 horas de cultivo, as culturas foram centrifugadas a 3.500 rpm por 10 minutos e lavadas com PBS 1x, duas vezes para retirada do antibiótico. As doses preparadas foram equivalentes a 5×10^9 mL⁻¹ UFC (Unidades Formadoras de Colônia) de bactérias ressuspendidas em 100µl de PBS 1x.

4.18.3 Desenho experimental e colite induzida por DSS

Os camundongos foram divididos aleatoriamente em quatro grupos principais, cada um contendo seis animais por grupo. O grupo 1 representaram o grupo de controle

saudável (sem DSS) que recebeu apenas água. Já os grupos 2 a 4 receberam uma solução de DSS (36-50 kDa, MP Biomedicals, CAT 260110, LOT Q5756) preparado na concentração de 1,7% em água potável filtrada e fornecido aos animais diariamente, durante 7 dias, de acordo com o modelo de colite aguda previamente descrito (Wirtz *et al.*, 2017) (FIG 11). Os animais do grupo 2 receberam apenas a solução de DSS (grupo DSS) e nenhum tratamento; camundongos do grupo 3 foram tratados com doses intragástricas de *L. lactis* NCDO2118 WT (grupo DSS + NCDO2118 WT) e os animais do grupo 4 foram tratados com doses intragástricas de *L. lactis* NCDO2118 pXYSEC:*slpB* (grupo DSS + NCDO2118 pXYSEC:*slpB*). Após os 7 dias de experimento os animais foram eutanasiados.

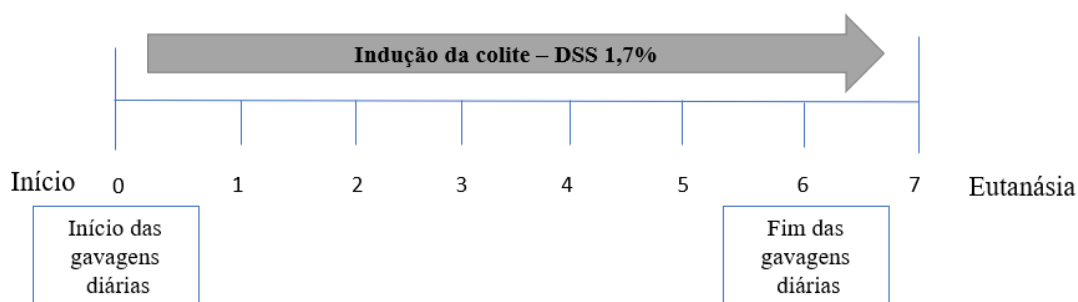


Figura 11 – Delineamento experimental utilizado para indução da colite utilizando DSS e tratamento utilizando *L. lactis* NCDO2118 WT e *L. lactis* NCDO2118 pXYSEC:*slpB*. Os camundongos receberam solução de DSS na concentração de 1,7% continuamente durante todo o experimento. Diariamente os animais receberam por gavagem doses de 5×10^9 UFC de bactéria durante 7 dias.

4.18.4 Avaliação da colite

Peso corporal dos animais

O peso corporal dos camundongos foi avaliado individualmente todos os dias, no mesmo horário, até o final do experimento. Através deste foi calculado o percentual de variação de peso, parâmetro o qual foi utilizado para obtenção do escore do Índice de Atividade da Doença (DAI) posteriormente. Além do peso, o consumo de água e comida também foi registrado diariamente.

Índice de Atividade da Doença

O Índice de Atividade da Doença (DAI) foi determinado a partir do terceiro ao último dia experimental, e conforme descrito por Cooper *et al.*, 1993, foram pontuados

três principais sinais clínicos de colite: perda de peso, diarreia, e sangramento retal (Tabela 5). O escore de cada animal é dado pela soma de cada parâmetro e o índice máximo é igual a 12.

Para acessar o sangramento retal foi utilizado o teste para sangue oculto (FECA-CULT, Inlab) e avaliada a presença de sangue nas fezes dos animais.

Tabela 5 – Pontuação do escore macroscópico da colite (COOPER et al., 1993)

Escore	% perda de peso	Diarréia	Sangramento
0	Nenhuma	Nenhuma	Ausente
1	1 a 5		
2	5 a 10	Moderada	Oculto
3	11 a 15		
4	>15	Grave	Visível

Comprimento e coleta do cólon

Foi realizada uma incisão abdomeminal longitudinal para remover o intestino e cólon para análises posteriores. O comprimento do cólon foi medido do ceco até a porção final do reto e os valores obtidos para cada animal foram usados para calcular a média de cada grupo em cm.

Análise histomorfológica

Para análise histomorfológica, a porção distal do cólon do camundongo foi coletada após a eutanásia e lavada com PBS. Depois, rolos de tecido do cólon foram preparados e imersos em solução de formaldeído (4%, v/v) para fixação do tecido. o material foi embebido em parafina, e uma seção de 4 µm foi colocada em uma lâmina de vidro e corado com Hematoxilina-Eosina (HE). As lâminas de cada grupo experimental foram fotografadas (objetiva de ampliação 20x) usando uma câmera digital (Spot Insight Color) acoplado a um microscópio óptico (Olympus, BX-41, Japão).

O escore histológico foi determinado por um patologista, usando a pontuação descrita por Wirtz e colaboradores (2017). Esta pontuação considerou a intensidade do infiltrado de células mononucleares e polimorfonucleares na lâmina própria, mudanças na arquitetura da mucosa e presença de ulceração e erosão (Tabela 6). A soma dos dois

parametros avaliados resulta em uma escore variando de 0 (sem alterações) a 6 (infiltrações celulares disseminadas e extenso dano ao tecido).

Tabela 6 – Pontuação do escore histopatológico da colite (WIRTZ et al., 2017)

Escore	Dano ao tecido	Infiltração de células inflamatórias da lâmina própria na colite DSS
0	Nenhuma	Infrequente
1	Danos epiteliais focais isolados	Aumentado, alguns neutrófilos
2	Erosões e ulcerações da mucosa	Presença submucosa de clusters de células inflamatórias
3	Profundo dano extensivo na parede do intestino	Infiltrações de células transmuralis

Para análise morfométrica, cinco imagens do cólon de cada animal foram capturadas aleatoriamente e analisadas, onde a profundidade das criptas foram então medidas verticalmente através do software ImageJ (versão 1.8.0).

Além disso, os cortes das amostras parafinizadas do cólon foram também corados com Ácido Periódico-Schiff (PAS), técnica utilizada para corar as células produtoras de muco, possibilitando a avaliação do número de células caliciformes nos tecidos (PRISCIANDARO *et al.*, 2011). Foram feitas dez imagens de campo aleatórias de cada amostra usando a objetiva de 40× e as células caliciformes intactas foram contadas usando o software ImageJ (versão 1.8.0) e expresso como o número de células por campo de alta potência (hpf) (40 ×, 108,2 µm²).

4.18.5 Quantificação do infiltrado de neutrófilos no intestino

A quantificação do acúmulo de neutrófilos no intestino foi mensurada indiretamente pelo ensaio da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), presente nos neutrófilos. Este ensaio foi realizado de acordo com (COSTA *et al.*, 2016). As amostras para o ensaio foram preparadas a partir da homogeneização do tecido do cólon em tampão (0.1 M NaCl, 0.02 M NaH₂PO₄·1H₂O, 0.015 M Na₂-EDTA) na proporção de 1,9 mL/100 mg de tecido.

Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000g por 10 minutos à 4°C e o precipitado foi submetido à lise hipotônica, onde adicionou-se 0,9 mL de solução contendo NaCl 0,2% seguido de adição de igual volume de solução contendo NaCl 1,6% e glicose 5%. Após nova centrifugação (10.000g, à 4°C, por 10 min), o precipitado foi

ressuspendido em tampão 2 (NaH_2PO_4 0,05 M; *Hexadecyl trimethyl ammonium bromide* – HTAB, 0,5% p/v; Sigma-Aldrich - pH 5.4) na proporção de 1,9 mL para cada 100mg de tecido. Após essa etapa, o homogenato foi submetido a três ciclos de congelamento-descongelamento utilizando-se nitrogênio líquido. Em seguida, as amostras foram novamente centrifugadas (10.000g por 15 minutos) e o sobrenadante foi recolhido para a realização do ensaio.

A atividade da mieloperoxidase foi calculada pela medida das alterações na densidade óptica (OD) a 450nm utilizando a reação entre tetrametilbenzidina (Sigma-Aldrich) diluído em dimetilsufóxido (1,6mM) e H_2O_2 (0,5mM). A reação foi parada com H_2SO_4 (0,002%) e a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (Status-labsystems, Multiskan RC, Uniscience do Brasil).

4.18.6 Quantificação do infiltrado de eosinófilos no intestino

A extensão da infiltração de eosinófilos nos tecidos foi avaliada pela medição da atividade da peroxidase eosinofílica (EPO), conforme descrito anteriormente (PERRONE; PEREIRA; CARVALHO, 2011). Para a realização do ensaio foram utilizados 100mg da porção distal do cólon, homogeneizados com 1,9mL de PBS e centrifugados a 10.000g durante 10 minutos à 4°C. O precipitado foi submetido à lise hipotônica, onde adicionou-se 0,9 mL de solução contendo NaCl 0,2% seguido de adição de igual volume de solução contendo NaCl 1,6% e glicose 5%. As amostras foram novamente homogeneizadas e centrifugadas (10.000g, à 4°C, por 10 min). O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspenso em 1,9 mL de HTAB a 0,5% diluído em PBS. Depois de 3 ciclos de congelamento-descongelamento em nitrogênio líquido, as amostras foram centrifugadas a 4°C, 10.000g durante 10 minutos.

Para testar a atividade da enzima, o sobrenadante obtido foi misturado com um substrato (1:1) contendo 1,5mmol/L de o-fenilenodiamina, 6,6mmol/L de H_2O_2 e 0,075 mmol/L de Tris-HCl (pH 8). Após 30 minutos a reação foi interrompida com 50 μL de H_2SO_4 1M, e a absorção foi medida a 492 nm.

4.18.7 Avaliação dos níveis de sIgA

A determinação dos níveis de IgA secretora (sIgA) nos fluidos intestinais foi realizada de acordo com Cordeiro et al., 2018. Para a determinação da sIgA foram utilizadas microplacas de 96 poços (Nunc-Immuno Plates, MaxiSorp) revestidas com anticorpos anti-IgA (Southern Biotechnology, Birmingham, AL, USA), por 18h à 4°C. As placas foram lavadas com PBS 1X acrescido de Tween 20 (0.05%) e bloqueadas com 200µl de solução de bloqueio (Albumina 1% diluída em PBS-tween), por 1 h em temperatura ambiente. As amostras de fluidos intestinais foram diluídas em PBS-tween (0.05%) (1:1000) e então adicionadas à placa. Após incubação por 1 h em temperatura ambiente, as placas foram lavadas e foram adicionados anticorpo anti-IgA conjugado (Southern Biotechnology) (1:10.000 em PBS-tween). As placas foram novamente incubadas por 1 h em temperatura ambiente. A placa foi lavada e a cada poço foram adicionados 100µl de ortofenilenodiamina (OPD) (Sigma, St. Louis, MO, USA) preparado em solução de fosfato/citrato (1mg/mL) e H₂O₂ (0.04%). As placas foram mantidas fora do abrigo da luz por 10 minutos e em seguida, a reação foi interrompida com uma solução de Ácido Sulfúrico 2N e a leitura realizada em leitor de placas (Bio-Rad Model 450 Microplate Reader) a 492 nm. Os resultados foram mensurados em concentração de sIgA (µg) por ml de fluido intestinal, de acordo com a curva padrão.

4.18.8 Análise de expressão gênica no cólon

A expressão quantitativa dos genes no tecido do cólon foi determinada de acordo com Do Carmo et al., 2019. Após a eutanásia dos camundongos, fragmentos de aproximadamente 1 cm do cólon foram coletados e o RNA total foi isolado usando PureLink RNA Mini Kit (ThermoFisher Scientific) de acordo com o protocolo do fabricante. Posteriormente, as amostras foram tratadas usando DNase I (Invitrogen; Waltham, MA, EUA) para digerir o DNA genômico residual e, em seguida foi utilizado o kit Turbo DNA-free Kit (Ambion; Austin, TX, USA) foi utilizado para remoção do DNA, seguindo o protocolo do fabricante. Para a obtenção do cDNA das amostras, a transcrição reversa foi usando o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems; Foster City, CA, EUA).

O ensaio de PCR quantitativo (qPCR) foi determinado usando iTaq universal SYBR green supermix (Biorad; Hercules, CA, EUA) e primers específicos para os genes (Tabela 7): Mucina2 (*muc2*), Claudina-1 (*cld1*), Claudina-5 (*cld5*), zônula de oclusão-1 (*zo-1*), zônula de oclusão-2 (*zo-2*), Ocludina (*ocln*), iNOS, HMOX, PPAR γ , IFN γ , IL-10, IL-12, IL-17a, IL-1 β , TGF β , IL-6 e TNF- α , bem como genes de manutenção que codificam β -actina (*act β*) e GAPDH (*gapdh*).

As reações de amplificação foram realizadas utilizando o volume final de 10 μ l (5 μ l de SYBR green supermix e 100ng de cDNA, 5pM de primer *forward* e 5pM de primer *reverse*). O programa de amplificação consistiu nas seguintes etapas: 95°C por 30s, 40 ciclos de 95°C por 15s e 60°C por 30s utilizando ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Os resultados foram expressos como uma alteração dos níveis de expressão, usando o média e desvios-padrão da expressão alvo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).

Tabela 7 - Lista de *primers* utilizados no ensaio de qPCR

Gene	Primer	Sequencia (5'→3')	Referência
<i>actβ</i>	<i>Forward</i>	TGGCTGGGTGTTGAAGGTCT	(CARMO <i>et al.</i> , 2020)
	<i>Reverse</i>	AGCACGGCATCGTCACCAACT	
<i>gapdh</i>	<i>Forward</i>	CAACGACCACTTTGTCAAGC	(CARMO <i>et al.</i> , 2020)
	<i>Reverse</i>	TTCCTCTTGTGCTCTTGCTG	
<i>muc2</i>	<i>Forward</i>	CAGCACCGATTGCTGAGTTG	(CARMO <i>et al.</i> , 2020)
	<i>Reverse</i>	GCTGGTCATCTCAATGGCAG	
ZO1	<i>Forward</i>	GAATGATGGTTGGTATGGTGCG	(CARMO <i>et al.</i> , 2020)
	<i>Reverse</i>	TCAGAAGTGTGTCTACTGTCCG	
ZO2	<i>Forward</i>	GGAGACCAGATTCTGAAGGTGAAC ACA	(RABAH <i>et al.</i> , 2020)
	<i>Reverse</i>	CCTTTGGGGATTTCTAGCAGGTAG AGGAC	
<i>Claud1</i>	<i>Forward</i>	CTGGAAGATGATGAGGTGCAGAA	(RABAH <i>et al.</i> , 2020)
	<i>Reverse</i>	CTAATGTGCGCCAGACCTGAA	
<i>Claud5</i>	<i>Forward</i>	ACGGGAGGAGCGCTTTAC	

	<i>Reverse</i>	GTTGGCGAACCAGCAGAG	(PFEIFFER <i>et al.</i> , 2011)
Ocln	<i>Forward</i>	GGACCCTGACCACTATGAAACAGA CTA	(RABAH <i>et al.</i> , 2020)
	<i>Reverse</i>	TAGGTGGATATTCCCTGACCCAGT C	
iNOS	<i>Forward</i>	CAGCTGGGCTGTACAAACCTT	(RABAH <i>et al.</i> , 2020)
	<i>Reverse</i>	CATTGGAAGTGAAGCGTTTCG	
HMOX	<i>Forward</i>	GTACACATCCAAGCCGAGAA	(PLÉ <i>et al.</i> , 2016)
	<i>Reverse</i>	TGGTACAAGGAAGCCATCAC	
Pparg	<i>Forward</i>	CAGGCTTCCACTATGGAGTTC	(PLÉ <i>et al.</i> , 2016)
	<i>Reverse</i>	GGCAGTTAAGATCACACCTATCA	
IFNg	<i>Forward</i>	TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA	(RABAH <i>et al.</i> , 2020)
	<i>Reverse</i>	TGGCTCTGCAGGATTTTCATG	
Tgfb1	<i>Forward</i>	TGACGTCACTGGAGTTGTACGG	(RABAH <i>et al.</i> , 2020)
	<i>Reverse</i>	GGTTCATGTCATGGATGGTGC	
Tnfa	<i>Forward</i>	AGCCCATGTTGTAGCAAACC	(CARMO <i>et al.</i> , 2020)
	<i>Reverse</i>	TGAGGTACAGGCCCTCTGAT	
Il10	<i>Forward</i>	AAAGAAGGCATGCACAGCTC	(CARMO <i>et al.</i> , 2020)
	<i>Reverse</i>	AAGCATGTTAGGCAGGTTGC	
IL12b	<i>Forward</i>	GGAAGCACGGCAGCAGAATA	(RABAH <i>et al.</i> , 2020)
	<i>Reverse</i>	AACTTGAGGGAGAAGTAGGAATG G	
IL1beta	<i>Forward</i>	CAACCAACAAGTGATATTCTCCAT G	(RABAH <i>et al.</i> , 2020)
	<i>Reverse</i>	GATCCACACTCTCCAGCTGCA	
IL17a	<i>Forward</i>	GCTCCAGAAGGCCCTCAGA	(RABAH <i>et al.</i> , 2020)
	<i>Reverse</i>	AGCTTCCCTCCGCATTGA	
IL6	<i>Forward</i>	GAGGATACCACTCCCAACAGACC	(RABAH <i>et al.</i> , 2020)
	<i>Reverse</i>	AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA	

4.18.9 Quantificação de citocinas através de ensaio imunoenzimático (ELISA)

Para a quantificação de citocinas as amostras foram pesadas e 50mg de tecido do cólon foram homogeneizados em 1mL de solução PBS contendo Tween-20 (0,05%) (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, USA), PMSF 0,1mM (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, USA), Cloreto de benzentônio 0,1mM (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, USA), EDTA 10mM (Synth, São Paulo, São Paulo, Brazil) e aprotinina A 20 KIU (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). As amostras homogeneizadas foram então centrifugadas a 3.000g por 10 minutos a 4°C, e o sobrenadantes coletados para a realização do ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA).

Para o ensaio enzimático foram utilizadas microplacas de 96 poços (Nunc-Immuno Plates, MaxiSorp) revestidas com monoclonais purificados reativos com citocinas IL-10, IL-12 p70, IL-6, IL-17, IL-1 β / IL-1F2, TGF β 1, TNF- α , IFN- γ , (R&D Systems, Inc, EUA), por 18 horas a 4°C. As citocinas foram quantificadas utilizando os kits da R&D Systems de acordo com o protocolo do fabricante.

4.19 Análises estatísticas

Os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão e analisados usando o teste t de *Student*, test t de Holm-Sidak, One-Way ANOVA ou Two-Way ANOVA seguidos pelo pós-teste de Tukey. Os gráficos e as análises estatísticas foram realizados no programa GraphPad Prism versão 7.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA.) e consideradas significativas as diferenças: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A proteína SlpB foi apontada em estudos recentes como a principal proteína de superfície envolvida nas características probióticas da linhagem *P. freudenreichii* CIRM-BIA 129, possuindo papel fundamental na adesão, propriedades imunomoduladoras e anti-inflamatórias da linhagem (DO CARMO, *et al.*, 2017; DO CARMO, *et al.*, 2018 e DO CARMO, *et al.*, 2019). A fim de elucidar se as propriedades da proteína SlpB são permutáveis entre outra linhagem bacteriana, a linhagem *L. lactis* NCDO2118 foi selecionada para carrear o plasmídeo para produção da proteína recombinante. *L. lactis* é apontada em estudos recentes como uma linhagem probiótica (OLIVEIRA, 2017), entretanto não apresenta proteínas sua superfície, além de possuir um sistema bem definido para a expressão de proteínas heteróloga, o sistema de expressão endereçamento proteico XIES (*Xylose-Inducible Expression System*) (MIYOSHI *et al.*, 2004b) demonstrando-se o modelo ideal para estudo das propriedades da proteína SlpB.

5.1 Otimização de códons da sequência do gene *slpB*

O primeiro passo deste trabalho consistiu na seleção da sequência de nucleotídeos responsáveis pela codificação da proteína de superfície SlpB proveniente de *P. freudenreichii* CIRM-BIA 129 e em sua otimização para a expressão em bactérias *L. lactis* NCDO2118.

A sequência codificadora de 556 aminoácidos foi obtida do banco de dados do NCBI, depositada sob o número de acesso CDP48273.1 (CDS 5503..7173). À sequência foram incluídos dois sítios de restrição, um na posição 5' para a enzima *NsiI* e outro na posição 3' para a enzima *EcoRI*, para auxiliar nos processos de clonagem.

A sequência da proteína SlpB, para ser expressa e de forma eficiente em *L. lactis* NCDO2118, foi otimizada pelo *software* OptimumGene™ (GenScript Corporation). O cálculo do índice de adaptação de códons (CAI - *Codon Adaptation Index*) (FIG. 12), usado como um método quantitativo de previsão do nível de expressão de um gene com base em sua sequência de códons (LEE, S. *et al.*, 2010), foi otimizado de 0,95 para 0,96. O CAI de um gene pode ser estabelecido a partir da obtenção da média geométrica dos valores de adaptabilidade dos seus códons e pode assumir valores compreendidos entre

zero e um. Um CAI de 1,0 é considerado perfeito no organismo de expressão desejado e um CAI de $> 0,8$ é considerado bom, em termos de alto nível de expressão gênica.

