

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

CAROLINA NICOLAI VALEFF

**Atividade antagonista de extrato intracelular obtido de *Fusobacterium
necrophorum*: modo de ação e caracterização bioquímica**

BELO HORIZONTE

2011

Carolina Nicolai Valeff

Atividade antagonista de extrato intracelular obtido de *Fusobacterium necrophorum*: modo de ação e caracterização bioquímica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Microbiologia.

Orientador: Luiz de Macêdo Farias

**Co-orientadoras: Maria Auxiliadora Roque de Carvalho
Paula Prazeres Magalhães**

Belo Horizonte

2011

COLABORAÇÃO

Antônio Helvécio Totola – UFSJ

Carolina Araújo Vieira – FUNED

Diego Dias Fassarela Marquioli (Iniciação Científica) – ICB/UFMG

Edilberto Nogueira Mendes – FM/UFMG

Jacques Robert Nicoli – ICB/UFMG

Jamil Silvano Oliveira – ICB/UFMG

Luciano Paulino Silva – EMBRAPA/DF

Marcelo Matos Santoro – ICB/UFMG

Marcelo Porto Bemquerer – EMBRAPA/DF

APOIO FINANCEIRO

CAPES

CNPq

FAPEMIG

PRPq/UFMG

A todos que me apoiaram, incentivaram e auxiliaram na execução deste trabalho, dentro e fora dos laboratórios.

AGRADECIMENTOS

A meus orientadores, Luiz, Paula e Dodôra, por permitirem a execução deste trabalho, auxiliar minha formação acadêmica, compreenderem e apoiarem minhas decisões.

A meus colaboradores, pela disponibilidade, pelo auxílio, ensinamentos e compartilhamento de suas experiências.

Aos professores da graduação em Ciências Biológicas e da pós-graduação em Microbiologia, por me mostrarem o que é ser um bom profissional, seja na carreira de professor, seja na carreira de pesquisador.

Ao José Sérgio e Luzia (apoio técnico), imprescindíveis para o bom funcionamento do laboratório e, conseqüentemente, para a realização de nossos experimentos.

Aos colegas (apoio técnico, alunos de iniciação científica, mestrado e doutorado), pelo bom convívio que tivemos, pela solidariedade, ajuda nos experimentos e elaboração de protocolos, discussões teóricas, conversas diárias e encontros prazerosos fora do laboratório.

Aos amigos, por estarem sempre presentes, mesmo nos longos períodos que me ausentei fisicamente, e torcerem sempre por mim.

Ao Jamil, por estar sempre disposto a ajudar, tirar dúvidas e se empenhar, dedicando muito do seu tempo precioso para a tentativa de purificação.

Ao Diego, por compartilhar o fluxo diariamente, me ajudando em todas as etapas de nosso trabalho, por seu companheirismo, paciência e alegria, sempre me colocando pra cima, inclusive nos momentos de frustração. Obrigada por entender e respeitar meu silêncio e minha inabilidade em trabalhar e conversar ao mesmo tempo!

À Carol Vieira, pelo exemplo profissional e, principalmente, pessoal que foi e tem sido para mim, pela amizade, apoio, ajuda e presença constantes!

À minha família, por apoiarem as decisões que tomo em minha vida, por torcerem e orarem constantemente por mim e, especificamente, para que meus experimentos dessem certo, mesmo sem entender de fato do que se trata. Obrigada pelo carinho com que me acolhem diariamente ou, se distantes, quando possível.

Ao Marcio, pelo amor, carinho, e zelo que tem por mim. Obrigada por todo o auxílio nos diversos finais de semana no laboratório, por viver essa dissertação tanto quanto eu e não me deixar desmoronar nos momentos de angústia e ansiedade.

À UFMG e, em especial, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do ICB/UFMG.

À CAPES, CNPq, FAPEMIG e PRPq/UFMG, pelos auxílios financeiros concedidos.

“Ninguém nasce feito, é experimentando-nos no mundo que nós nos fazemos.”

Paulo Freire

RESUMO

Fusobacterium necrophorum é considerado membro da microbiota indígena da cavidade oral, intestino e trato geniturinário de animais e está associado a etiopatogenia de diversas doenças que acometem seres humanos e outros animais, expressando uma gama de fatores de virulência para tanto. A habilidade de produção de substâncias antagonistas, capazes de inibir a multiplicação ou matar bactérias competidoras, é considerada importante fator de virulência bacteriana. Dentre elas, destacam-se as bacteriocinas, um grupo heterogêneo de compostos antibacterianos de natureza peptídica. Nosso grupo demonstrou, pela primeira vez, a produção de substância(s) antagonista(s) por *F. necrophorum* ativas contra bactérias de outras espécies, bem como a natureza proteica de tais substâncias. A presente investigação teve como objetivo contribuir para a compreensão bioquímico-molecular dessas moléculas. O extrato intracelular, precipitado com sulfato de amônio à saturação de 50% de (C50) obtido a partir de cultura de *F. necrophorum* ATCC 25286, foi capaz de matar a amostra reveladora *Peptostreptococcus anaerobius*. A atividade foi completamente perdida quando C50 foi submetido à temperatura igual ou superior a 45°C e quando exposto a proteases. O extrato manteve-se estável em uma ampla faixa de valores de pH (6,0 a 11,0) e quando incubado junto a solventes orgânicos e sua atividade antibacteriana foi quase completamente perdida após tratamento com EDTA e recuperada com o acréscimo de zinco. A concentração inibitória mínima de C50 para *P. anaerobius* foi 6,25UA/mL, coincidindo com a concentração bactericida mínima. Em 30 minutos, todas as células bacterianas de *P. anaerobius* estavam mortas. A tentativa de purificação da substância antagonista foi realizada com fracionamento por precipitação com sulfato de amônio à saturação de 50%, cromatografia de troca iônica, seguida por exclusão e, finalmente, por fase reversa. Entretanto, a purificação não foi alcançada.

Palavras-chave: *Fusobacterium necrophorum*, bactérias anaeróbias, substâncias antagonistas, bacteriocina.

ABSTRACT

Fusobacterium necrophorum is considered as a member of the indigenous microbiota of the oral cavity, intestines and genitourinary tract of animals and is associated with the etiopathogenesis of several human and animal diseases, expressing a range of virulence factors for both. The ability to produce antagonistic substances that inhibit the growth or kill competing bacteria is considered an important virulence trait. Among them bacteriocins, a heterogeneous group of peptide antibacterial compounds, should be highlighted. Our group has demonstrated for the first time the production of proteinaceous antagonistic substances by *F. necrophorum* active against bacteria of other species. This study aimed to contribute to the biochemical and molecular understanding of these molecules. The intracellular extract obtained from a *F. necrophorum* culture precipitated at 50% ammonium sulfate saturation (C50) was able to kill the indicator strain (*Peptostreptococcus anaerobius*). C50 completely lost its activity when subjected to temperatures of 45°C or higher and when exposed to proteases. The extract remained stable over a wide range of pH values (6.0 – 11.0) and after incubation with solvents. Its antibacterial activity was almost completely lost following treatment with EDTA and recovered by the addition of zinc. The minimum inhibitory concentration of C50 was 6,25UA/mL, the same as the minimum bactericidal concentration. In 30 minutes all indicator cells were killed by the extract. The attempt to purify the antagonist substance performed by precipitation with ammonium sulfate (50% saturation) and ion exchange, exclusion, and reverse phase chromatography was not achieved.

Keywords: *Fusobacterium necrophorum*, anaerobic bacteria, antagonistic substances, bacteriocin.