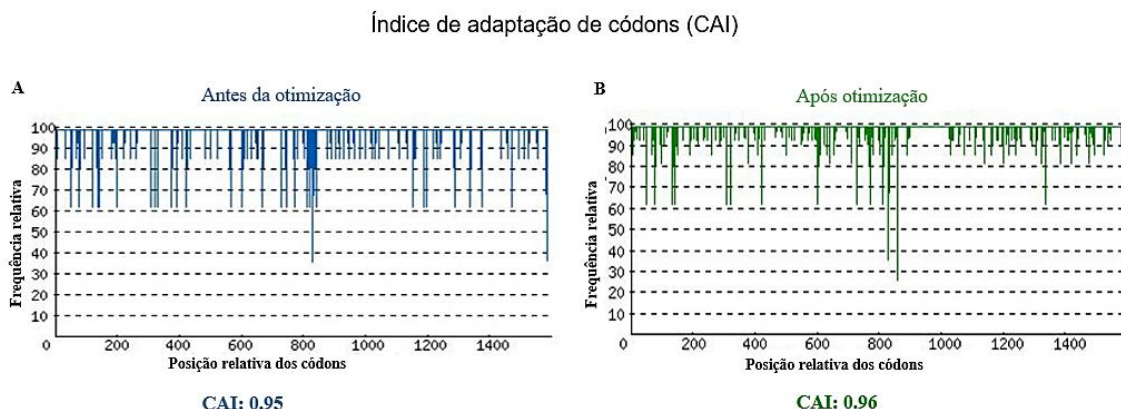


Figura 12 - Distribuição da frequência de uso de códons ao longo do comprimento da sequência do gene. (A) Distribuição da frequência dos códons após otimização; (B) Distribuição da frequência dos códons antes da otimização.

O Índice da Frequência de Códons Ótimos (*Frequency of Optimal Codons* - FOP) do gene também foi otimizado, aumentando de 83 para 87 a porcentagem de códons ótimos (FIG. 13).

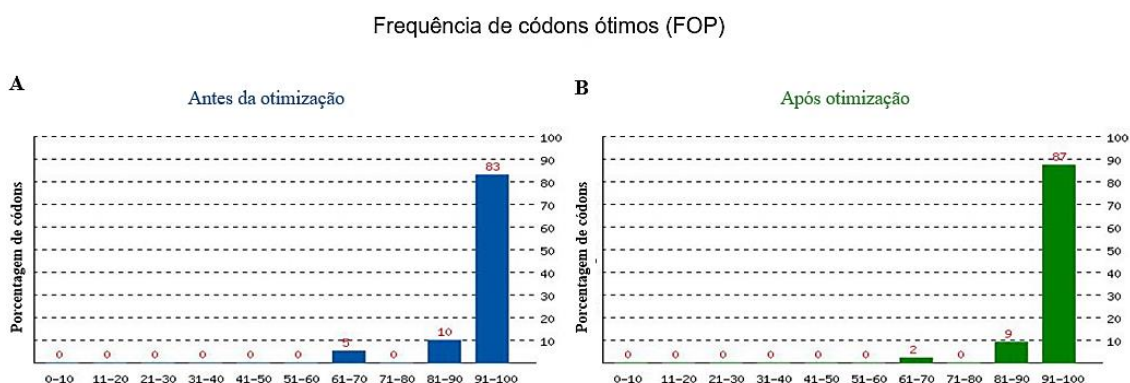


Figura 13 - A distribuição percentual de códons em grupos de qualidade de códon computados após (A) e antes da otimização (B). O valor de 100 é definido para o códon com a maior frequência de uso para um dado aminoácido no organismo de expressão desejado.

Sequências com conteúdo elevado de G-C (guanina-citosina) permitem com mais facilidade que o mRNA se dobre em uma estrutura secundária estável, inibindo o início da tradução e diminuir a síntese de proteínas (MOHSENI *et al.*, 2017). Desta forma, o conteúdo G-C foi otimizado de 39,28% para 37,98% (FIG. 14). Além disso, foram retiradas também estruturas que impactam na ligação ribossômica e na estabilidade do mRNA, como sítios de ação cis e *Stem-Loop*. O processo de otimização atuou através de mutações sinônimas que não alteram a sequência de aminoácidos da proteína de interesse,

mas favorecem a expressão das mesmas, e resultou em um fragmento de 1598 pb (GC%:37.98) correspondente ao gene da proteína de superfície SlpB. O gene otimizado da proteína foi clonado no vetor de pUC57 e sintetizado pela empresa GenScript Corporation (Piscataway, NJ, EUA).

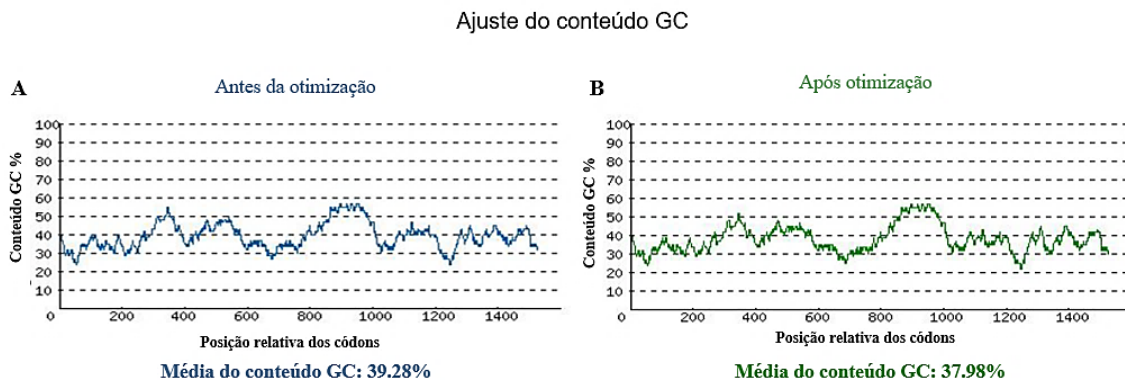


Figura 14 – Conteúdo GC da sequência da proteína após (A) e antes da otimização (B). O intervalo percentual ideal de conteúdo de GC está entre 30-70%. Os picos de % de conteúdo de GC em uma janela de 60pb foram removidos.

5.2 Clonagem do inserto da proteína SlpB no vetor pXYSEC

Afim de obter o uma boa quantidade de cópias do DNA plasmidial para extração, purificação e posterior manipulação, foi realizada expansão clonal das colônias de bactérias recombinantes *E. coli* TOP10 *pUC:slpB* e *L. lactis* NCDO 2118 *pXYSEC:nuc*. Após a expansão, os plasmídeos foram extraídos utilizando o kit QIAfilter Plasmid Midi Kit (Qiagen, EUA). É possível observar na figura 15 a confirmação da extração do DNA plasmidial *pUC:slpB* revelado em gel de agarose 1%.

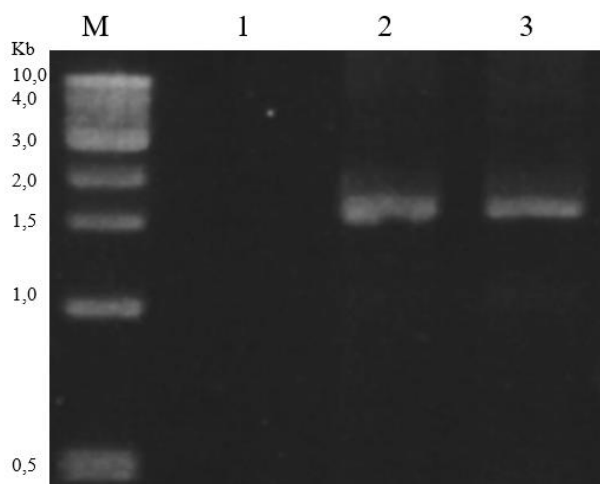


Figura 15 - Confirmação da purificação do DNA plasmidial pUC:slpB. Eletroforese em gel de agarose 1%. (M) Marcador de peso molecular de 1kb gene ruler; (1) Controle negativo; (2) pUC:slpB Genescript; (3) pUC:slpB Midiprep.

Seguido da verificação, os plasmídeos pUC:*slpB* e pXYSEC:*nuc* purificados passaram pela digestão enzimática com as enzimas *NsiI* e *EcoRI*, sendo esta possível devido à inserção de sítios de restrição para as enzimas citadas. O volume total da reação de digestão foi depositado e resolvido em gel de agarose à 1%. Como pode ser observado na Figura 16, nas colunas 1 e 2, que correspondem a digestão de duas colônias de *E. coli* pUC:*slpB*, há a separação do DNA em dois fragmentos, um fragmento de 2720pb e outro de 1588pb, que condizem ao vetor pUC57 e ao gene *slpB*, respectivamente. Já nas colunas 3 e 4 é possível observar um fragmento de 3251pb e outro de 576pb, que correspondem ao vetor pXYSEC e o gene da proteína nuclease, respectivamente, provenientes da digestão do plasmídeo pXYSEC:*nuc*.

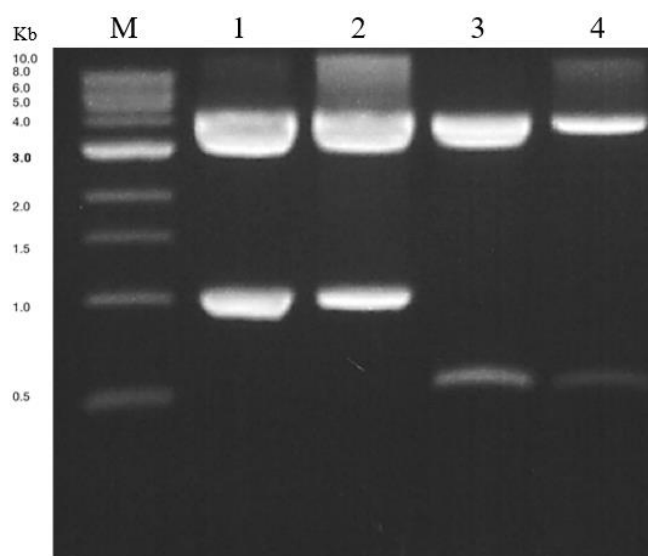


Figura 16 - Digestão dos plasmídeos pUC:*slpB* e pXYSEC:*nuc* extraídos de *E. coli* TOP 10 com as enzimas de restrição *EcoRI* e *NsiI*. Eletroforese em gel de agarose 1%. (M) 1kb gene ruler (1) pUC:*slpB* colônia 1; (2) pUC:*slpB* colônia 2; (3) pXYSEC:*nuc* colônia 1; (4) pXYSEC:*nuc* colônia 2.

Após a digestão e resolução em gel de agarose, o inserto da proteína SlpB e o vetor *pXY:sec* foram purificados utilizando o Kit illustra™ GFX PCR DNA e Gel Band Purification (GE). Para formação do plasmídeo pXYSEC:*slpB*, o inserto e o vetor de interesse já purificados, foram submetidos a reação de ligação com auxílio da enzima T4 ligase, que foi mantida 16°C durante 18 horas.

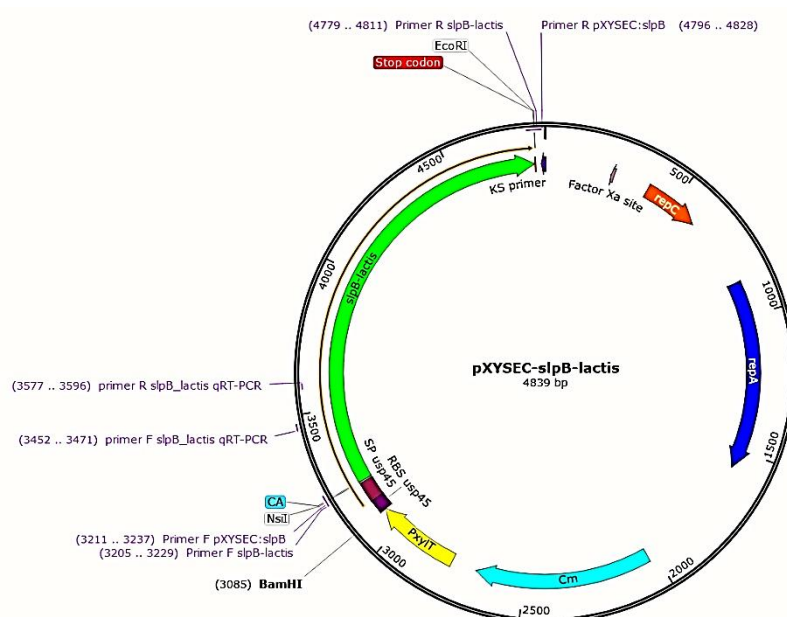


Figura 17 - Representação esquemática do vetor pXYSEC portando o inserto de interesse *slpB*.

5.3 Transformação da *E. coli* TOP 10

E. coli TOP 10 quimiocompetentes foram preparadas e transformadas através de choque térmico com o conteúdo de ligação do plasmídeo pXYSEC:*slpB*. Após a transformação todo o conteúdo foi plaqueado em meio LB ágar com Cm (10 µg/ml) para selecionar os clones transformados. As colônias resistentes foram isoladas, expandidas e o DNA plasmidial foi extraído para confirmação. Os clones obtidos foram submetidos ao ensaio de PCR para verificar a presença do inserto *SlpB* (FIG. 18).

A inserção do vetor de expressão recombinante (pXYSEC:*slpB*) também foi confirmada através do sequenciamento pelo método da terminação de cadeia, utilizando dideoxinucleotídeos marcados com fluorocromos, analisado no sequenciador automático 3500 Genetic Analyzer® 8-capillary (Applied Biosystems, EUA).

Após o sequenciamento, a sequência obtida foi analisada (dados não mostrados) com o auxílio do programa Bioedit Sequence Alignment Editor vs7.2.5 e da ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, NCBI).

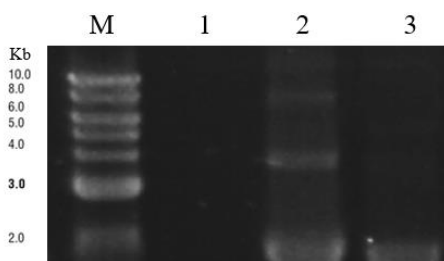


Figura 18 - Screening de colônias de bactérias *E. coli* TOP10 após a transformação com o plasmídeo de pXYSEC:slpB. Eletroforese em gel de agarose 1%. (M) Marcador de peso molecular de 1kb gene ruler; (1) Controle negativo da reação de PCR; (2) e (3) Fragmento amplificado por PCR correspondente ao gene slpB presente em diferentes colônias recombinantes.

5.4 Transformação da *Lactococcus lactis* NCDO 2118

Bactérias da linhagem *L. lactis* NCDO 2118 eletrocompetentes foram transformadas através de eletroporação com o DNA plasmidial pXYSEC:slpB extraído e confirmado da *E. coli* recombinante. Em seguida, foram seguidas as mesmas etapas da transformação anterior.

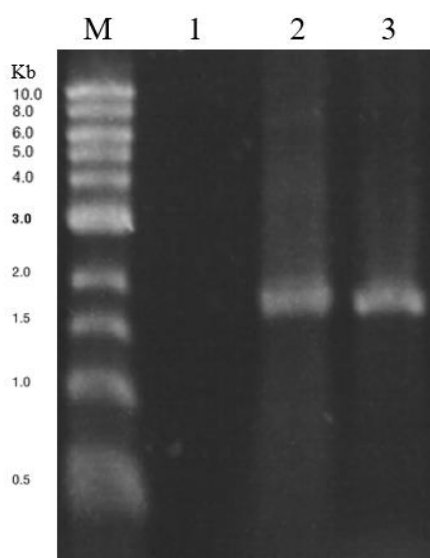


Figura 19 - Screening de colônias de bactérias *L. lactis* NCDO2118 após a transformação com o plasmídeo de pXYSEC:slpB. Eletroforese em gel de agarose 1%. (M) Marcador de peso molecular de 1kb gene ruler; (1) Controle negativo da reação de PCR;(2) e (3) Fragmento amplificado por PCR correspondente ao gene slpB presente em diferentes colônias recombinantes.

Após a transformação o todo o conteúdo foi plaqueado em meio M17 ágar com glicose (0,5%) e Cm (10 µg/ml) para selecionar os clones transformados. As colônias resistentes foram isoladas, expandidas e o DNA plasmidial foi extraído para confirmação. Os clones obtidos foram submetidos ao ensaio de PCR para verificar a presença do inserto SlpB (FIG. 19). O produto da PCR foi então submetido ao sequenciamento para a confirmação e o alinhamento de nucleotídeos pelo Blast apresentou 100% de homologia com a sequência otimizada. Desta forma, pode-se confirmar a inserção do gene *slpB* no vetor pXYSEC.

Além da confirmação através da do sequenciamento, o plasmídeo pXYSEC:*slpB* extraído da *L. lactis*, também passou pela digestão enzimática com as enzimas *NsiI* e *EcoRI*. O volume total da reação de digestão foi depositado e resolvido em gel de agarose à 1% e como observado na coluna 2 da Figura 20, é possível identificar a separação do DNA em dois fragmentos, um fragmento de 3251pb, que corresponde ao vetor pXYSEC e um segundo fragmento de 1588pb que condizem ao gene *slpB*.

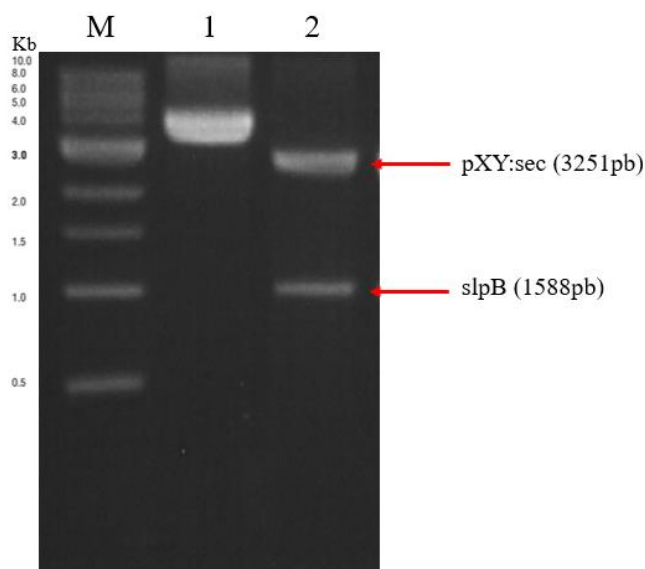


Figura 20 - Digestão dos plasmídeos pXYSEC:*slpB* extraídos bactérias *L. lactis* NCDO2118. Eletroforese em gel de agarose 1%. (M) Marcador de peso molecular de 1kb gene ruller; (1) Plasmídeo pXYSEC:*slpB*; (2) Plasmídeo pXYSEC:*slpB* digerido com *NsiI* e *EcoRI*.

5.5 Expressão da proteína SlpB

Para avaliar a expressão da proteína recombinante SlpB, a linhagem recombinante *L. lactis* NCDO 2118 pXYSEC:*slpB* foi cultivada em meio M17 com Cm (10 µg/mL), e o plasmídeo induzido com 1% de xilose. Após 24 horas de incubação, foram realizadas

as extrações das proteínas da superfície utilizando Cloreto de Guanidina, proteínas do sobrenadante e proteínas totais. O Cloreto de Guanidina é um forte agente caotrópico desnaturante de proteína, atua decompondo o desdobramento de proteínas e transformando-as em suas cadeias polipeptídicas originais, e foi utilizado para extrair as proteínas de superfície como descrito nos trabalhos de DO CARMO e colaboradores (2018) e MARÉCHAL e colaboradores (2014)

Para detectar a expressão da proteína SlpB em todas as frações, as amostras de proteínas do sobrenadante, da superfície e das proteínas totais, extraídas dos inócuos de *L. lactis* NCDO 2118 pXYSEC:*slpB* induzidos e não induzidos, foram separadas por gel SDS- PAGE (FIG. 21) e em seguida feito o Western Blot (FIG. 22). A membrana utilizada no WB foi marcada com anticorpo anti-*slpB*, purificados a partir de soros de coelho.

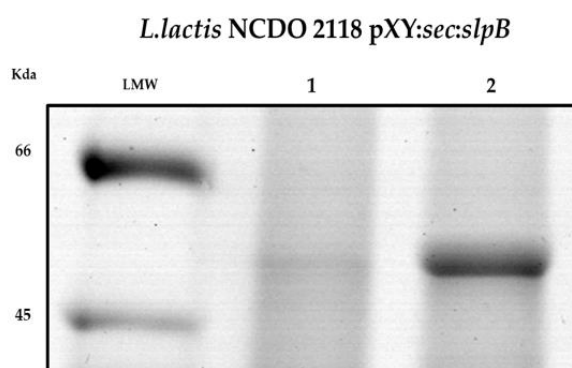


Figura 21 - Proteínas extraídas do sobrenadante. Coluna 1- *L. Lactis* NCDO2118 pXYSEC:*slpB* não induzido; Coluna 2 - *L. lactis* NCDO2118 pXYSEC:*slpB* induzida. Gel SDS PAGE 10% acrilamida, no sistema Mini PROTEAN II; 120 V-50 mA. Gel de coloração Biosafe (Biorad)

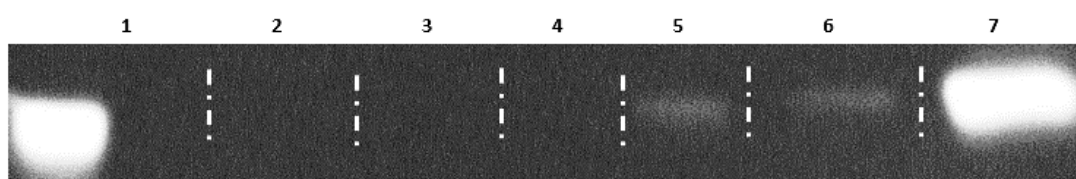


Figura 22 - Detecção da proteína SlpB por Western-Blot utilizando anti-*slpB*. 1- Controle positivo *Pf* 129. *L. lactis* pXYSEC:*slpB* não induzido: 2- Proteína total; 3- Proteína sobrenadante, 4- Proteínas de superfície (Extrato de Cloreto de Guanidina). *L. lactis* pXYSEC:*slpB* induzido: 5- Proteína total; 6- Proteína sobrenadante, 7- Proteínas de superfície (Extrato de Cloreto de Guanidina).

Após a revelação, como era esperado, foi possível observar uma expressão proeminente da proteína SlpB nas amostras extraídas a partir do inóculo induzido, utilizando Cloreto de Guanidina, que correspondente a extração realizada para obter as proteínas da superfície. O resultado encontrado na expressão das proteínas de superfície

foi semelhante ao controle positivo, onde foram utilizadas amostras de *P. freudenreichii* CIRM-BIA 129. Já com relação às proteínas totais e do sobrenadante, não foi possível observar uma expressão tão grande da proteína SlpB no inóculo induzido.

5.6 Avaliação *in vitro* de características probióticas

Como descrito na literatura, as proteínas de superfície podem conferir características fundamentais para a manutenção das funções probióticas de algumas bactérias. Dentre as principais características proporcionadas pela camada S, formada pelas proteínas de superfície, às bactérias podemos citar sua capacidade de atuar como uma capa protetora contra agentes ambientais hostis, como demonstrado na linhagem probiótica *Lactobacillus acidophilus* M92 que mostrou-se capaz de resistir aos processos que simulam as condições encontradas no trato gastrointestinal (KOS, B. *et al*, 2000). A camada S pode atuar também como uma adesina, favorecendo a adesão às células epiteliais humanas, como foi demonstrado na camada S formada pela proteína SlpA em *Lactobacillus brevis* (FRECE *et al.*, 2005). Além disso, a presença de Slp's pode também alterar propriedades físicas e químicas da superfície bacteriana, como demonstrou estudos de DO CARMO e colaboradores (2018), com a ausência da proteína SlpB em *P. freudenreichii* CIRM-BIA 129. Diante disso, conduzimos uma série de ensaios *in vitro*, afim de avaliar as propriedades da proteína de superfície SlpB expressa em *L. lactis* NCDO2118 e as possíveis alterações de suas características.

5.6.1 Curva de crescimento

O primeiro ensaio realizado averigou a cinética do crescimento das linhagens de *L. lactis* selvagem e recombinante, que foi monitorada através da leitura da D.O, com intervalos de uma hora, durante 48 horas. Na Figura 23 é possível observar uma grande semelhança entre o crescimento das linhagens de *L. lactis* NCDO2118 selvagem e recombinante quando cultivadas em meio suplementado com xilose, onde as linhagens apresentaram um tempo maior para chegar a fase estacionária, atingindo-a entre 15-18 horas. A mesma semelhança pode ser observada quando as linhagens foram cultivadas com glicose, entretanto, a fase estacionária foi atingida mais rapidamente, com aproximadamente 7-9 horas, após a incubação. Foi possível observar também um

crescimento inicial maior da linhagem recombinante quando comparado com a linhagem selvagem em meio com glicose.

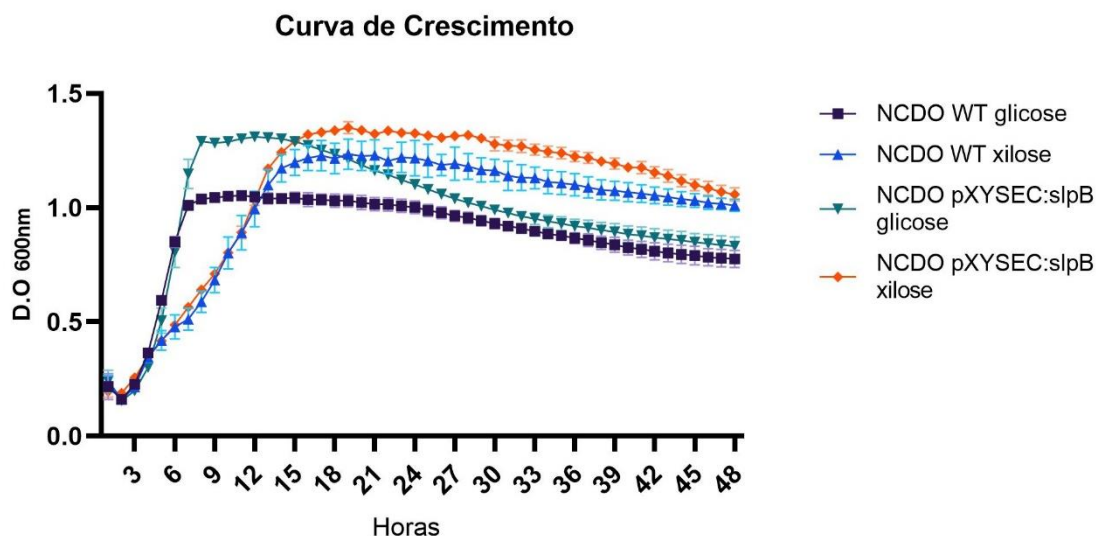


Figura 23 - Curvas de crescimento das bactérias *L. lactis* NCDO2118 WT, *L. lactis* pXYSEC:*nuc* e *L. lactis* pXYSEC:*slpB*. Amostras foram incubadas a 30°C em caldo M17 (Difco) suplementado com glicose ou xilose. Os testes Two-Way ANOVA e Tukey post-hoc foram usados para a comparação múltipla. Os asteriscos representam as diferenças estatísticas significativas, sendo, (**) referente a $p < 0,01$, (***) referente a $p < 0,001$ e (****) referente a $p < 0,0001$.

5.6.2 Taxa de sobrevivência após estresse ácido e sal biliar

As linhagens de *L. lactis* NCDO2118 WT, *L. lactis* pXYSEC:*nuc* e *L. lactis* pXYSEC:*slpB* foram submetidas a ensaios para avaliar tolerância aos estresses encontrados pela bactéria ao longo do trato gastrointestinal, sendo estes: o pH ácido estomacal (pH 2,0) (MCCONNELL; BASIT; MURDAN, 2008) e os sais biliares depositados no intestino delgado, sendo este composto principalmente por Colato de sódio e Desoxicolato de sódio (KIM; REN; DUNN, 1999). As bactérias foram desafiadas pelo período de 1 hora e o resultado foi expresso em taxa de sobrevivência (%) e pode ser visualizado na figura 24.

Os resultados obtidos após o estresse em ácido pH 2,0 (Figura 23 A) demonstram que a linhagem selvagem apresentou uma tolerância maior em relação às demais, e foi possível observar que devida a fonte preferencial de carbono da linhagem ser a glicose, o fato de a linhagem ser cultivada em xilose diminuiu sua tolerância de 86,73% para 75,11% ($p < 0,0001$). O mesmo pode ser observado na linhagem *L. lactis* pXYSEC:*nuc* que apresentou uma redução significativa quando cultivada em xilose ($p < 0,01$). Entretanto, a xilose presente no meio em que foi cultivada a linhagem *L. lactis*

pXYSEC:*slpB* demonstrou favorecer o aumento da UFC, de $2,03 \times 10^{-6}$ (linhagem não induzida) para $1,0 \times 10^{-7}$ (linhagem induzida com xilose), que poderia ser correlacionado com o crescimento da mesma, visto que sua presença é essencial para indução do plasmídeo e expressão da proteína. A linhagem recombinante induzida (74,27%) apresentou uma maior tolerância, ao estresse ácido, em relação à linhagem não induzida (67,13%), com uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$). Contudo, não foram encontradas diferenças estatísticas entre a taxa de sobrevivência da linhagem selvagem cultivada com xilose (75,11%) e a linhagem recombinante induzida. Este resultado corrobora com estudos que demonstram que *L. lactis* possui mecanismos que conferem resistência à ambientes ácidos, visto que as mesmas são capazes de produzir ácido láctico em sua fermentação, embora este seja um ácido fraco (OLIVEIRA *et al.*, 2017). O principal mecanismo de controle do pH intracelular é a F0F1-ATPase, que transloca prótons para o meio ambiente às custas de ATP e o segundo mecanismo é através da via da arginina desiminase (ADI), que permite que *L. lactis* neutralize seu ambiente através da produção de NH_3 (SANDERS; VENEMA; KOK, 1999).

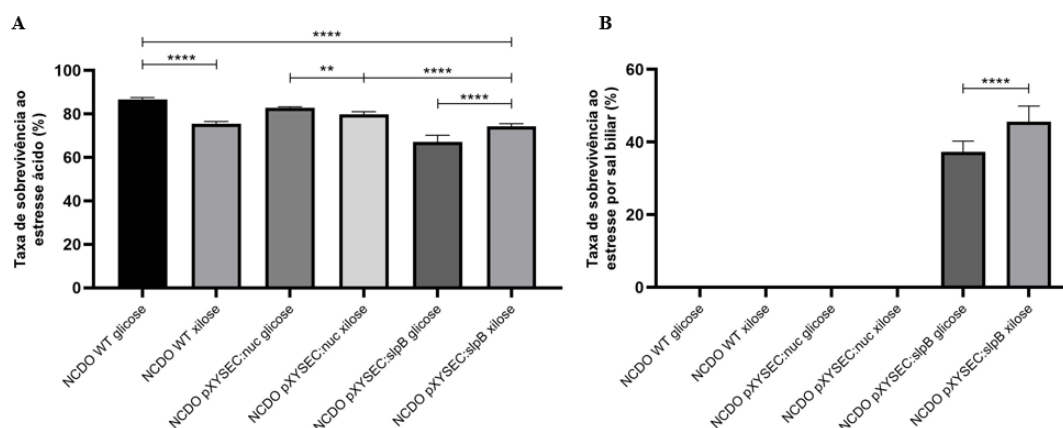


Figura 24 - Taxa de sobrevivência das linhagens de *L. lactis* NCDO2118 WT, *L. lactis* PXYSEC:nuc e *L. lactis* PXYSEC:slpB após estresse ao pH ácido (pH 2,0) (A) e aos sais biliares 0,5% (B). As amostras foram incubadas a 30°C em caldo M17 (Difco) suplementado com glicose ou xilose, após serem desafiadas por uma hora em M17 pH 2,0 e M17 + sal biliar 0,5%, respectivamente. Os testes One-Way ANOVA e Tukey post-hoc foram usados para a comparação múltipla. Os asteriscos representam as diferenças estatísticas significativas, sendo, (**) referente a $p < 0,01$, (***) referente a $p < 0,001$ e (****) referente a $p < 0,0001$.

De modo geral, todas linhagens apresentaram uma tolerância ao pH ácido considerada alta (>75%) ou moderada (40% a 75%). Em contra partida, ao serem desafiadas com um meio suplementado com sais biliares na concentração de 0,5% (Figura 24 B) foi possível observar melhor os resultados da expressão da proteína SlpB. A linhagem selvagem *L. lactis* NCDO2118 e a linhagem controle *L. lactis* NCDO2118

pXYSEC:*nuc* demonstraram-se altamente sensíveis aos sais biliares, não apresentando nenhum crescimento durante as 48 horas de observação. Podendo desta forma atribuir à produção da proteína Slp a tolerância de 45,61% apresentada pela linhagem *L. lactis* NCDO2118 pXYSEC:*slpB* induzida. Pode-se observar também que a expressão da proteína em níveis basais na linhagem recombinante não induzida foi capaz de conferir uma proteção ao estresse, apresentando uma tolerância de aproximadamente 37,28%. A grande susceptibilidade de *L. lactis* NCDO2118 aos sais biliares já havia sido descrita por Oliveira e colaboradores (2017), corroborando desta forma com os resultados obtidos neste ensaio.

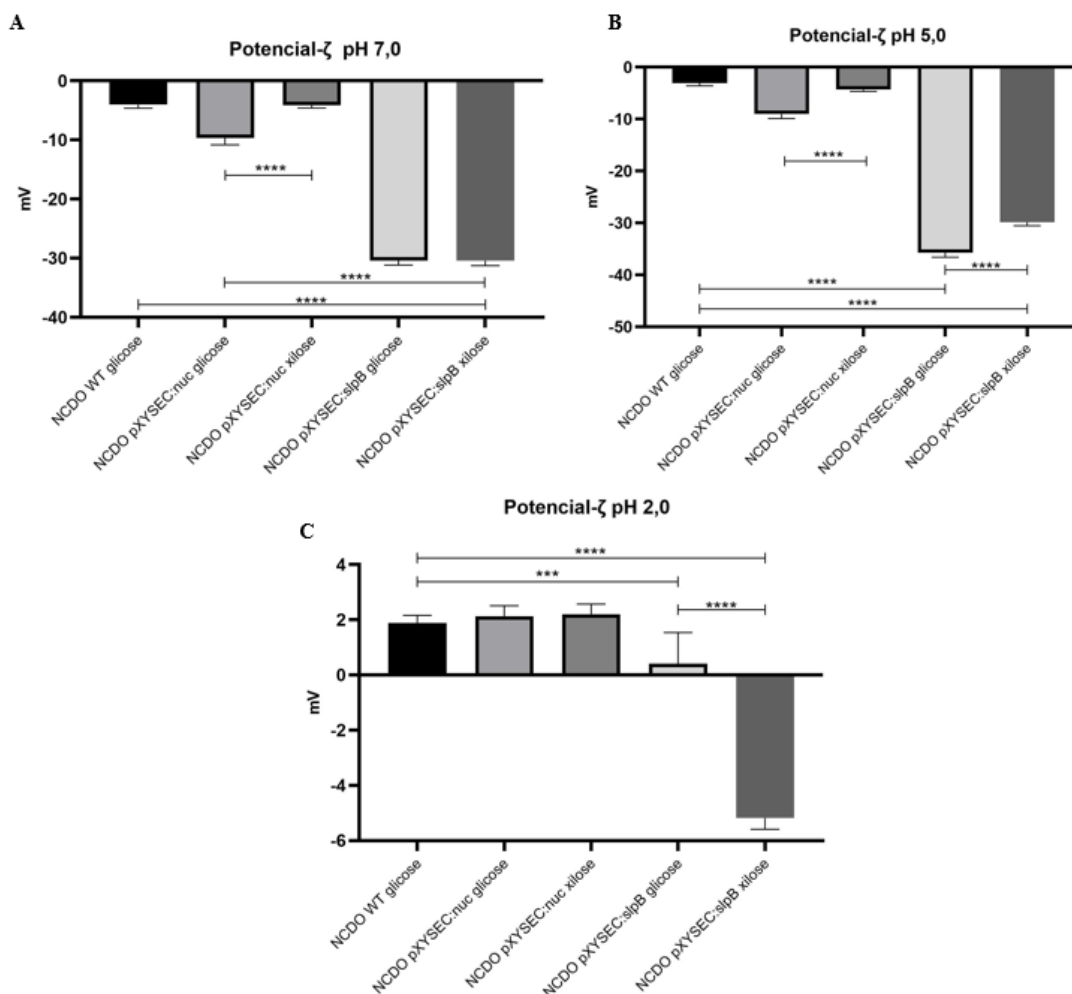
Os efeitos das proteínas de superfície sob estresse aos sais biliares pode ser observado também em *Lactobacillus plantarum*, que possui as proteínas mub e mapA em sua superfície, e apresentam um bom crescimento na presença de sal biliar 1% (RUIZ; MARGOLLES; SÁNCHEZ, 2013). Foram também observados estudos anteriores que a *L. lactis* apresentam uma alta sensibilidade aos sais biliares, mesmo quando utilizados em baixas concentrações (0,2%), como mostra o estudo de KIM e colaboradores (1999). A proteína SlpB também apresentou papel fundamental para a tolerância aos estresses ácidos e aos sais biliares de *P. freudenreichii*, onde, sem a expressão do gene da proteína, a linhagem apresentou maior vulnerabilidade aos estresses (DO CARMO *et al.*, 2018).

5.6.3 Análise do potencial zeta

As proteínas de superfície possuem um papel chave na adesão às células epiteliais intestinais, como citado anteriormente. Esta característica é um importante pré-requisito para a colonização de linhagens probióticas no trato gastrointestinal. Entretanto, devido à dificuldades envolvidas no estudo direto da adesão bacteriana *in vivo*, em humanos especialmente, levaram ao desenvolvimento de ensaios *in vitro* para avaliação de uma série de variáveis envolvidas na capacidade de adesão como: avaliação da eletronegatividade da superfície bacteriana, hidrofobicidade e capacidade de agregação (KOS *et al.*, 2003).

Performamos então o ensaio para avaliar o potencial zeta das amostras, afim de averiguar uma possível mudança de cargas causadas pela expressão da proteína SlpB. Este ensaio é capaz de refletir a taxa de mobilidade das células dentro de um campo

elétrico, onde um valor negativo mais baixo está supostamente relacionado a uma maior hidrofobicidade o que leva a uma melhor adesão (DE WOUTERS *et al.*, 2015).



lactis NCDO2118 WT, *L. lactis* PXYSEC:nuc e *L. lactis* PXYSEC:slpB ressuspensas em tampão KH_2PO_4 em três diferentes pH 7.0 (A), 5.0 (B) e 2.0 (C). Os testes One-Way ANOVA e Tukey post-hoc foram usados para a comparação múltipla. Os asteriscos representam as diferenças estatísticas significativas, sendo, (***) referente a $p = 0.001$ e (****) referente a $p > 0.0001$.

É possível observar com base nos gráficos da Figura 25 que os resultados obtidos com as amostras ressuspensas no tampão com pH 7,0 e 5,0 foram bastante semelhantes. Como esperado, devido à ausência de proteínas de superfície, a linhagem *L. lactis* NCDO2118 selvagem e a linhagem recombinante com o plasmídeo PXYSEC:nuc não apresentaram cargas negativas tão altas, sendo a média da linhagem selvagem -3,53mV e da linhagem *L. lactis* PXYSEC:nuc de -9,33mV quando não induzida e -4,22mV quando induzida, apresentando uma diferença estatística ($p < 0,0001$). Foi possível observar também que a expressão da proteína em níveis basais na linhagem recombinante não induzida foi capaz elevar a eletronegatividade da linhagem nas análises realizadas com pH 7,0 e pH 5,0. A linhagem *L. lactis* pXYSEC:slpB tanto induzida quanto não induzida,

apresentou uma grande diferença significativa ($p < 0,0001$) de carga das demais amostras, apresentando-se mais eletronegativas, com uma carga média de -30mV em pH 7,0. Já com a alteração do pH de 7,0 para 5,0, foi possível observar que houve um aumento da carga da linhagem *L. lactis* pXYSEC:*slpB* não induzida, aumentando sua carga média para $-35,7\text{mV}$, e assim, demonstrando uma diferença estatística ($p < 0,0001$) quando comparado com o resultado encontrado na linhagem induzida, que teve sua média mantida apesar da mudança pH.

Entretanto, quando avaliado o potencial das amostras em pH 2,0, onde naturalmente há uma diminuição da mobilidade das células dentro de um campo elétrico (WILSON *et al.*, 2001), a expressão apenas em níveis basais não foi capaz de manter a eletronegatividade de *L. lactis* NCDO2118 pXYSEC:*slpB* não induzida, e apenas a linhagem recombinante induzida diferenciou-se das demais ($p < 0,0001$), sendo a única a apresentar carga negativa de em média $-5,18\text{mV}$.

Este resultado demonstra que a proteína SlpB quando expressa em *L. lactis* NCDO2118 possui a capacidade de alterar o potencial elétrico de sua superfície, deixando-a eletronegativamente carregada, o que corrobora com estudos conduzidos por Do Carmo e colaboradores (2018) que evidenciam os efeitos da proteína SlpB no potencial zeta em *P. freudenreichii* WT e na linhagem mutante *knockout slpB*, demonstrando que a ausência da proteína SlpB, leva a um aumento do potencial zeta da linhagem, elevando a média de $-21,73\text{mV}$, da linhagem selvagem, para $-6,75\text{mV}$.

5.6.4 Análise da hidrofobicidade da superfície celular

Além da carga da superfície celular demonstrada pelo potencial zeta, foram também avaliadas as propriedades hidrofóbicas/hidrofilicas da superfície celular das linhagens, através da afinidade a hidrocarbonetos, utilizando o ensaio de Adesão Microbiana a Hidrocarbonetos (MATH). Propriedades hidrofóbicas e hidrofilicas juntamente com proteínas de superfície com características apolar podem ser correlacionadas com o processo de adesão (SANDES *et al.*, 2017; GUO *et al.*, 2010). Para determinar a hidrofobicidade das linhagens, foram utilizados neste trabalho três solventes: xilol, um solvente apolar; clorofórmio, um solvente monopolar ácido e acetato de etila, um solvente monopolar básico. Apenas a adesão ao xilol é indica a hidrofobia ou hidrofilia da superfície celular. Os outros dois solventes, clorofórmio e acetato de etila,

foram considerados como uma medida das características doador de elétrons (básico) e aceitador de elétrons (ácido) das bactérias, respectivamente (KOS *et al.*, 2003).

Os resultados apresentados na Figura 26 mostram que a linhagem recombinante induzida *L. lactis* NCDO2118 PXYSEC:*slpB* demonstrou uma grande afinidade ao solvente Clorofórmio, solvente ácido e aceitador de elétrons, com uma média de adesão de 92,5%. Esta média foi maior e estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) às médias dos grupos controles, onde em condições normais de cultivo, *L. lactis* selvagem suplementada com glicose, apresentou a média de adesão de 17% em Clorofórmio.

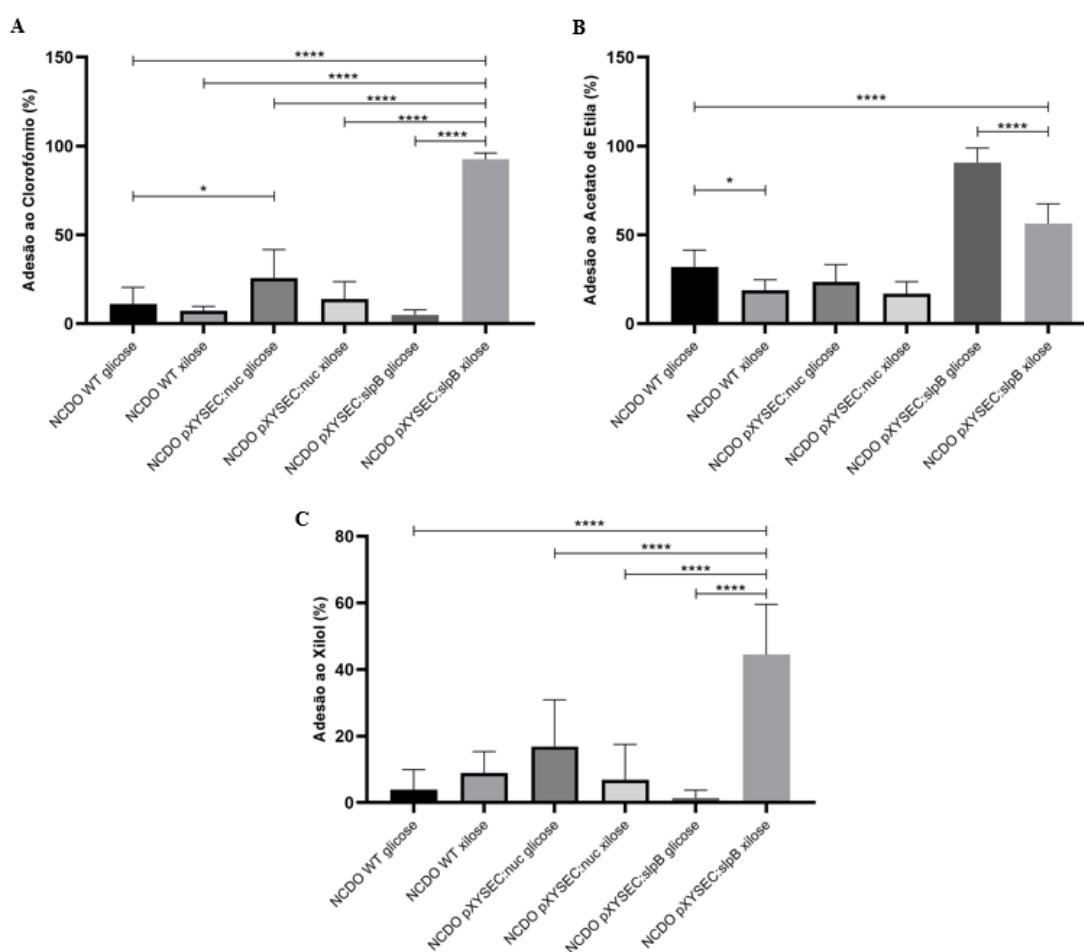


Figura 26 - Adesão microbiana a hidrocarbonetos (MATH), utilizando os solventes Clorofórmio (A), Acetato de etila (B) e Xilol (C). Os testes One-Way ANOVA e Tukey post-hoc foram usados para a comparação múltipla. Os asteriscos representam as diferenças estatísticas significativas, sendo, (*) referente a $p < 0.05$ e (****) referente a $p < 0.0001$.

Já os resultados encontrados com Acetato de Etila (FIG. 26 B), solvente básico e doador de elétrons, demonstraram que a linhagem recombinante *L. lactis* NCDO2118 PXYSEC:*slpB* não induzida apresenta mais afinidade ao solvente, com uma média de adesão de 91%. O mesmo acontece com a linhagem selvagem que apresentou uma média

de adesão de 32% quando cultivada em meio suplementado com glicose e 19% quando cultivada em meio suplementado com xilose.

A alta adesão da linhagem recombinante induzida ao clorofórmio confere característica básica à superfície celular. Em contrapartida, a linhagem selvagem *L. lactis* NCDO2118 WT e *L. lactis* pXYSEC:*slpB* não induzida apresentaram uma maior aderência ao solvente acetato de etila, o que confere a estas, característica ácida à superfície celular.

Por fim, o solvente xilol (FIG. 26 C) foi utilizado para acessar a hidrofobicidade da superfície celular das bactérias. A linhagem *L. lactis* NCDO2118 PXYSEC:*slpB* induzida demonstrou mais afinidade ao solvente que as demais linhagens, com uma média de adesão de 44,5%. Esta média foi maior e estatisticamente significantes ($p < 0,0001$) às médias dos grupos controles, onde *L. lactis* selvagem suplementada com glicose, apresentou a média de adesão de apenas 12%.

Desta forma, foi possível observar que a indução da proteína SlpB em *L. lactis* NCDO2118 ocasionou em uma mudança nas propriedades gerais da superfície celular, conferindo a linhagem uma capacidade maior de adesão ao xilol, de 44,5%, e características básicas. Este resultado é similar ao descrito por Do Carmo e colaboradores (2018), em que a linhagem *P. freudenreichii* WT apresentou uma média de 43,27% de adesão ao xilol, onde, essa capacidade de aderência foi atribuída à presença da proteína SlpB.

5.6.5 Análise da auto-agregação bacteriana

E finalmente, o último ensaio *in vitro* conduzido determinou a capacidade de auto-agregação das linhagens. A auto-agregação é uma propriedade importante para estimar o potencial probiótico, e desempenha um papel importante na adesão das bactérias às células epiteliais intestinais e na prevenção da colonização de patógenos (CHOI *et al.*, 2018). Na figura 27 é possível observar que, até as 6 horas de ensaio, as médias de agregação das linhagens não foram significantes estatisticamente, mantendo em uma média de aproximadamente 20%. A partir de 12 horas já é possível observar uma crescente diferença entre a linhagem com a proteína recombinante SlpB, que obtivera a média de 32,90% de auto-agregação quando crescida em glicose e 26,73% em xilose, em

relação à linhagem selvagem, com apenas 13,69% de agregação quando crescida em glicose e 15,39% em xilose.

Os efeitos da proteína SlpB puderam ser evidenciados após 24h de incubação, onde as médias de auto-agregação de *L. lactis* pXYSEC:slpB induzida e não foram superiores às medias de *L. lactis* pXYSEC:nuc e *L. lactis* NCDO2118 WT. *L. lactis* pXYSEC:slpB induzida apresentou uma média de 43% de agregação e a linhagem não induzida 49,39%, não havendo diferenças estatísticas entre elas. Seguido pela linhagem recombinante utilizada de controle *L. lactis* pXYSEC:nuc que obteve as médias de agregação de 40,46% quando não induzida e 36,05% quando induzida. Já em relação à linhagem selvagem, que obteve 29,14% de agregação quando crescida em glicose e 25,40% em xilose, podendo observar uma diferença significativa em relação à linhagem *L. lactis* NCDO2118 pXYSEC:slpB não induzida ($p < 0,0001$) e induzida ($p < 0,001$).

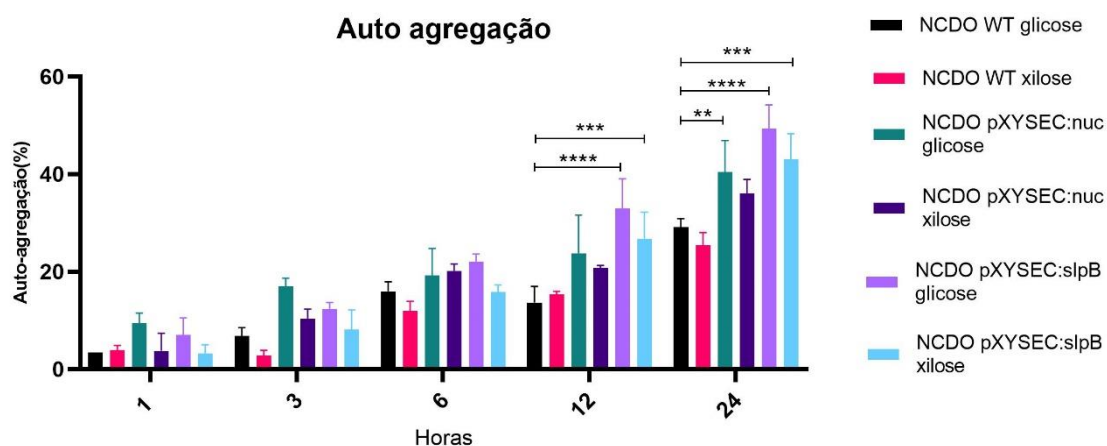


Figura 27 - Resultados do teste de auto-agregação bacteriana realizado com a *L. lactis* NCDO2118 WT, *L. lactis* PXYSEC:nuc e *L. lactis* PXYSEC:slpB. As amostras, resuspendidas em PBS 1x, foram avaliadas nos intervalos de 1,3, 6, 12 e 24 horas e os resultados expressos em % de agregação. Os testes Two-Way ANOVA e Tukey post-hoc foram usados para a comparação múltipla. Os asteriscos representam as diferenças estatísticas significativas, sendo, (**) referente a $p < 0,01$, (***) referente a $p < 0,001$ e (****) referente a $p < 0,0001$.

Assim como os resultados apresentados, níveis baixos de auto agregação de *L. lactis* já haviam sido descritos por ARMAS e colaboradores (2017). Desta forma, o aumento da capacidade de auto-agregação observada pode estar relacionada à camada S formada pela proteína SlpB na superfície celular, assim como KOS e colaboradores (2003) associam a capacidade de auto-agregação de *Lactobacillus acidophilus* M92 às proteínas presente em sua superfície.

Mudanças significativas puderam ser encontradas nas propriedades físicas e químicas da *L. lactis* NCDO2118 pXYSEC:slpB, como aumento do potencial de adesão,

através das elevadas cargas eletronegativas, elevado potencial hidrofóbico, característica básica da superfície celular e um aumento da capacidade de auto-agregação. Além de conferir a linhagem uma proteção ao estresse causado pelos sais biliares. Diante disso, a linhagem recombinante demonstrou aspectos promissores para o teste em modelos inflamatórios *in vivo*.

5.7 Avaliação dos efeitos da linhagem recombinante *L. lactis* NCDO2118 pXYSEC:*slpB* no modelo de colite induzida por DSS

A colite ulcerativa é uma doença inflamatória intestinal, e pode ser mimetizada em modelos *in vivo*, através da indução com substâncias químicas, como o DSS (WIRTZ *et al.*, 2017). A inflamação causada pela UC atinge as células epiteliais do cólon, o que resulta em um comprometimento da função de barreira da mucosa, além disso, a colite é marcada por sinais clínicos fáceis de serem observados, como perda de peso, diarreia e sangue oculto nas fezes (ZHANG; LI, 2014). Ainda não existe cura para a colite e as formas de tratamento conhecidas como, administração de anti-inflamatórios, imunossupressores, antibióticos ou cirurgias, que pode ocasionar em efeitos colaterais graves, como reações alérgicas, calafrios, febre, urticária e problemas hepáticos (CHIBBAR; DIELEMAN, 2015). Desta forma, o uso de probióticos com propriedades imunomoduladoras e antiinflamatórias têm sido propostos como ferramentas tanto para a prevenção quanto para o tratamento da DII (LUERCE *et al.*, 2014). Algumas linhagens de bactérias lácticas, como *L. lactis* NCDO2118 (LUERCE *et al.*, 2014) e propionibactérias lácteas, como *P. freudenreichii* CIRM-BIA 129 (RABAH *et al.*, 2020) já obtiveram resultados promissores no alívio dos sintomas da colite ulcerativa, tornando este, o modelo ideal para avaliar os efeitos da proteína de superfície SlpB.

5.7.1 Análise hídrica e alimentar e evolução do peso dos animais

Durante os 7 dias de experimento foram avaliados o consumo hídrico e alimentar dos animais e assim como a variação de peso.

Com relação ao peso dos animais é possível observar que ambos os tratamentos com *L. lactis* pXYSEC:*slpB* e o grupo controle *L. lactis* NCDO2118 WT foram capazes de evitar a perda de peso dos animais, entretanto, entre o 4 e o 6 dia de experimento, a linhagem recombinante apresentou resultados melhores no ganho de peso dos

camundongos, similar ao grupo *Naive*, que por sua vez manteve um ganho de peso exponencial durante os 7 dias. Já no grupo controle que recebeu apenas a solução de DSS é possível observar uma tendência a perda de peso a partir do 5º dia, chegando ao 7º dia com significativa ($p < 0,001$) perda de peso (Figura 28A e 28B).

Ao final dos 7 dias, apenas os animais do grupo DSS apresentaram perda de peso (Figura 28 B), mostrando que os tratamentos foram capazes de evitar a perda de peso dos animais.

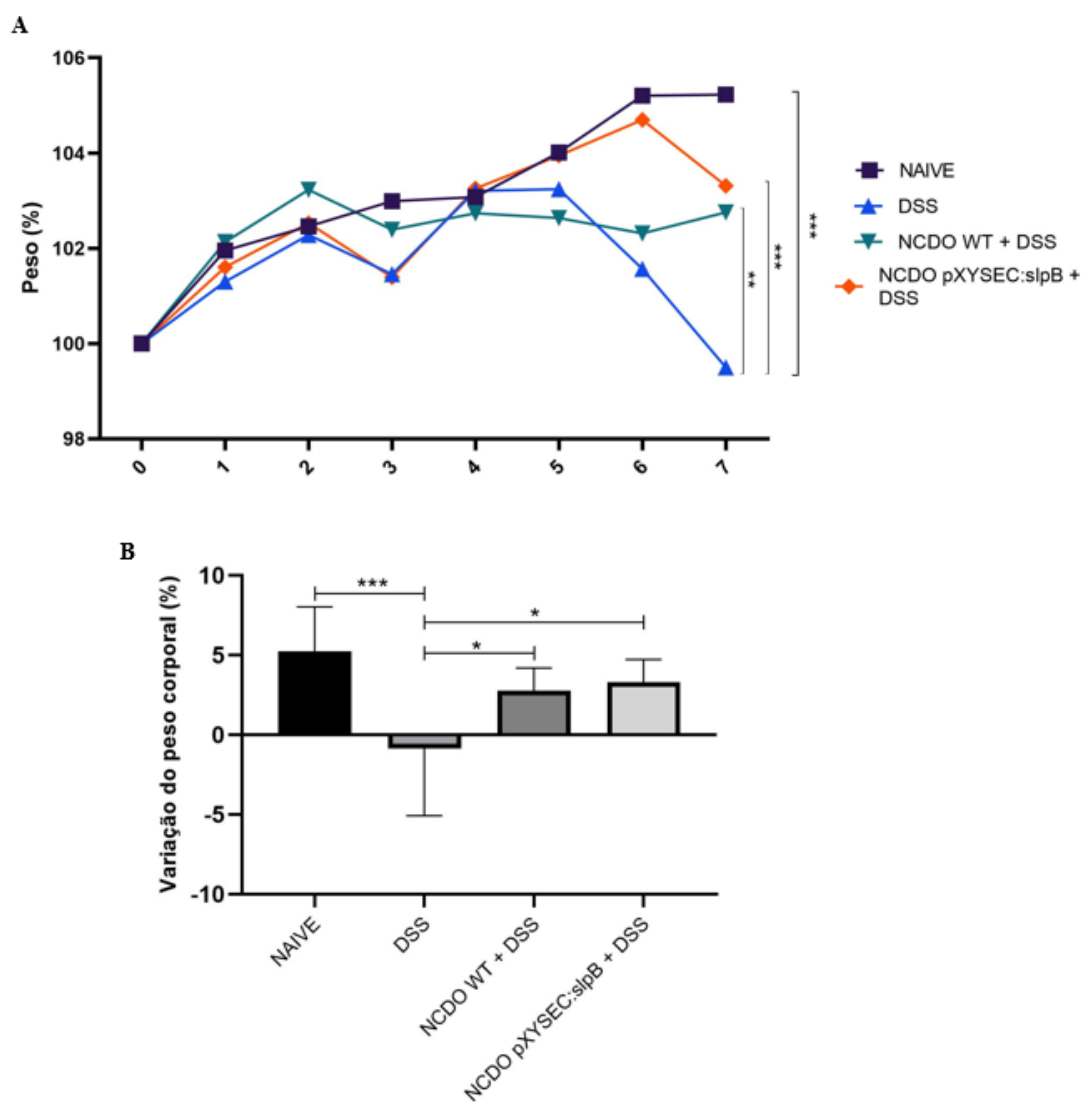


Figura 18 - Variação de peso corporal dos camundongos durante os 7 dias experimentais (A) e variação de peso corporal relacionando o primeiro ao último dia (B). Os testes Two-Way ANOVA (A), One-Way ANOVA (B) e Tukey post-hoc foram usados para a comparação múltipla ($n = 6-12$). Os asteriscos representam as diferenças estatísticas significativas, sendo, (*) referente a $p < 0,05$, (**) referente a $p < 0,01$ e (***) referente a $p < 0,001$.

A avaliação do consumo hídrico (Figura 29 A) demonstrou que os animais que consumiram a solução de DSS mantiveram a média de consumo durante todo o experimento, aproximadamente 5mL/dia por animal, sendo possível observar uma leve tendência a diminuição do grupo DSS a partir do 6 dia. Apenas o grupo *Naive*, sofreu pequenas alterações no consumo, variando entre dias que os animais apresentavam o consumo médio de 5 ml/dia com dias em que o consumo de água era maior.

Em relação ao consumo alimentar (Figura 29 B), durante os sete dias não houveram grandes variações entre os grupos *Naive*, e DSS, que mantiveram o consumo de ração constante. Já o grupo NCDO WT + DSS apresentou uma pequena variação do 6 para o sétimo dia, porém essa variação não refletiu em uma perda de peso dos animais. E o grupo NCDO pXYSEC:*slpB* + DSS apresentou um consumo menor nos 3 primeiros dias, igualando ao consumo dos grupos controles a partir do 4 dia.

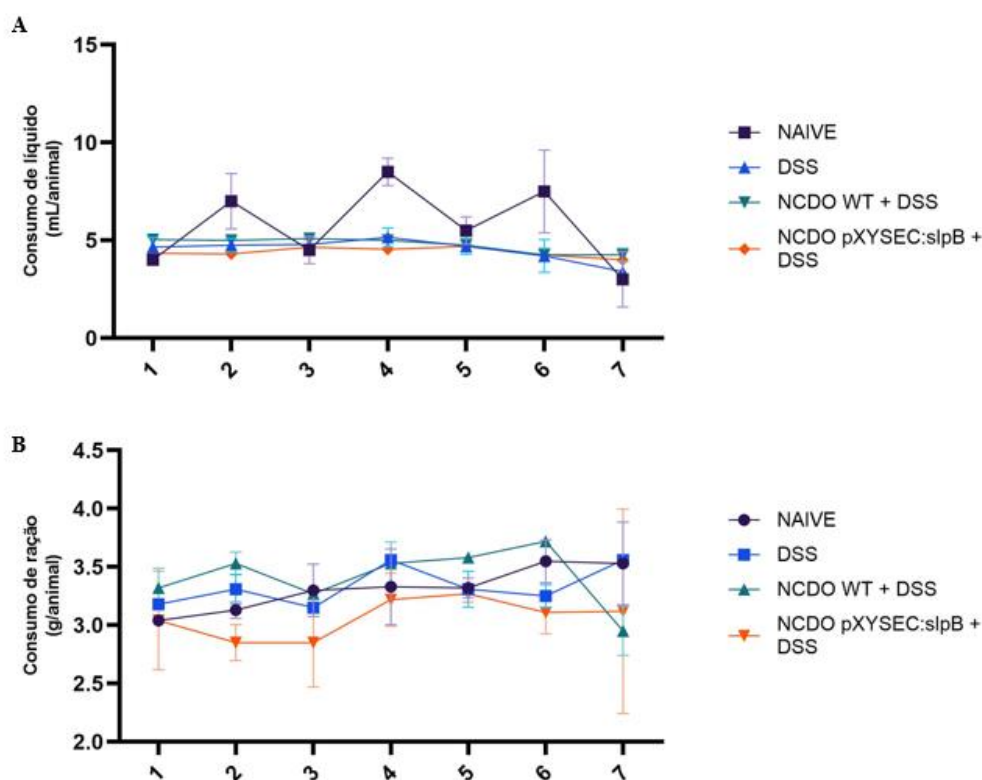


Figura 29 - Avaliação do consumo hídrico (A) e alimentar (B) durante os 7 dias experimentais (n = 6-12).

Os resultados apresentados corroboram com outros estudos descritos na literatura, que mostram que *L. lactis* NCDO2118, *P. freudenreichii* CIRM-BIA 129, assim como, a atuação de algumas proteínas de superfície de forma purificada, podem trazer um alívio

na perda de peso dos camundongos com colite ou em outros modelos de inflamação (RABAH *et al.*, 2020; DO CARMO *et al.*, 2020; CAI *et al.*, 2018; LUERCE *et al.*, 2014).

5.7.2 Índice de Atividade da Doença

A partir dos três principais sinais clínicos da colite, foi determinado o Índice de Atividade da Doença (DAI), entre o terceiro e o último dia do experimento. Na figura 30A é possível observar que os grupos que receberam DSS obtiveram um aumento similar e crescente do DAI até o 6 dia. Entretanto, do 6º para o 7º dia, os grupos DSS e NCDO WT + DSS mantiveram o aumento exponencial do DAI. Entretanto, pode ser observado uma tendencia na manutenção da pontuação do DAI nos camundongos que consumiram a linhagem NCDO pXYSEC:slpB + DSS.

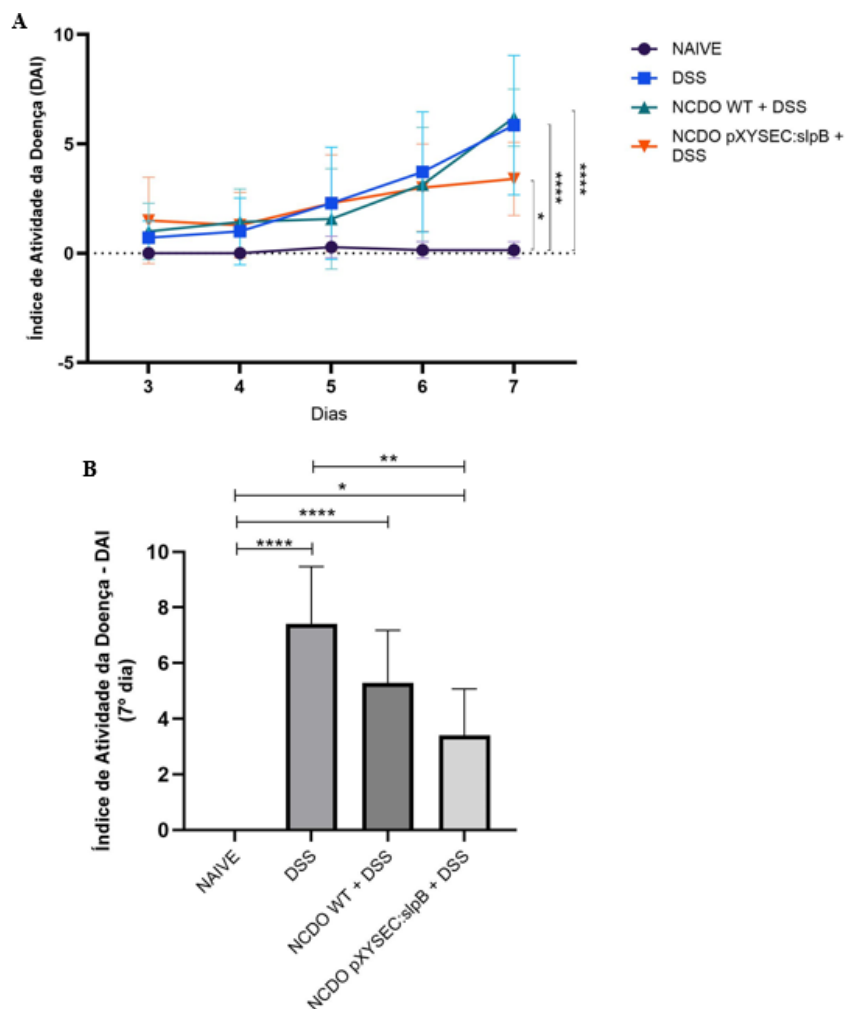


Figura 30 - Índice de Atividade da Doença durante os 7 dias experimentais (A) e Índice de Atividade da Doença do último dia (B). Os testes Two-Way ANOVA (A), One-Way ANOVA (B) e Tukey post-hoc foram usados para a comparação múltipla (n = 6-12). Os asteriscos representam as diferenças estatísticas significativas, sendo, (*) referente a $p < 0,05$ (**) referente a $p < 0,01$, (***) referente a $p < 0,001$ e (****) referente a $p < 0,0001$.

Com base nos resultados apresentados na figura 30 B, é possível observar que a linhagem recombinante NCDO pXYSEC:*slpB* + DSS foi capaz de amenizar os sinais da colite, quando comparado ao controle DSS ($p < 0,01$), sendo mais eficiente que a linhagem selvagem que apresentou uma tendência mas não obteve diferença estatística em relação ao grupo controle inflamado DSS.

5.7.3 Análise do comprimento do cólon

Através da avaliação do comprimento do cólon dos camundongos (Figura 31) foi possível observar que o tratamento com a linhagem recombinante NCDO pXYSEC:*slpB* + DSS foi eficaz e o comprimento do cólon dos animais desse grupo equipararam ao do grupo controle *Naive*, não havendo diferenças estatísticas entre os mesmos. Além disso, o tratamento com a linhagem recombinante demonstrou-se mais eficaz do que com a linhagem selvagem ($p < 0,05$), que por sua vez não apresentou melhoras em relação ao grupo inflamado DSS.

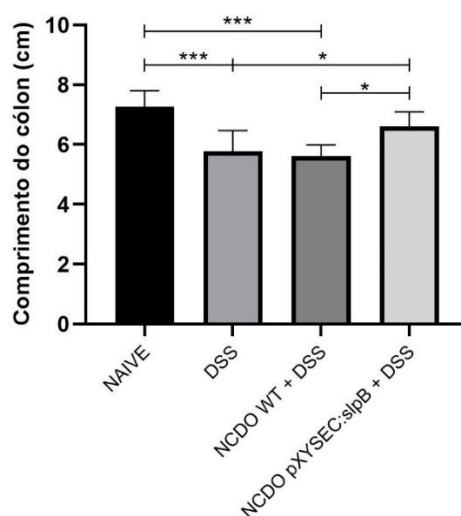


Figura 31 - Análise do comprimento do cólon. Os testes One-Way ANOVA e Tukey post-hoc foram usados para a comparação múltipla ($n = 6-12$). Os asteriscos representam as diferenças estatísticas significativas, sendo, (*) referente a $p < 0,05$ e (***) referente a $p < 0,001$.

A linhagem selvagem, assim como outras bactérias LAB, já havia sido obtido bons resultados no alívio dos sintomas clínicos da colite, como demonstram em estudos de Nishitani e colaboradores 2009 e Luerce e colaboradores (2014). Entretanto, pode-se atribuir à presença da proteína SlpB a melhora dos resultados, principalmente em relação ao comprimento do cólon, onde a linhagem selvagem sozinha não apresentou eficácia.

5.7.4 Análise histomorfológica

Através das análises histológicas foi possível avaliar os efeitos do DSS no tecido do cólon dos animais. O grupo controle *Naive* (FIG. 32 A) não apresentou danos proeminentes na estrutura do tecido, já os animais do grupo DSS (FIG. 32 B) apresentaram erosões e ulcerações na mucosa, além de profundo dano extensivo na parede do intestino e aumento da infiltração de células inflamatórias. Os animais que receberam a linhagem selvagem NCDO WT + DSS (FIG. 32 C) apresentaram uma leve diminuição nos danos à mucosa, mas ainda foram observadas algumas ulcerações e grande infiltrado de células inflamatórias. Já o tratamento com a linhagem NCDO pXYSEC:*slpB* + DSS (FIG. 32 D) demonstrou-se eficaz, amenizando os danos causados pelo DSS, apresentando a estrutura morfológica do cólon mais preservada, com menos pontos de lesões ao longo do tecido. Estes resultados tornam-se evidentes através da análise do escore histopatológico, demonstrado na figura 33, onde, dentre os grupos que consumiram a solução de DSS, o grupo tratado com NCDO pXYSEC:*slpB* apresentou o menor escore histopatológico (média de $3,14 \pm 0,37$), quando comparado ao grupo controle DSS ($5,0 \pm 0,6$, $p < 0,0001$) e também mostrou-se estatisticamente mais eficaz que o tratamento com NCDO WT que obteve uma média de $4 \pm 0,5$ ($p < 0,05$).

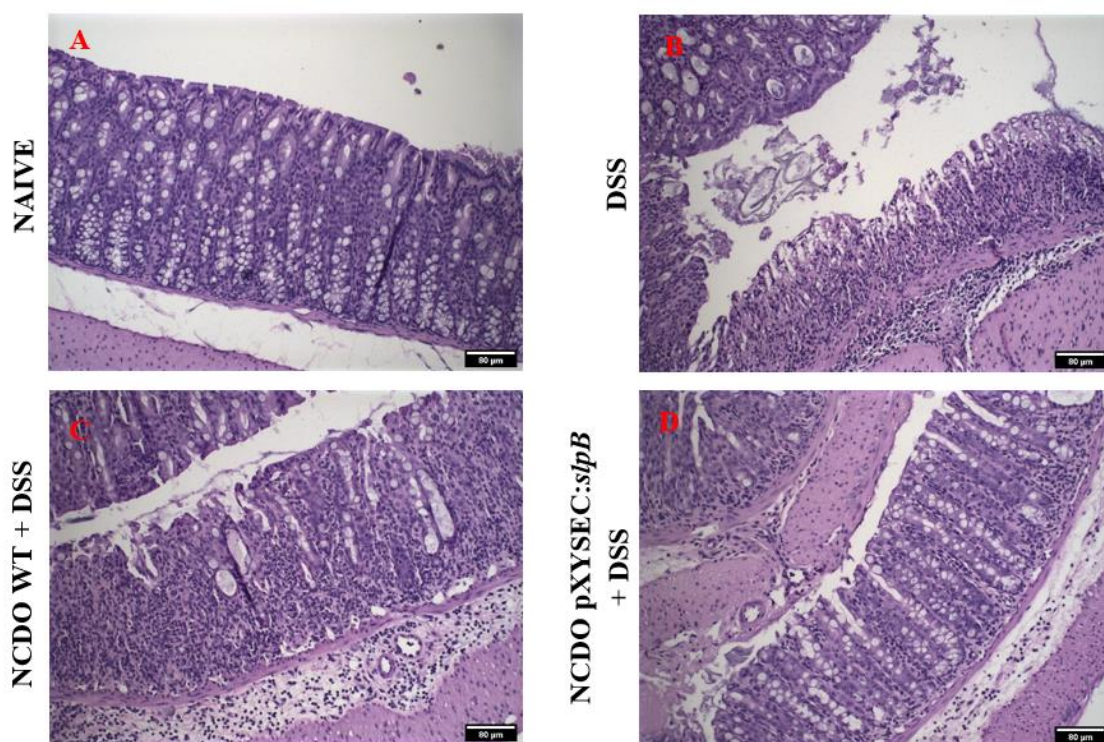


Figura 32 - Imagens das micrografias das análises histopatológicas do tecido do cólon, representados pelos grupos *Naive* (A), DSS (B), NCDO WT + DSS (C) e NCDO pXYSEC:*slpB* (D). As lâminas foram coradas em HE e analisadas sob o aumento de 20x (n = 6).

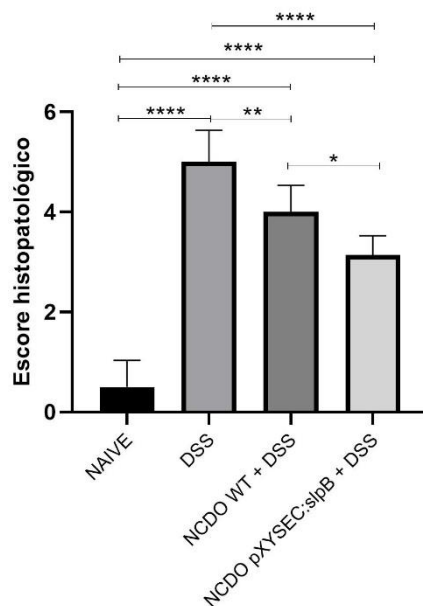


Figura 33 - Análise do escore histopatológico do tecido do cólon. As lâminas foram coradas em HE e analisadas sob o aumento de 20x. Os testes One-Way ANOVA e Tukey post-hoc foram usados para a comparação múltipla (n = 6). Os asteriscos representam as diferenças estatísticas significativas, sendo, (*) referente a $p < 0,05$ (**) referente a $p < 0,01$, (***) referente a $p < 0,001$ e (****) referente a $p < 0,0001$.

Desta forma, observou-se que apesar de *L. lactis* NCDO2118 WT ter obtido bons resultados diminuindo escore histopatológico, corroborando com os estudos de Luerce e colaboradores (2014), nossos resultados apontam que a presença da proteína SlpB pode estar associada a diferença encontrada do escore histopatológico, em relação ao grupo NCDO WT + DSS.

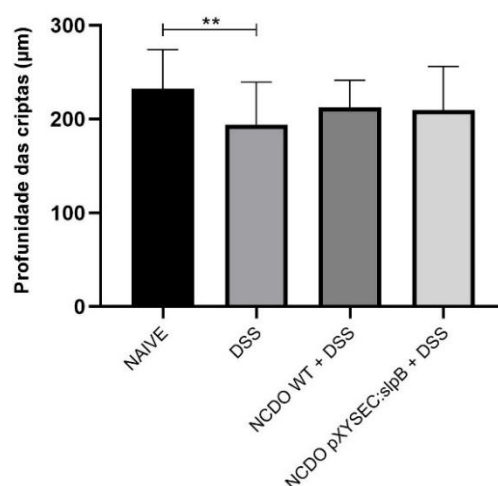


Figura 34 - Profundidade das criptas intestinais do cólon nos animais saudáveis e inflamados com DSS. As lâminas foram coradas em HE e analisadas sob o aumento de 20x. Os testes One-Way ANOVA e Tukey post-hoc foram usados para a comparação múltipla (n = 6). Os testes One-Way ANOVA e Tukey post-hoc foram usados para a comparação múltipla (n = 6). Os asteriscos representam as diferenças estatísticas significativas, sendo (**) referente a $p < 0,01$.

Foram avaliadas também a profundidade das Criptas de Lieberkühn (Figura 34), presentes no tecido do cólon, onde foi possível observar uma diferença estatística ($p < 0,01$) apenas entre os grupos controle *Naive* ($232,3 \pm 41,73$) e DSS ($191,1 \pm 45,4$). Já os grupos tratamento, NCDO WT + DSS e NCDO pXYSEC:*slpB* + DSS, apresentaram uma média de $212,5 \pm 28,91$ e $209,7 \pm 46,30$, respectivamente, não demonstrando diferenças estatísticas em relação aos demais grupos.

E o último parâmetro histológico analisado foi o número de células caliciformes. A preservação das células caliciformes é um importante aspecto dos mecanismos de ação probióticos, devida sua produção de muco, que serve como uma barreira impedir a adesão direta de microrganismos ao epitélio (ABRANTES *et al.*, 2020). Através da técnica de coloração PAS foi possível observar a integridade das células (células coradas em tons rosa-arroxeados) e contabiliza-las.

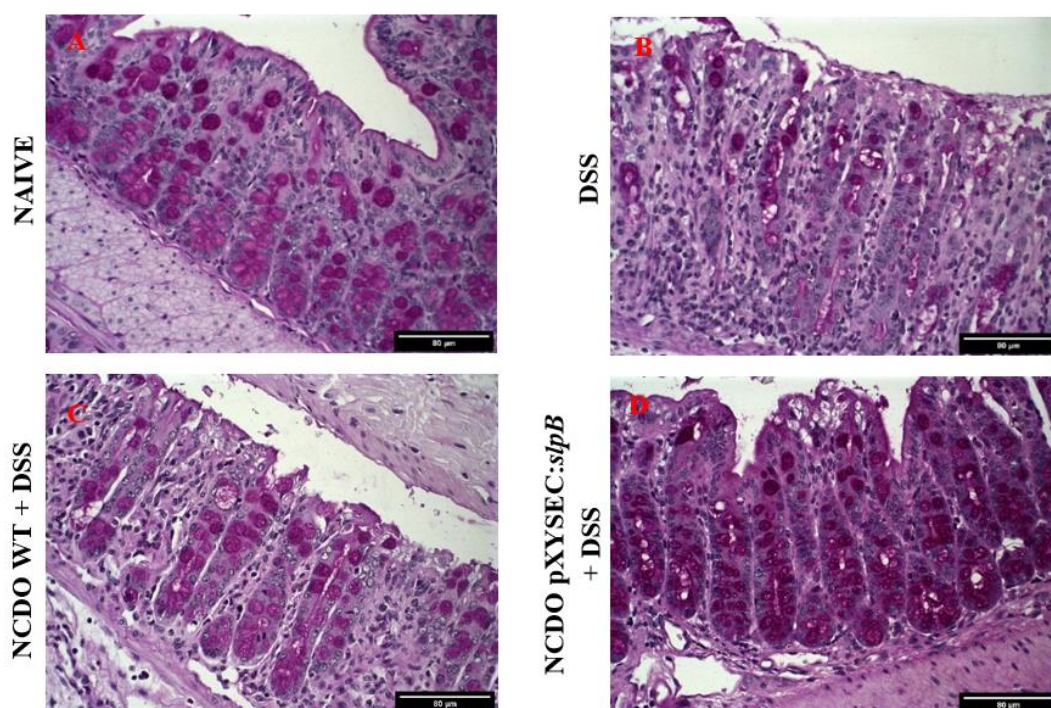


Figura 35 - Imagens das micrografias para análise de células caliciformes no tecido do cólon, representados pelos grupos *Naive* (A), DSS (B), NCDO WT + DSS (C) e NCDO pXYSEC:*slpB* (D). As lâminas foram coradas em PAS, células caliciformes apresentam tons rosa-arroxeados intensos, e analisadas sob o aumento de 40x (n = 6).

É possível observar nas imagens da Figura 35 que o grupo controle *Naive* apresenta células maiores, em maior quantidade e com coloração intensa, contabilizando uma média de $133,1 \pm 14,62$ células por campo (Figura 36), já o grupo controle inflamado DSS apresenta células menores, em menor quantidade ($67,08 \pm 17,85$) e em alguns casos,

já sem coloração, demonstrando sinais de degeneração. Em relação aos tratamentos utilizados, é possível observar um aumento estatístico no número de células caliciformes no grupo tratado com NCDO pXYSEC:*slpB* ($99,90 \pm 20,51$) quando comparado ao grupo DSS ($p < 0,05$). Já o tratamento com a linhagem selvagem, apesar de observada uma tendência no aumento de células caliciformes ($90,20 \pm 6,64$), demonstrou-se menos eficaz, não havendo diferença estatística em relação do grupo DSS.

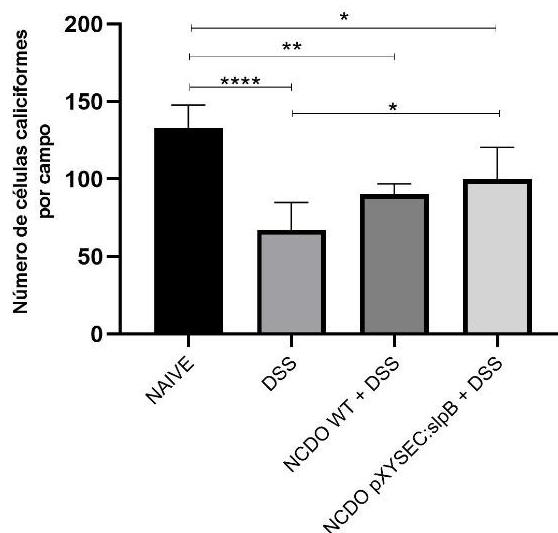


Figura 36 - Quantificação de células caliciformes por campo. As lâminas foram coradas em PAS e analisadas sob o aumento de 40x. Os testes One-Way ANOVA e Tukey post-hoc foram usados para a comparação múltipla ($n = 6$). Os asteriscos representam as diferenças estatísticas significativas, sendo (*) referente a $p < 0,05$ (**) referente a $p < 0,01$ e (****) referente a $p < 0,0001$.

5.7.5 Quantificação das enzimas mieloperoxidase e peroxidase eosinofílica

A pontuação do escore histopatológico foi definida através da avaliação microscópica com base em dois aspectos: a gravidade dos danos do tecido e o acúmulo do infiltrado de células inflamatórias (WIRTZ *et al.*, 2017). Visivelmente o infiltrado de células inflamatórias demonstrou-se atenuado no grupo tratado com *L. lactis* NCDO2118 WT e ainda menor nos animais tratados com *L. lactis* NCDO2118 pXYSEC:*slpB*. O infiltrado de células inflamatórias é composto por células mononucleares e polimorfonucleares, e na colite ulcerativa, é possível encontrar aumentados os níveis de neutrófilos e eosinófilos, principalmente (VILLANACCI *et al.*, 2013). Desta forma, quantificamos as enzimas mieloperoxidase (MPO) e peroxidase eosinofílica (EPO), como forma de determinação indireta de neutrófilos e eosinófilos, respectivamente, no cólon dos animais

Ambos os tratamentos utilizados, NCDO WT e NCDO pXYSEC:*slpB*, demonstraram grande eficácia em relação à quantidade de enzimas MPO quantificadas (Figura 37 A), seguido pelas médias de $57,27 \pm 48,43$ e $17,50 \pm 6,65$, respectivamente, com diferenças estatisticamente significativas para ambos tratamentos em relação ao grupo controle DSS ($232,7 \pm 115,9$, $p < 0,0001$).

O mesmo cenário foi encontrado quando quantificadas a enzima EPO (Figura 37 B), onde ambos os tratamentos utilizados, NCDO WT e NCDO pXYSEC:*slpB*, demonstraram grande eficácia, seguido pelas médias de absorbância $0,07 \pm 0,05$ e $0,04 \pm 0,04$, respectivamente, apresentando diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo DSS ($0,28 \pm 0,10$, $p < 0,0001$).

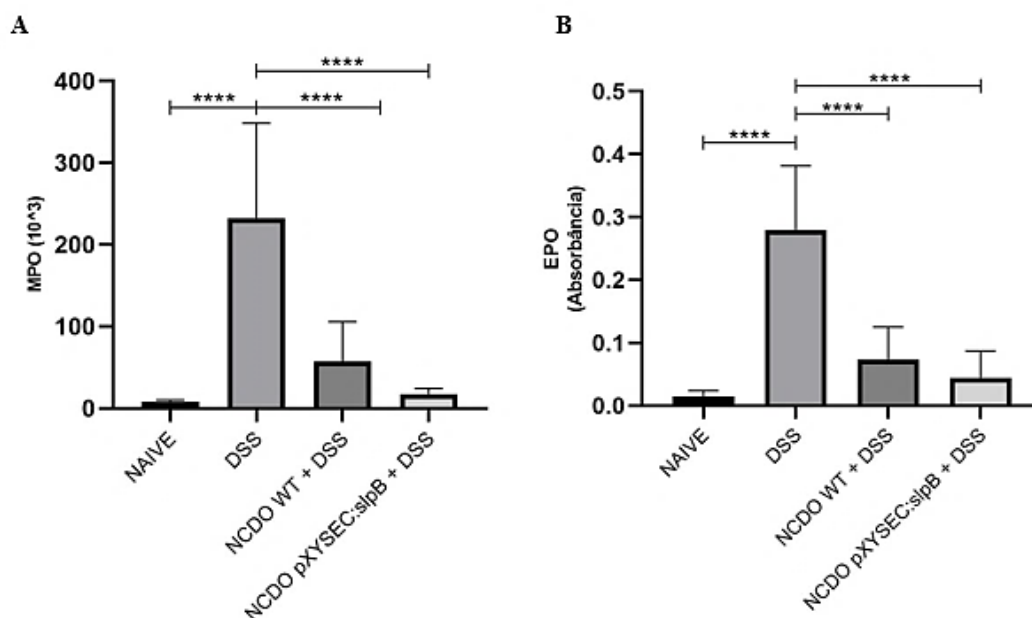


Figura 27 - Quantificação das enzimas mieloperoxidase (MPO) (A) e peroxidase eosinofílica (EPO) (B) no tecido do cólon. Os testes One-Way ANOVA e Tukey post-hoc foram usados para a comparação múltipla ($n = 6$). Os asteriscos representam as diferenças estatísticas significativas, sendo (****) referente a $p < 0,0001$.

Os resultados obtidos na quantificação das enzimas MPO e EPO neste trabalho, corroboram com os descritos por HAN e colaboradores (2021), onde o grupo DSS apresentou uma grande quantidade das enzimas no cólon. Com base nos resultados dos grupos tratados, observou-se que o tratamento com *L. lactis* NCDO2118 foi capaz de diminuir a infiltração de neutrófilos e de eosinófilos no cólon.

5.7.6 Quantificação da secreção de imunoglobulina A (sIgA) no intestino delgado

Altos níveis de sIgA podem ser encontrados na camada de muco do intestino em indivíduos saudáveis (ROGIER *et al.*, 2014), entretendo, o aumento da secreção de IgA pode ser relacionada a uma resposta inflamatória causada por distúrbios na barreira intestinal do ílio, como demonstrado nos resultados de Rabah e colaboradores (2020).

Os resultados apresentados na figura 38 demonstram níveis mais elevados de IgA secretora no grupo controle inflamado DSS ($91,30 \pm 40,93$). Já os grupos que receberam tratamento NCDO WT ($63,54 \pm 17,17$) e NCDO pXYSEC:*slpB* ($59,44 \pm 26,85$), apresentaram uma média similar ao grupo controle *Naive* ($62,81 \pm 28,17$). Entretanto, não houveram diferenças estatísticas ($p < 0,05$) entre os grupos avaliados.

Desta forma, foi possível observar que apenas o grupo DSS apresentou níveis elevados de sIgA, mas não foram encontradas diferenças que pudessem ser relacionadas aos efeitos da proteína SlpB neste aspecto, corroborando com os resultados de Do Carmo e colaboradores (2020).

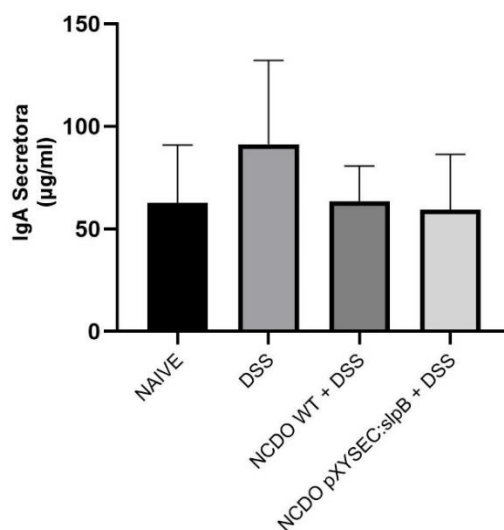


Figura 38 - Concentração de IgA secretória no intestino delgado. Os testes One-Way ANOVA e Tukey post-hoc foram usados para a comparação múltipla (n = 6-12).

5.7.7 Modulação da expressão de genes implicados na resposta imunomodulatória e barreira epitelial no cólon

Considerando as alterações observadas nas análises histológicas e macroscópicas ocasionadas pela expressão da proteína SlpB em *L. lactis* NCDO2118, foram também

avaliadas as alterações nos níveis de expressão gênica do cólon e a presença de citocinas pró e anti-inflamatórias no tecido. Foram avaliadas a expressão de genes de relacionamos à produção de mucina no intestino (*mucina 2*), genes relacionados à integridade da barreira epitelial (*zonula occludens-1*, *zonula occludens-2*, *claudina 1*, *claudina 5 e ocludina*), ao estresse oxidativo (*inos* - enzima óxido nítrico sintase induzível), genes de citocinas pró e anti-inflamatórias (*IL-10*, *TGFβ*, *INFg*, *IL-1b*, *IL-12*, *IL-6*, *IL-17* e *TNFα*), e por fim, foram avaliadas também a expressão do gene *homx1* codificador da enzima heme oxigenase 1, um importante gene com potencial imunomodulador que associado a produção de IL-10, contribuem para desenvolvimento de DII e a expressão do gene *ppary* (proliferadores de peroxissoma tipo gama), responsável pela a adipogênese e melhora da resistência à insulina, mas atua ativamente na colite regulando negativamente a expressão gênica de genes pró-inflamatórios.

Com base nos resultados demonstrados na Figura 39, é possível observar que a linhagem recombinante NCDO pXYSEC:*slpB* foi capaz de aumentar a expressão dos gene *muc2* (Figura 39 A), codificador da proteína Mucina 2, secretada pelas células caliciformes (MCINTIRE *et al.*, 2011), apresentando diferenças estatísticas aos grupos controle DSS e NCDO WT + DSS ($p < 0,001$) e *Naive* ($p < 0,05$). Este resultado sustenta também os resultados encontrados na contagem células caliciformes já descrita anteriormente neste trabalho, devido ao fato destas células serem as principais produtoras de mucina no intestino.

A preservação do epitélio demonstrado na histologia dos animais que receberam a linhagem recombinante, capaz de expressar a proteína SlpB, também pode ser observada através do aumento da expressão dos genes *zo-1*, *cld-1*, *cld-5* e *ocln* responsáveis pela expressão de proteínas de junção (*tight junctions proteins*), pela manutenção da função de barreira epitelial e controle da permeabilidade celular (LANDY *et al.*, 2016). Com relação à expressão de mRNA dos genes codificadores de proteínas da barreira epitelial, apenas não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos no gene *zo-2* (Figura 39 C). Já para *zo-1*, *cln-1* e *cln-5* (Figuras 39B, 39D e 39E) o tratamento linhagem recombinante NCDO pXYSEC:*slpB* também apresentou níveis mais elevados de expressão destes genes, do que os grupos controle, que não apresentaram entre si diferenças estatísticas ($p < 0,05$). Já o gene *ocln* (Figura HF), apresentou diferença entre o grupo controle *Naive* em comparação ao grupo DSS ($p < 0,05$) e NCDO WT + DSS ($p < 0,001$), não apresentando diferenças estatísticas ao grupo NCDO pXYSEC:*slpB*. Este

por sua vez, demonstrou alterações estatísticas ($p < 0,01$) apenas com o grupo tratado com a linhagem selvagem. A partir destes resultados, pode-se propor que a proteína SlpB apresenta um papel central para reforçar a barreira epitelial, mas ainda são necessários mais estudos, como a permeabilidade intestinal, para concluir esta afirmação.

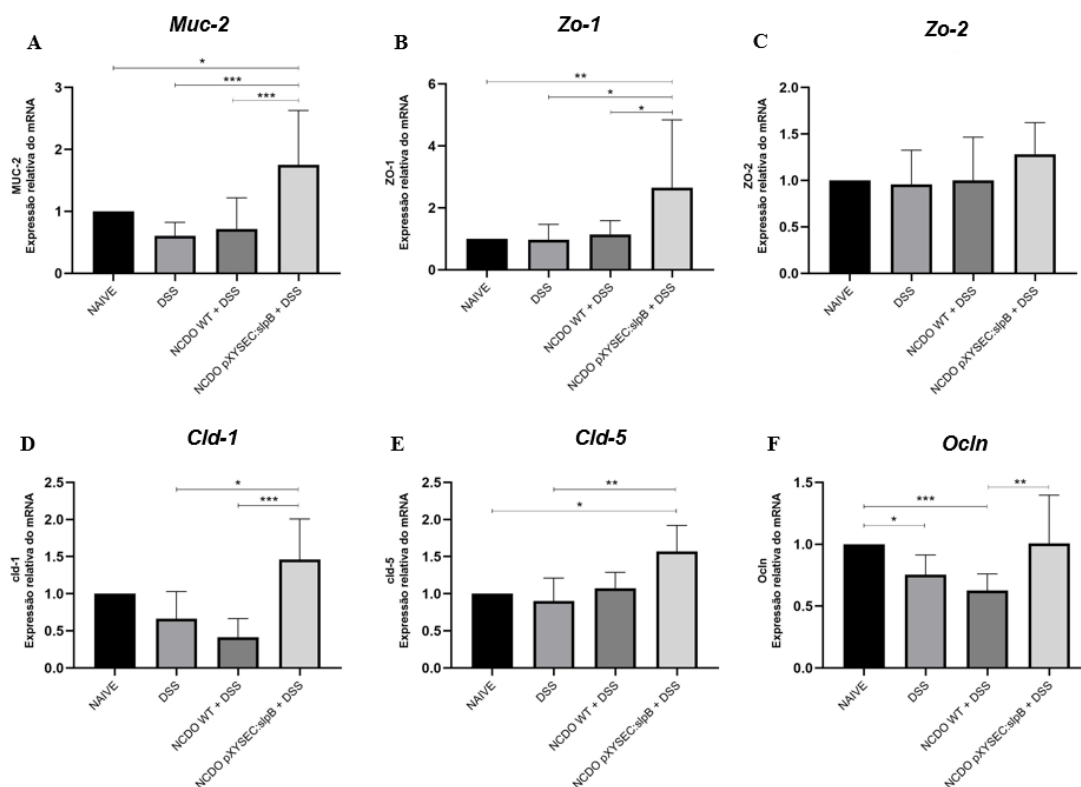


Figura 39 - Análise da expressão gênica de *muc2* (A), *zo-1* (B), *zo-2* (C), *cln-1* (D), *cln-5* (E), *ocln* (F). Os testes One-Way ANOVA e Tukey post-hoc foram usados para a comparação múltipla ($n = 6$). Os asteriscos representam as diferenças estatísticas significativas, sendo (*) referente a $p < 0,05$ (**), referente a $p < 0,01$ e (****) referente a $p < 0,0001$.

Entre as citocinas avaliadas não foram encontradas mudanças significativas ($p < 0,05$) em relação à expressão dos genes: *TGF β* , *INF γ* , *TNF α* e *IL-1 β* (Figuras 40 A, C, D e G). Já os resultados de *IL-17* (Figura 40 E) demonstram um aumento, estatisticamente significativo, da expressão no grupo DSS em relação aos grupos *Naive* ($p < 0,05$), NCDO WT + DSS ($p < 0,05$) e NCDO pXYSEC:*slpB* ($p < 0,01$). Quanto a expressão da citocina *IL-12* (Figura 40 H), foi possível observar aumento significativo apenas no grupo NCDO WT + DSS. Em contra partida, foi possível observar um aumento nos níveis de expressão de *IL-6* (Figura 40 F) de NCDO pXYSEC:*slpB*, apresentando resultados estatisticamente diferentes aos grupos controle *Naive* ($p < 0,01$) e DSS ($p < 0,05$). Finalmente, a citocina anti-inflamatória *IL-10* (Figura 40 B), onde o grupo controle DSS

apresentou níveis mais baixos de expressão gênica quando comparados aos grupos *Naive* ($p < 0,01$), NCDO WT + DSS ($p < 0,01$) e NCDO pXYSEC:*slpB* ($p < 0,001$).

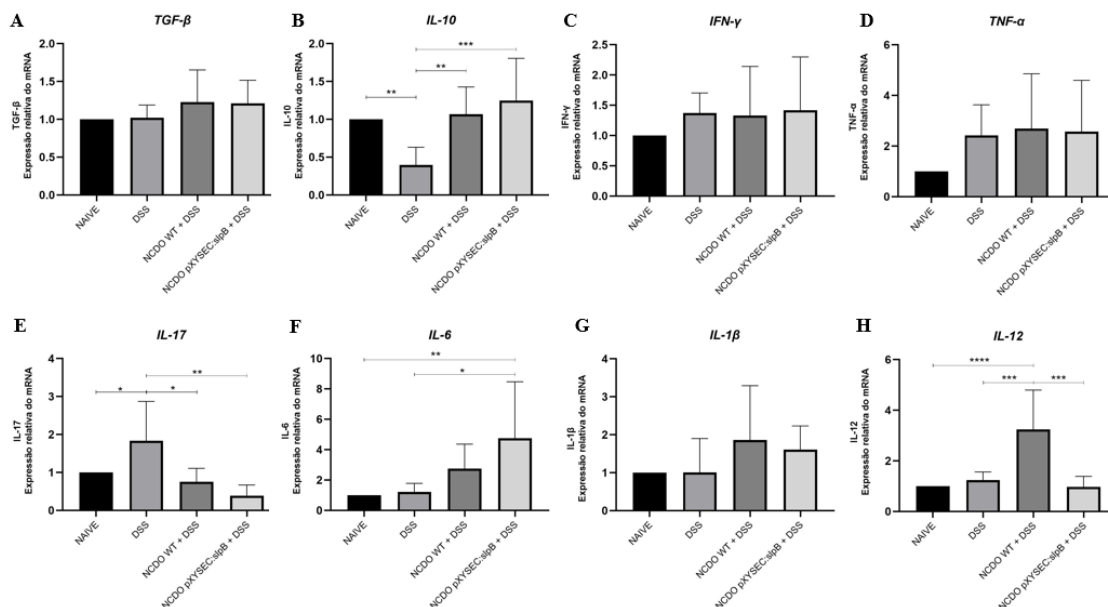


Figura 40 Análise da expressão gênica de *TGFβ* (A), *IL-10* (B), *INFγ* (C), *TNFα* (D), *IL-17* (E), *IL-6* (F), *IL-1β* (G), *IL-12* (H). Os testes One-Way ANOVA e Tukey post-hoc foram usados para a comparação múltipla ($n = 6$). Os asteriscos representam as diferenças estatísticas significativas, sendo (*) referente a $p < 0,05$, (**) referente a $p < 0,01$ e (***) referente a $p < 0,0001$.

A linhagem *P. freudenreichii* CIRM-BIA 129 portadora da proteína SlpB havia demonstrado anteriormente em modelo de colite induzido por TNBS uma diminuição dos níveis de expressão do mRNA de *Il6*, *TNFα*, *Il1b*, *Il10* e *hmoX* e a manutenção dos genes *zo1*, *pparg* e *IFNg*, reprimidos pelo TNBS (PLÉ *et al.*, 2016).

Através da observação dos resultados, o mecanismo de ação da proteína SlpB aparenta estar voltado para a limitação do processo inflamatório, contendo principalmente IL-17, via regulação das células Th17. Colliou e colaboradores (2017) demonstraram que as propionibactérias enriquecem a microbiota de bebês através da amamentação são capazes de atenuar a incidência de enterocolite necrosante, através da regulação de células Th17.

O estresse oxidativo ocasionado pelo acúmulo de óxido nítrico mediado ativação do gene *inos* (FIG. 41 A) está diretamente ligado à imunopatia gastrointestinal, como a colite ulcerativa (KOLIOS; VALATAS; WARD, 2004). Assim como nos resultados obtidos na avaliação do gene *inos* no trabalho de Rabah e colaboradores (2020), a colite induzida por DSS acarretou num aumento significativo da expressão de óxido nítrico

sintase (*inos*), comparados aos grupos *Naive* ($p < 0,01$), NCDO WT + DSS ($p < 0,05$) e NCDO pXYSEC:*slpB* ($p < 0,05$).

Tratando do gene *hmox1* (FIG. 41 C), foi possível observar maiores níveis de expressão gênica no grupo de animais tratado com NCDO pXYSEC:*slpB* que em relação aos demais grupos, que não apresentaram diferenças estatísticas entre si. Já os níveis de expressão de mRNA de *pparg* (FIG. 41 B) demonstrara-se estatisticamente similares entre os grupos *Naive* e NCDO pXYSEC:*slpB*, contudo o grupo tratado com a linhagem recombinante apresentou alteração estatísticas em relação ao grupo DSS ($p < 0,05$) e NCDO WT + DSS ($p < 0,01$).

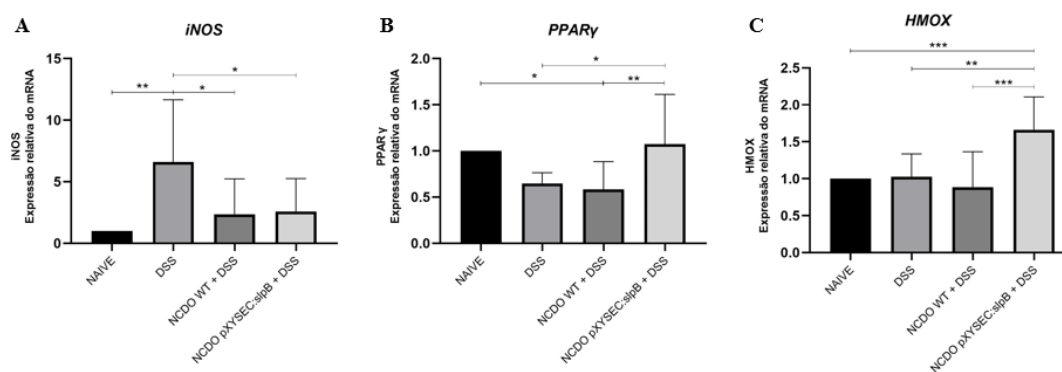


Figura 41 - Análise da expressão gênica de *inos* (A), *pparg* (B) *hmox1* (C). Os testes One-Way ANOVA e Tukey post-hoc foram usados para a comparação múltipla ($n = 6$). Os asteriscos representam as diferenças estatísticas significativas, sendo (*) referente a $p < 0,05$ (**), referente a $p < 0,01$ e (***) referente a $p < 0,0001$.

A interferência de genes como *pparg* e *hmox1* também vem sendo estudada sobre o processo inflamatório da colite ulcerativa (SU *et al.*, 1999; LEE; CHAU, 2002). Pode-se observar nos resultados analisados que a expressão da proteína SlpB foi peça chave para desencadear o aumento da expressão de ambos os genes, mostrando efeito independente da linhagem selvagem. A literatura mostra que a pacientes com colite ulcerativa possuem a expressão prejudicada de *pparg* no cólon e o aumento da expressão desse gene pode ocasionar na inibição de citocinas inflamatórias como IL-1b e TNF (DUBUQUOY *et al.*, 2006). Este efeito pode ser observado nas quantificações por Elisa demonstradas neste trabalho, com reduções significantes dos níveis de TNF no tecido do cólon dos animais do grupo NCDO pXYSEC:*slpB* + DSS. A enzima Heme Oxigenase 1 (HMOX1) também possui um papel importante no contexto de controle da inflamação, visto que o aumento da enzima induz a produção da citocina anti-inflamatória IL-10 (SEBASTIÁN *et al.*, 2018). Ambos os efeitos descritos na literatura puderam ser

observados nos resultados obtidos com o tratamento *L. lactis* NCDO2118 pXYSEC:*slpB*, de forma em que os animais que consumiram a linhagem recombinante apresentaram um aumento na expressão gênica de *hmox1* e *IL-10*, confirmados pelo aumento também da citocina presente no tecido.

5.7.8 Quantificação de citocinas pró e anti-inflamatórias no cólon

Como é possível notar, as citocinas são um dos principais mediadores da patogênese da colite (KO; AUYEUNG, 2014). Neste aspecto, as proteínas de superfície demonstram um mecanismo de ação probiótico intrínseco à regulação das citocinas, como já demonstrados os efeitos da proteína SlpA de *Lactobacillus acidophilus* CICC no modelo de colite induzido por DSS no trabalho de CAI e colaboradores (2018). Neste trabalho avaliamos o papel da linhagem recombinante NCDO pXYSEC:*slpB* na regulação citocinas IL-10 e TGF- β , IL-17, IL-1 β , IL-6, IL-12, INF γ e TNF (FIG. 42).

Com base nos resultados apresentados na figura 42 pode-se observar que a expressão da proteína SlpB foi fundamental para a diminuição da secreção das citocinas pró inflamatórias como TNF, IL-17 e IL-12, com diferenças significativas em relação ao grupo controle DSS. O papel da proteína SlpB sob a citocina IL-12, já havia sido demonstrado por Do Carmo e colaboradores (2019), onde o tratamento a linhagem selvagem de *P. freudenreichii* 129 apresentou uma diminuição da citocina durante a mucosite induzida por 5-FU, mas o mesmo não foi observado no tratamento com a linhagem *knockout* para o gene *slpB*. Além disso, foi observada também a ativação da secreção de IL-10 e TGF- β pela linhagem *L. lactis* NCDO2118 pXYSEC:*slpB*, fator importante que contribui para a atenuação da resposta inflamatória no cólon causada pelo DSS. A citocina anti-inflamatória IL-10 é capaz de inibir a produção de IL-1 β , IL-6 e TNF- α , entretanto seu aumento tem um efeito protetor contra a colite, apenas se for desencadeado antes da indução da colite DSS (CARDOSO *et al.*, 2018).

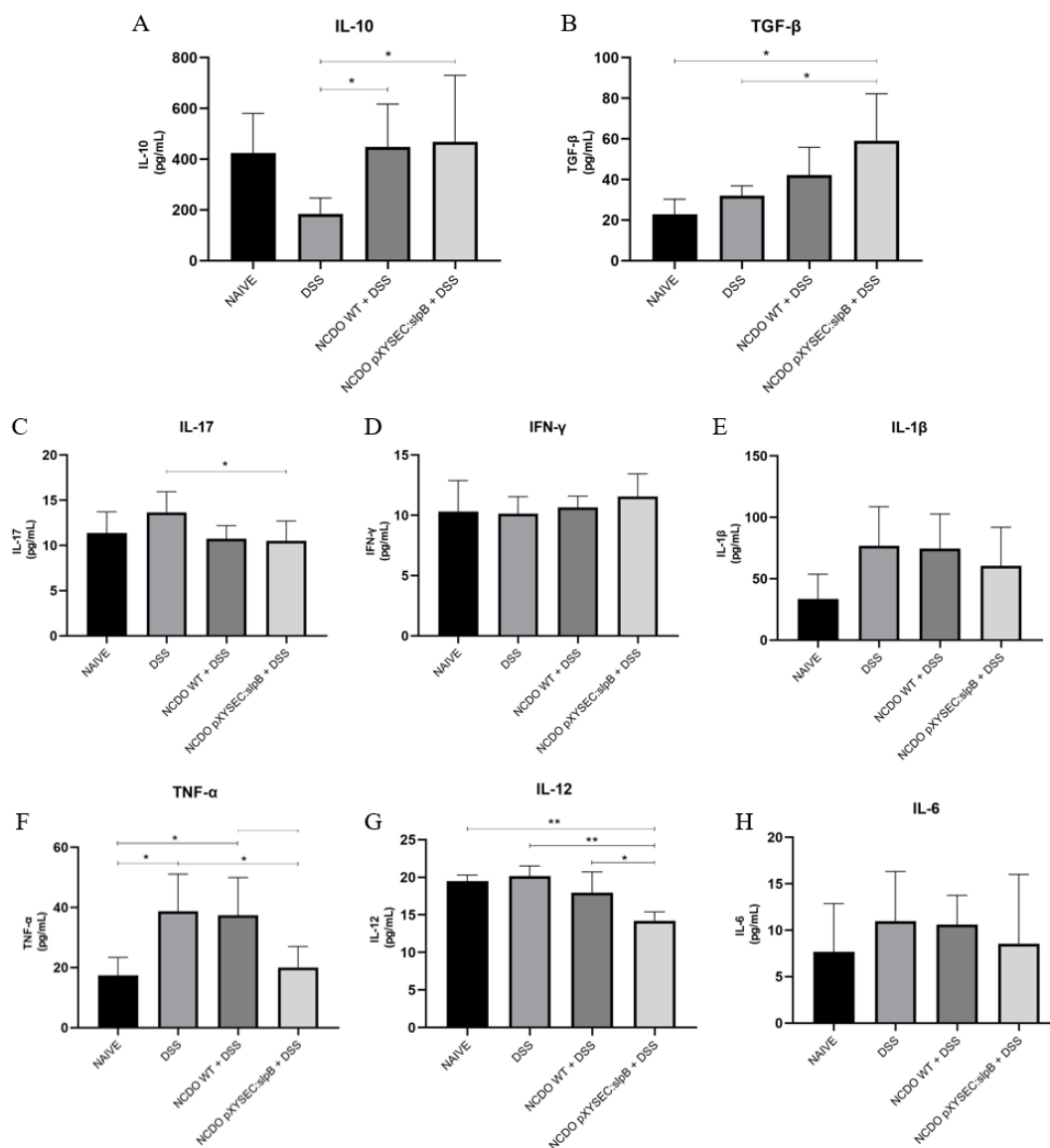


Figura 42 - Concentrações das citocinas IL-10 (A), TGFβ (B), IL-17 (C), INFγ (D), IL-1b (E), TNFα (F), IL-12 (G) e IL-6 (H) quantificadas por ELISA. Os testes One-Way ANOVA e Tukey post-hoc foram usados para a comparação múltipla (n = 6). Os asteriscos representam as diferenças estatísticas significativas, sendo (*) referente a $p < 0,05$ (**) referente a $p < 0,01$ e (***) referente a $p < 0,0001$.

Apesar de observados níveis elevados da expressão do mRNA de IL-6 no grupo tratado com *L. lactis* NCDO2118 pXYSEC:slpB, não foram constatadas alterações na secreção desta proteína no intestino. Um aumento da secreção de IL-6 por *L. lactis* NCDO2118 já havia sido relatado por Luerce e colaboradores (2014), nos 14 primeiros dias de tratamento da colite com a linhagem. Neste mesmo estudo a *L. lactis* NCDO2118 também não foi capaz de diminuir a secreção de IL-12 e os níveis de INFγ permaneceram

inalterados, corroborando com os resultados apresentados neste trabalho. E finalmente, assim como observado com IFN γ , não foram encontradas alterações secreção da citocina IL-1 β e, corroborando com os resultados obtidos na análise da expressão gênica.

A figura abaixo representa de forma esquemática um breve resumos dos resultados encontrados neste trabalho.

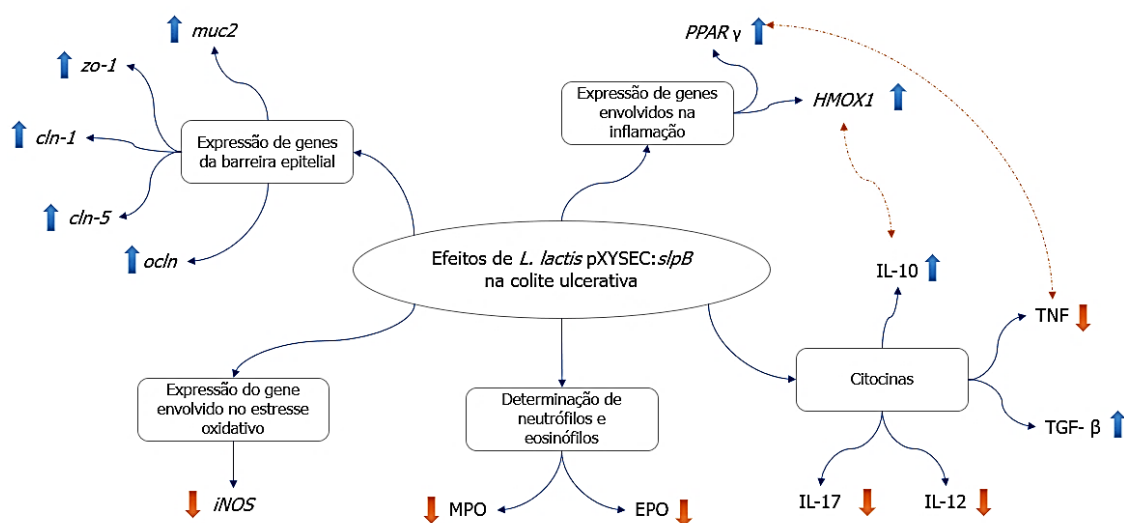


Figura 43 - Desenho esquemático representando os resultados obtidos a partir do tratamento da colite ulcerativa com *L. lactis* NCDO2118 portando a proteína recombinante SlpB.

6. CONCLUSÃO

Sabe-se que as proteínas de superfície estão diretamente ligadas às propriedades probióticas de algumas espécies bacterianas, garantindo características como resistência a alterações ambientais e adesão a superfícies. Recentemente, a linhagem *P. freudenreichii* 129 teve seu potencial anti-inflamatório e de adesão ligados a presença de proteína S-layer B (SlpB). Neste estudo demonstramos que a linhagem *L. lactis* NCDO2118 é capaz de expressar a proteína SlpB através do vetor XIES, e a linhagem recombinante desenvolvida demonstrou características físicas-químicas diferentes da linhagem selvagem, adquiridas pela expressão da proteína. A presença da proteína de superfície B conferiu à *L. lactis* uma maior sobrevivência da bactéria sob estresse em sal biliar; diminuiu a carga da superfície celular, tornando-a mais eletronegativa; aumentou a sua adesão à hidrocarbonetos e também sua capacidade de auto agregação.

As propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras da proteína SlpB foram observadas quando aplicada em modelo murino de colite induzido por DSS. Os camundongos que receberam *L. lactis* pXYSEC:slpB apresentaram uma redução significativa dos sintomas de gravidade da colite. A linhagem recombinante preveniu de forma mais eficiente os efeitos da colite, como a diminuição do Índice de Atividade da Doença, encurtamento limitado do comprimento do cólon e pontuação histopatológica reduzida, demonstrando-se mais eficiente que o tratamento com *L. lactis* NCDO2118 WT. O aumento da expressão de genes de proteínas de junção e a regulação de algumas citocinas pró e anti-inflamatórias também foram atribuídos a expressão da proteína.

Desta forma, este trabalho demonstrou que a proteína de superfície SlpB está envolvida em características fundamentais para a adesão bacteriana e ação probiótica no organismo, apresentando também capacidade de modular fatores e controlar os processos inflamação da colite.

7. PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos neste trabalho levantaram novos questionamentos e abriram portas para novas possibilidades de estudos, desta forma propõe-se futuramente:

- Realizar o ensaio de permeabilidade intestinal, para confirmar a hipótese do aumento da barreira epitelial intestinal visto pelo aumento dos genes *ZO1*, *Claud1*, *Claud5* e *Ocln* (DO CARMO *et al.*, 2019).
- Avaliar a frequência de subpopulações de células T (Treg CD4+Foxp3+ e Treg CD4+Rorgt+) através de Citometria de fluxo (FACS) (CORDEIRO *et al.*, 2021; DO CARMO *et al.*, 2019);
- Quantificar, otimizar a produção e purificar a proteína SlpB em grande quantidade (larga escala) (LORMENDEZ *et al.*, 2019).
- Utilizar a proteína SlpB purificada no mesmo desenho experimental de colite induzida por DSS para verificar os efeitos “isolados” no hospedeiro (LIGHTFOOT *et al.*, 2015).
- Testar os efeitos da proteína SlpB em outros de colite (pré-tratamento e pós-tratamento) (WIRTZ *et al.*, 2017);
- Analisar o microbioma intestinal das amostras de fezes através de sequenciamento 16s com intuito de verificar se a SlpB pode modular a microbiota do hospedeiro, assim como a linhagem *L. lactis* NCDO 2118 (CARVALHO *et al.*, 2017).
- Testar em outros modelos de inflamação intestinal como a mucosite induzida por 5-fluorouracil, ou até mesmo em modelo de câncer colorretal (OLIVEIRA *et al.*, 2017, CORDEIRO *et al.*, 2018, DO CARMO *et al.*, 2019);

REFERÊNCIAS

Abrantes, F. A., Nascimento, B. B., Andrade, M. E. R., de Barros, P. A. V., Cartelle, C. T., Martins, F. S., et al. (2020). Treatment with *Bifidobacterium longum* 51A attenuates intestinal damage and inflammatory response in experimental colitis. *Benef. Microbes* 11, 47–57. doi:10.3920/BM2019.0098.

ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da diretoria colegiada- RDC nº 241, de 26 de julho de 2018. Disponível em: <https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/34379910/do1-2018-07-27-resolucao-da-diretoria-colegiada-rdc-n-241-de-26-de-julho-de-2018-34379900> Acessado em: 04 fev. 2021.

ANVISA. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. “Guia Para Instrução Processual De Petição De Avaliação De Probióticos Para Uso Em Alimentos”. GUIA 21, versão 1, de 21 de fevereiro de 2019.

Ananthakrishnan, A. N. (2015). Epidemiology and risk factors for IBD. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 12, 205–217. doi: 10.1038/nrgastro.2015.34

ANZENGRUBER, Julia et al. Protein O-glycosylation in *Lactobacillus buchneri*. **Glycoconjugate journal**, v. 31, n. 2, p. 117-131, 2014.

ASSIS, Dener Acosta de. **Biossíntese de vitamina B12 por *Lactobacillus plantarum* BL011e *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* em efluente ácido do isolamento de proteína de soja**. 2019. 67 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul Instituto, Porto Alegre, 2019.

BARLA, F. *et al.* The g -aminobutyric acid-producing ability under low pH conditions of lactic acid bacteria isolated from traditional fermented foods of Ishikawa Prefecture , Japan , with a strong ability to produce. *Biotechnology Reports*, v. 10, p. 105–110, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.btre.2016.04.002>>.

BARNARD, E. *et al.* Porphyrin Production and Regulation in *Cutaneous*. v. 5, n. 1, p. 1–10, 2020.

BASSO, P. J. *et al.* Microbial-Based Therapies in the Treatment of Inflammatory Bowel Disease – An Overview of Human Studies. v. 9, n. January, p. 1–11, 2019.

Benbouziane, B., Ribelles, P., Aubry, C., Martin, R., Kharrat, P., Riazi, A., et al. (2013). Development of a Stress-Inducible Controlled Expression (SICE) system in *Lactococcus lactis* for the production and delivery of therapeutic molecules at mucosal surfaces. *J. Biotechnol.* 168, 120–129. doi: 10.1016/j.jbiotec.2013.04.019

Bermúdez-Humarán, L. G., Motta, J. P., Aubry, C., Kharrat, P., Rous-Martin, L., Sallenave, J. M., et al. (2015). Serine protease inhibitors protect better than IL-10 and

TGF- β anti-inflammatory cytokines against mouse colitis when delivered by recombinant lactococci. *Microb. Cell Fact.* 14, 26. doi: 10.1186/s12934-015-0198-4

BRAAT, H. *et al.* A Phase I Trial With Transgenic Bacteria Expressing Interleukin-10 in Crohn's Disease. p. 754–759, 2006.

CAI, Z. *et al.* Anti-inflammatory activity of surface layer protein SlpA of *Lactobacillus acidophilus* CICC 6074 in LPS-induced RAW 264.7 cells and DSS-induced mice colitis. *Journal of Functional Foods*, v. 51, n. October, p. 16–27, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.10.008>>.

Caluwaerts, S., Vandenbroucke, K., Steidler, L., Neiryneck, S., Vanhoenacker, P., Corveleyn, S., et al. (2010). AG013, a mouth rinse formulation of *Lactococcus lactis* secreting human Trefoil Factor 1, provides a safe and efficacious therapeutic tool for treating oral mucositis. *Oral Oncol.* 46, 564–570. doi: 10.1016/j.oraloncology.2010.04.008

Cardoso A, Gil Castro A, Martins AC, Carriche GM, Murigneux V, Castro I, Cumano A, Vieira P, Saraiva M. The Dynamics of Interleukin-10-Afforded Protection during Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis. *Front Immunol.* 2018 Mar 1;9:400. doi: 10.3389/fimmu.2018.00400. PMID: 29545807; PMCID: PMC5837963.

DO CARMO, Fillipe Luiz Rosa et al. Probiotic *Propionibacterium freudenreichii* requires SlpB protein to mitigate mucositis induced by chemotherapy. ***Oncotarget***, v. 10, n. 68, p. 7198, 2019.

CARMO, FILLIPE L R *et al.* Mutation of the Surface Layer Protein SlpB Has Pleiotropic Effects in the Probiotic *Propionibacterium*. v. 9, n. August, 2018.

CARMO, FILLIPE L R *et al.* *Propionibacterium freudenreichii* Surface Protein SlpB Is Involved in Adhesion to Intestinal HT-29 Cells. v. 8, n. June, p. 1–11, 2017.

CARR, F. J. *et al.* Critical Reviews in Microbiology The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. v. 7828, n. October, 2017.

CARVALHO, Rodrigo et al. Gut microbiome modulation during treatment of mucositis with the dairy bacterium *Lactococcus lactis* and recombinant strain secreting human antimicrobial PAP. ***Scientific reports***, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2018.

CARVALHO, R. D. D. O.; CARMO, F. L. R.; JUNIOR, A. D. O. Use of Wild Type or Recombinant Lactic Acid Bacteria as an Alternative Treatment for Gastrointestinal Inflammatory Diseases: A Focus on Inflammatory Bowel Diseases and Mucositis. v. 8, n. May, p. 1–13, 2017.

CARVALHO, Rodrigo Dias et al. Oral administration of *Lactococcus lactis* expressing recombinant 15-lipoxygenase-1 (15 LOX-1) modulates chemically induced colitis in mice. ***Medical Research Archives***, v. 4, n. 7, 2016.

CAVANAGH, Daniel; FITZGERALD, Gerald F.; MCAULIFFE, Olivia. From field to fermentation: the origins of *Lactococcus lactis* and its domestication to the dairy environment. **Food microbiology**, v. 47, p. 45-61, 2015.

Chibbar, R., and Dieleman, L. (2015). Probiotics in the Management of Ulcerative Colitis. *Clin Gastroenterol* 49, 50–55. doi:10.1097/MCG.0000000000000368.

CHOI, A. R. *et al.* Antagonistic activities and probiotic potential of lactic acid bacteria derived from a plant-based fermented food. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, n. AUG, p. 1–12, 2018.

Clemente, J. C., Ursell, L. K., Parfrey, L., and Knight, R. (2012). The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell* 148, 1258–1270. doi: 10.1016/j.cell.2012.01.035

Colliou N, Ge Y, Sahay B, Gong M, Zadeh M, Owen JL, Neu J, Farmerie WG, Alonzo F 3rd, Liu K, Jones DP, Li S, Mohamadzadeh M. Commensal *Propionibacterium* strain UF1 mitigates intestinal inflammation via Th17 cell regulation. *J Clin Invest*. 2017; 127: 3970–86. <https://doi.org/10.1172/JCI95376>.

CONNELL, Mary *et al.* Systematic review and meta-analysis: Efficacy of patented probiotic, VSL# 3, in irritable bowel syndrome. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 30, n. 12, p. e13427, 2018.

Cooper, H. S., Murthy, S. N., Shah, R. S., and Sedergran, D. J. (1993). Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest* 69, 238–249.

CORDEIRO, B. F. *et al.* Whey protein isolate-supplemented beverage, fermented by *Lactobacillus casei* BL23 and *Propionibacterium freudenreichii* 138, in the prevention of mucositis in mice. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, n. SEP, p. 1–18, 2018.

COSTA, M. C. *et al.* The absence of microbiota delays the inflammatory response to *Cryptococcus gattii*. *International Journal of Medical Microbiology*, v. 306, n. 4, p. 187–195, 2016.

COUSIN, F. J. *et al.* The Complete Genome of *Propionibacterium freudenreichii* CIRM-BIA1 T, a Hardy Actinobacterium with Food and Probiotic Applications. v. 5, n. 7, 2010.

COUSIN, F. J.; MATER, D. D. G. Dairy propionibacteria as human probiotics : A review of recent evidence. p. 1–26, 2011.

DE RUYTER, P. G.; KUIPERS, Oscar P.; DE VOS, Willem M. Controlled gene expression systems for *Lactococcus lactis* with the food-grade inducer nisin. **Applied and environmental microbiology**, v. 62, n. 10, p. 3662-3667, 1996.

de Wouters, T., Jans, C., Niederberger, T., Fischer, P., and Rühls, P. A. (2015). Adhesion potential of intestinal microbes predicted by physico-chemical characterization methods. *PLoS ONE* 10:e0136437. doi: 10.1371/journal.pone.0136437

DEL CARMEN, S. *et al.* Evaluation of the anti-inflammatory effect of milk fermented

by a strain of IL-10-producing *Lactococcus lactis* using a murine model of Crohn's disease. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, v. 21, n. 3–4, p. 138–146, 2012.

DEPTULA, P. *et al.* Food-Like Growth Conditions Support Production of Active Vitamin B12 by *Propionibacterium freudenreichii* 2067 without DMBI, the Lower Ligand Base, or Cobalt Supplementation. v. 8, n. March, p. 1–11, 2017.

DEUTSCH, S. *et al.* Identification of proteins involved in the anti-inflammatory properties of *Propionibacterium freudenreichii* by means of a multi-strain study. n. September 2016, p. 1–13, 2017.

DHILLON, P.; SINGH, K. PharmaNutrition Therapeutic applications of probiotics in ulcerative colitis: An updated review. *PharmaNutrition*, v. 13, n. April, p. 100194, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.phanu.2020.100194>>.

DO CARMO, FILLIPE L.R.; RABAH, H.; *et al.* Extractable bacterial surface proteins in probiotic-host interaction. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, n. APR, p. 1–12, 2018.

DO CARMO, FILLIPE L.R.; SILVA, W. M.; *et al.* Mutation of the surface layer protein SlpB has pleiotropic effects in the probiotic *propionibacterium freudenreichii* CIRM-BIA 129. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, n. AUG, 2018.

DONOHUE, Diana C. *et al.* Some considerations for the safety of novel probiotic bacteria. **Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects**, p. 423-438, 2012.

DUBUQUOY, L. *et al.* PPAR α AS A NEW THERAPEUTIC TARGET IN INFLAMMATORY BOWEL DISEASES. v. 15, n. fig 1, 2006.

FAO, J. *et al.* Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. p. 1–11, 2002.

Falentin, H., Deutsch, S. M., Jan, G., Loux, V., Thierry, A., Parayre, S., *et al.* (2010). The complete genome of *Propionibacterium freudenreichii* CIRM- BIA1T, a hardy Actinobacterium with food and probiotic applications. *PLoS ONE* 5:e11748. doi: 10.1371/journal.pone.0011748 FERREIRA, A. A. *et al.* Tracking Amazonian cheese microbial diversity: Development of an original, sustainable, and robust starter by freeze drying/spray drying. *Journal of Dairy Science*, p. 1–10, 2017.

FOLIGNE, B.; SAMSON, M.; POT, B. Promising Immunomodulatory Effects of Selected Strains of Dairy Propionibacteria as Evidenced In Vitro and In Vivo □ †. v. 76, n. 24, p. 8259–8264, 2010.

FRECE, J. *et al.* Importance of S-layer proteins in probiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* M92. p. 285–292, 2005.

FUKUMOTO, S. *et al.* Identification of a probiotic bacteria-derived activator of the aryl hydrocarbon receptor that inhibits colitis. *Immunology and Cell Biology*, v. 92, n. 5, p. 460–465, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/icb.2014.2>>.

GARCIA-CARBONELL, R. *et al.* Dysregulation of intestinal epithelial cell RIPK pathways promotes chronic inflammation in the IBD gut. *Frontiers in Immunology*, v. 10, n. MAY, 2019.

GHARSALLAOUI, A. *et al.* Nisin as a Food Preservative: Part 1: Physicochemical Properties, Antimicrobial Activity, and Main Uses. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 56, n. 8, p. 1262–1274, 2016.

Gomes-Santos, A. C., de Oliveira, R. P., Moreira, T. G., Castro-Junior, A. B., Horta, B. C., Lemos, L., et al. (2017). Hsp65-Producing *Lactococcus lactis* Prevents Inflammatory Intestinal Disease in Mice by IL-10- and TLR2-Dependent Pathways. *Front. Immunol.* 8:30. doi: 10.3389/fimmu.2017.0003

GROOTJANS, J. *et al.* Epithelial endoplasmic reticulum stress orchestrates a protective IgA response. *Science*, v. 363, n. Immunology, p. 993–998, 2019.

Guo, X.-H., Kim, J.-M., Nam, H.-M., Park, S.-Y., and Kim, J.-M. (2010). Screening lactic acid bacteria from swine origins for multistrain probiotics based on in vitro functional properties. *Anaerobe* 16, 321–326. doi: 10.1016/j.anaerobe.2010.03.006

HAN, F. *et al.* Porcine β -Defensin 2 Attenuates Inflammation and Mucosal Lesions in Dextran Sodium Sulfate – Induced Colitis. 2021.

Hanson, M. L.; Hixon, J.A., Lietal, W., “Oral delivery of IL-27 recombinant bacteria attenuates immune colitis in mice,” *Gastroenterology*, vol. 146, no. 1, pp. 210.e13–221.e13, 2014.

HEALTH, H. Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. n. 1989, 2017.

HILL, D.A. & ARTIS, D. (2010) Intestinal bacteria and the regulation of immune cell homeostasis. *Annual Reviews of Immunology*, 28:623-667.

HOLLMANN, A. *et al.* Tight controlled expression and secretion of *Lactobacillus brevis* SlpA in *Lactococcus lactis*. *Biotechnology Letters*, v. 34, n. 7, p. 1275–1281, 2012.

HOUWINK, A. L. A macromolecular mono-layer in the cell wall of *Spirillum spec.* *Biochimica Et Biophysica Acta*, v. 10, n. 3, p. 360–366, mar. 1953.

Hynönen, U., and Palva, A. (2013). *Lactobacillus* surface layer proteins: structure, function and applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 5225–5243. doi: 10.1007/s00253-013-4962-2

JAKAVA-VILJANEN, Miia et al. Isolation of three new surface layer protein genes (slp) from *Lactobacillus brevis* ATCC 14869 and characterization of the change in their expression under aerated and anaerobic conditions. **Journal of bacteriology**, v. 184, n. 24, p. 6786-6795, 2002.

KIM, W. S.; REN, J.; DUNN, N. W. Differentiation of *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* and subspecies *cremoris* strains by their adaptive response to stresses. v. 171, p. 57–

65, 1999.

KLINGL, A. S-layer and cytoplasmic membrane – exceptions from the typical archaeal cell wall with a focus on double membranes. v. 5, n. November, p. 1–6, 2014.

Ko, J.K., and Auyeung, K.K. (2014). Inflammatory bowel disease: etiology, pathogenesis and current therapy. *Curr. Pharm. Des.* 20, 1082–1096.

KOLIOS, G.; VALATAS, V.; WARD, S. G. Nitric oxide in inflammatory bowel disease : a universal messenger in an unsolved puzzle. 2004.

KOS, B. *et al.* Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology*, v. 94, n. 6, p. 981–987, 2003.

Koval, S. F., and Murray, R. G. (1984). The isolation of surface array proteins from bacteria. *Can. J. Biochem. Cell Biol. Rev. Can. Biochim. Biol. Cell.* 62, 1181–1189.

KUSHKEVYCH, I.; MONIKA, V. Intestinal Microbiota and Perspectives of the Use of Meta-Analysis for Comparison of Ulcerative Colitis Studies. 2021.

LE LOIR, Y. *et al.* Signal Peptide and Propeptide Optimization for Heterologous Protein Secretion in *Lactococcus lactis*. v. 67, n. 9, p. 4119–4127, 2001.

LE LOIR, Y. LE *et al.* Protein secretion in *Lactococcus lactis* : an efficient way to increase the overall heterologous protein production. v. 13, p. 1–13, 2005.

LEBLANC, A. D. M. DE *et al.* Current Review of Genetically Modified Lactic Acid Bacteria for the Prevention and Treatment of Colitis Using Murine Models. v. 2015, 2015.

LEE, E. *et al.* Probiotics in human health and disease : from nutribiotics to pharmabiotics. v. 56, n. 11, p. 773–782, 2018.

LEE, S. *et al.* Relative codon adaptation index, a sensitive measure of codon usage bias. *Evolutionary Bioinformatics*, v. 2010, n. 6, p. 47–55, 2010.

Lee T-S, Chau L-Y. Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice. *Nat Med.* (2002) 8:240–6. doi: 10.1038/nm0302-240

LEITE, Kátia de Morais Costa. **Utilização Biotecnológica de *Lactococcus lactis* como veículo de liberação da 15-Lipoxigenase-1 no tratamento de doenças inflamatórias intestinais.** 2014. 122 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-Graduação em Inovação Biofarmacêutica, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

LILLY, D. M.; STILLWELL, R. H. Probiotics: Growth-Promoting Factors Produced by Microorganisms. *Science*, v. 147, n. 3659, p. 747–748, 1965.

Landy, J., Ronde, E., English, N., Clark, S. K., Hart, A. L., Knight, S. C., et al. (2016). Tight junctions in inflammatory bowel diseases and inflammatory bowel disease associated colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.* 22, 3117–3126. doi:10.3748/wjg.v22.i11.3117.

LIGHTFOOT, Yaíma L. et al. SIGNR 3-dependent immune regulation by *Lactobacillus acidophilus* surface layer protein A in colitis. **The EMBO journal**, v. 34, n. 7, p. 881-895, 2015.

Linares, D. M., Alvarez-Sieiro, P., Rio, B., Ladero, V., Redruello, B., Martin, M. C., et al. (2015a). Implementation of the agmatine-controlled expression system for inducible gene expression in *Lactococcus lactis*. *Microb. Cell Fact.* 14:208. doi: 10.1186/s12934-015-0399-x

Limketkai BN, Akobeng AK, Gordon M, Adepoju AA. Probiotics for induction of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2020 Jul 17;7(7):CD006634. doi: 10.1002/14651858.CD006634.pub3. PMID: 32678465; PMCID: PMC7389339.

LIU, X. et al. *Blautia* — a new functional genus with potential probiotic properties? *Gut Microbes*, v. 13, n. 1, p. 1–21, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1875796>>.

Llull, D., and Poquet, I. (2004). New expression system tightly controlled by zinc availability in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5398–5406. doi: 10.1128/AEM.70.9.5398-5406.2004

LORMENDEZ, Caleb C. et al. Mass production of a S-layer protein of *Bacillus thuringiensis* and its toxicity to the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-9, 2019.

LUERCE, T. D. et al. Anti-inflammatory effects of *Lactococcus lactis* NCDO 2118 during the remission period of chemically induced colitis. p. 1–11, 2014.

MA, S.; YEOM, J.; LIM, Y. Dairy Propionibacterium freudenreichii ameliorates acute colitis by stimulating MUC2 expression in intestinal goblet cell in a DSS-induced colitis rat model. *Scientific Reports*, p. 1–13, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-020-62497-8>>.

MALOY, K. J.; POWRIE, F. Intestinal homeostasis and its breakdown. 2011.

MARCO, M. L.; SANDERS, M. E.; GÄNZLE, M. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on fermented foods. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41575-020-00390-5>>.

MARÉCHAL, C. LE et al. Surface proteins of *Propionibacterium freudenreichii* are involved in its anti-inflammatory properties. *Journal of Proteomics*, p. 1–15, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2014.07.018>>.

MARTA, S.; SAAD, I. Probióticos e prebióticos : o estado da arte. v. 42, p. 1–16, 2006.

Mazzoli R, Pessione E, Dufour M, Laroute V, Giuffrida MG, Giunta C, Coccagn-Bousquet M, Loubière P. 2010. Glutamate-induced metabolic changes in *Lactococcus lactis* NCDO 2118 during GABA production: combined transcriptomic and proteomic

- analysis. *Amino Acids*. 39(3):727-737. doi: 10.1007/s00726-010-0507-5.
- MCCONNELL, E. L.; BASIT, A. W.; MURDAN, S. Measurements of rat and mouse gastrointestinal pH, fluid and lymphoid tissue, and implications for in-vivo experiments. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 60, n. 1, p. 63–70, 2008.
- MCINTIRE, M. G. *et al.* MUC2 Is a Highly Specific Marker of Goblet Cell Metaplasia in the Distal Esophagus and Gastroesophageal Junction. v. 35, n. 7, p. 1007–1013, 2011.
- MIYOSHI, A. *et al.* A xylose-inducible expression system for *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 239, n. 2, p. 205–212, 2004.
- MOHSENI, A. H. *et al.* *Efficient production and optimization of E7 oncoprotein from Iranian human papillomavirus type 16 in Lactococcus lactis using nisin-controlled gene expression (NICE) system.* [S.l.]: Elsevier Ltd, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2017.07.039>>.
- MOHSENI, A. H et al. Codon Usage Optimization and Construction of Plasmid Encoding Iranian Human Papillomavirus Type 16 E7 Oncogene for *Lactococcus Lactis* Subsp. *Cremoris* MG1363. (2017) **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention:APJCP**, 18(3), 783-788. <https://doi.org/10.22034/APJCP.2017.18.3.783>
- Mokoena, M. P. (2017). Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: Classification, Biosynthesis and Applications against Uropathogens: a Mini-Review. *Molecules* 22, 1255. doi: 10.3390/molecules22081255.
- Mu, D., Montalban-Lopez, M., Masuda, Y., and Kuipers, O. P. (2013). Zirex: a novel zinc-regulated expression system for *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 4503–4508. doi: 10.1128/AEM.00866-13
- Nishitani Y, Tanoue T, Yamada K, Ishida T, Yoshida M, Azuma T, Mizuno M (2009) *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FC alleviates symptoms of colitis induced by dextran sulfate sodium in mice. *Int Immunopharmacol.* 9:1444-1451.
- NOUAILLE, S. *et al.* Heterologous protein production and delivery systems for *Lactococcus lactis*. *Genetics and Molecular Research*, v. 2, n. 1, p. 102–111, 2003.
- OKAYASU, Isao et al. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. **Gastroenterology**, v. 98, n. 3, p. 694-702, 1990.
- OLIVEIRA, L. C *et al.* Analyses of the probiotic property and stress resistance-related genes of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 2118 through comparative genomics and in vitro assays. p. 1–28, 2017.
- PECINI, V.; PREISSER, T. M.; SANTANA, M. P. Mycobacterial Hsp65 antigen delivered by invasive *Lactococcus lactis* reduces intestinal inflammation and fibrosis in TNBS - induced chronic colitis model. *Scientific Reports*, p. 1–10, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-020-77276-8>>.
- PENG, M. *et al.* Effectiveness of probiotics , prebiotics , and prebiotic-like components

in common functional foods. n. March, p. 1908–1933, 2020.

PERRONE, Í. T.; PEREIRA, J. P. F.; CARVALHO, A. F. DE. Aspectos Tecnológicos Da Fabricação De Soro Em Pó : Uma Revisão. *Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes*, v. 66, p. 23–30, 2011.

PETERSON, L. W.; ARTIS, D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nature Publishing Group*, v. 14, n. 3, p. 141–153, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nri3608>>.

PFEIFFER, Friederike et al. Claudin-1 induced sealing of blood–brain barrier tight junctions ameliorates chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Acta neuropathologica*, v. 122, n. 5, p. 601–614, 2011.

Piwowarek, K., Lipińska, E., Hać-Szymańczuk, E., Bzducha-Wróbel, A., Synowiec, A., 2018a. Research on the ability of propionic acid and vitamin B12 biosynthesis by *Propionibacterium freudenreichii* strain T82. *Antonie Van Leeuwenhoek* 111, 921–932. <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0991-7>

PLÉ, Coline et al. Combining selected immunomodulatory *Propionibacterium freudenreichii* and *Lactobacillus delbrueckii* strains: Reverse engineering development of an anti-inflammatory cheese. *Molecular nutrition & food research*, v. 60, n. 4, p. 935–948, 2016.

Pontes, D.S. et al. (2011). *Lactococcus lactis* as a live vector: Heterologous protein production and DNA delivery systems. *Protein Expr. Purif.* 79(2): 165–175.

RABAH, H. *et al.* Beneficial *Propionibacteria* within a Probiotic Emmental Cheese : Impact on Dextran Sodium Sulphate-Induced Colitis in Mice. v. 17, 2020.

RABAH, H.; LUIZ, F. Dairy *Propionibacteria* : Versatile Probiotics. n. 2013, p. 1–17, 2017.

REZAC, S. *et al.* Fermented Foods as a Dietary Source of Live Organisms. v. 9, n. August, 2018.

Rochat, T., Bermúdez-Humarán, L., Gratadoux, J. J., Fourage, C., Hoebler, C., Corthier, G., et al. (2007). Anti-inflammatory effects of *Lactobacillus casei* BL23 producing or not a manganese-dependant catalase on DSS-induced colitis in mice. *Microb. Cell Fact.* 6:22. doi: 10.1186/1475-2859-6-22

Rogier EW, Frantz AL, Bruno ME, Wedlund L, Cohen DA, Stromberg AJ, Kaetzel CS. Lessons from mother: Long-term impact of antibodies in breast milk on the gut microbiota and intestinal immune system of breastfed offspring. *Gut Microbes.* 2014;5(5):663–8. doi: 10.4161/19490976.2014.969984. PMID: 25483336; PMCID: PMC4615880.

RUIZ, L.; MARGOLLES, A.; SÁNCHEZ, B. Bile resistance mechanisms in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. v. 4, n. December, p. 1–8, 2013.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

SANDERS, J. W.; VENEMA, G.; KOK, J. Environmental stress responses in *Lactococcus lactis*. *Microbiology Reviews*, v. 23, 483-501, 1999.

Sandes, S., Alvim, L., Silva, B., Acurcio, L., Santos, C., Campos, M., et al. (2017). Selection of new lactic acid bacteria strains bearing probiotic features from mucosal microbiota of healthy calves: looking for immunobiotics through in vitro and in vivo approaches for immunoprophylaxis applications. *Microbiol. Res.* 200, 1–13. doi: 10.1016/j.micres.2017. 03.008

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463–5467.

SCHÄR-ZAMMARETTI, P.; UBBINK, J. The Cell Wall of Lactic Acid Bacteria: Surface Constituents and Macromolecular Conformations. *Biophysical Journal*, v. 85, n. 6, p. 4076–4092, 2003.

Schleifer, K.H., Kraus, J., Dvorak, C., Kilpper-Balz, R., Collins, M.D. and Fischer, W., Transfer of *Streptococcus lactis* and Related *Streptococci* to the Genus *Lactococcus* gen. nov., *Syst. Appl. Microbiol.*, 6, 183-195, 1985.

SEBASTIÁN, V. P. *et al.* Heme Oxygenase-1 as a Modulator of Intestinal Inflammation Development and Progression. v. 9, n. September, p. 1–12, 2018.

SOCCOL, C. R. *et al.* The Potential of Probiotics : A Review. v. 48, n. 4, p. 413–434, 2013.

SONG, Adelene Ai-Lian et al. A review on *Lactococcus lactis*: from food to factory. **Microbial cell factories**, v. 16, n. 1, p. 1-15, 2017.

Stepaniuk, P., Bernstein, C.N., Targownik, L.E., and Singh, H. (2015). Characterization of Inflammatory Bowel Disease in Elderly Patients: A Review of Epidemiology, Current Practices and Outcomes of Current Management Strategies. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology* 29, 327–333.

Su CG, Wen X, Bailey ST, et al. A novel therapy for colitis utilizing PPAR- gamma ligands to inhibit the epithelial inflammatory response. *J Clin Invest* 1999;104:383–9

Tamaki, H., Nakase, H., Inoue, S., Kawanami, C., Itani, T., Ohana, M., et al. (2016). Efficacy of probiotic treatment with *Bifidobacterium longum* 536 for induction of remission in active ulcerative colitis: a randomized, double-blinded, placebo-controlled multicenter trial. *Dig. Endosc.* 28, 67–74. doi: 10.1111/den. 12553

TAVARES, L. M. *et al.* Novel Strategies for Efficient Production and Delivery of Live Biotherapeutics and Biotechnological Uses of *Lactococcus lactis*: The Lactic Acid Bacterium Model. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 8, n. November, p. 1–19, 2020.

THIERRY, A. *et al.* International Journal of Food Microbiology New insights into physiology and metabolism of *Propionibacterium freudenreichii*. *International Journal of Food Microbiology*, v. 149, n. 1, p. 19–27, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.04.026>>.

THURSBY, Elizabeth; JUGE, Nathalie. Introduction to the human gut microbiota. **Biochemical Journal**, v. 474, n. 11, p. 1823-1836, 2017.

VALDES, Ana M. *et al.* Role of the gut microbiota in nutrition and health. **Bmj**, v. 361, 2018.

Van Asseldonk, M., Rutten, G., Oteman, M., Siezen, R. J., de Vos, W. M., and Simons, G. (1990). Cloning of *usp45*, a gene encoding a secreted protein from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MG1363. *Gene* 95, 155–160. doi: 10.1016/0378-1119(90)90428-t

VEERAPPAN, G. R.; BETTERIDGE, J.; YOUNG, P. E. Probiotics for the treatment of inflammatory bowel disease. *Current Gastroenterology Reports*, v. 14, n. 4, p. 324–333, 2012.

VILLANACCI, V. *et al.* Histological healing in inflammatory bowel disease: A still unfulfilled promise. v. 19, n. 7, p. 968–978, 2013.

VOIDAROU, Chrysa *et al.* Fermentative Foods: Microbiology, Biochemistry, Potential Human Health Benefits and Public Health Issues. **Foods**, v. 10, n. 1, p. 69, 2021.

WAKAI, T. *et al.* Functional role of surface layer proteins of *Lactobacillus acidophilus* L-92 in stress tolerance and binding to host cell proteins. v. 40, n. 1, p. 33–42, 2021.

WANG, Z. H.; WANG, Y. L.; ZENG, X. Y. Construction and expression of a heterologous protein in *Lactococcus lactis* by using the nisin-controlled gene expression system: the case of the PRRSV ORF6 gene. v. 13, n. 1, p. 1088–1096, 2014.

WIRTZ, S. *et al.* Chemically induced mouse models of acute and chronic intestinal inflammation. *Nature Protocols*, v. 12, n. 7, p. 1295–1309, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2017.044>>.

Wood HG (1981) Metabolic cycles in the fermentation by propionic acid bacteria. In: Estabrook RW, Srera P, editors. Current topics in cellular regulation-1981. New York: Academic Press. pp. 255–287

Zhang, Y. Z., and Li, Y. Y. (2014). Inflammatory bowel disease: Pathogenesis. *World J. Gastroenterol.* 20, 91–99. doi:10.3748/wjg.v20.i1.91.

ZHENG, L.; WEN, X.-L. Gut microbiota and inflammatory bowel disease: The current status and perspectives. *World Journal of Clinical Cases*, v. 9, n. 2, p. 321–333, 2021.

ZIELIŃSKA, Dorota; SIONEK, Barbara; KOŁOŻYŃ-KRAJEWSKA, Danuta. Safety of probiotics. In: **Diet, Microbiome and Health**. Academic Press, 2018. p. 131-161.

ZIELIŃSKA, Dorota; KOŁOŻYN-KRAJEWSKA, Danuta. Food-origin lactic acid bacteria may exhibit probiotic properties. **BioMed research international**, v. 2018, 2018.

ANEXOS

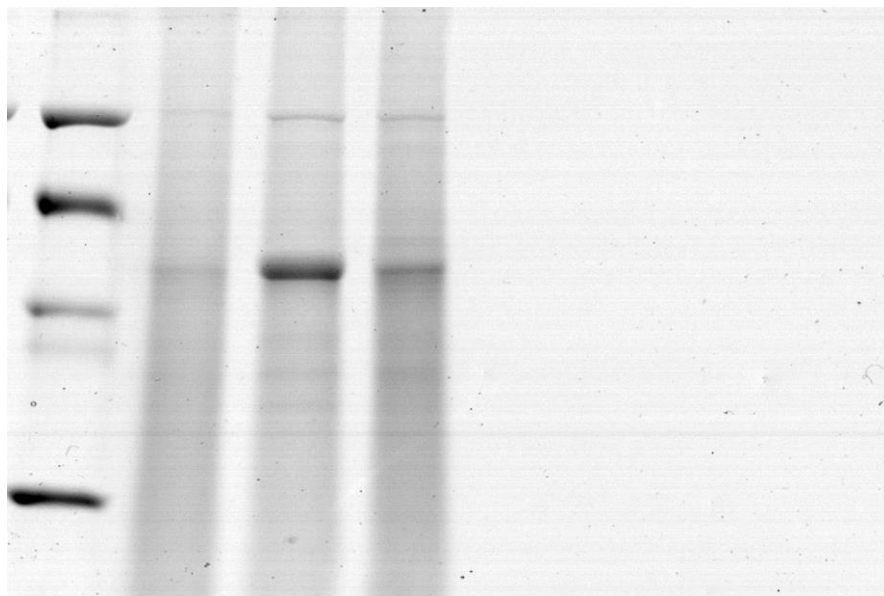


Figura suplementar 1 – Gel SDS-PAGE das proteínas extraídas de *L. Lactis* NCDO2118 pXYSEC:slpB. Coluna 1- Proteínas do sobrenadante de *L. Lactis* NCDO2118 pXYSEC:slpB não induzido; Coluna 2 - Proteínas do sobrenadante de *L. lactis* NCDO2118 pXYSEC:slpB induzida. Coluna 3 - Proteínas totais de *L. lactis* NCDO2118 pXYSEC:slpB induzida. Gel SDS PAGE 10% acrilamida, no sistema Mini PROTEAN II; 120 V-50 mA. Gel de coloração Biosafe (Biorad).



Figura suplementar 2 – Membrana do Western Blot inteira marcada com anticorpo anti-SlpB. 1- Controle positivo Pf 129. *L. lactis* pXYSEC:slpB não induzido: 2- Proteína total; 3- Proteína sobrenadante, 4- Proteínas de superfície (Extrato de Cloreto de Guanidina). *L. lactis* pXYSEC:slpB induzido: 5- Proteína total; 6- Proteína sobrenadante, 7- Proteínas de superfície (Extrato de Cloreto de Guanidina).