



Bacterias laticas. As bacterias laticas no centro dos novos desafios tecnologicos

Jean-Christophe J.-C. Piard, Yves Le Loir, Isabelle Poquet, Philippe P. Langella

► To cite this version:

Jean-Christophe J.-C. Piard, Yves Le Loir, Isabelle Poquet, Philippe P. Langella. Bacterias laticas. As bacterias laticas no centro dos novos desafios tecnologicos. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, 1999, pp.80-88. hal-02693833

HAL Id: hal-02693833

<https://hal.inrae.fr/hal-02693833>

Submitted on 1 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Bactérias Lácticas

AS BACTÉRIAS LÁCTICAS NO CENTRO DOS NOVOS DESAFIOS TECNOLÓGICOS

Jean-Christophe Piard, Yves Le Loir, Isabelle Poquet e Philippe Langella*

Pesquisadores doutores do Institut National de la Recherche Agronomique, Unité de Recherches Laitières et de Génétique Appliquée, 78350 Jouy-en-Josas, France.

*langella@biotec.jouy.inra.fr

Traduzido pelos professores doutores **Vasco Azevedo e Ana Lúcia Brunialti Godard.**

Depto de Biologia Geral/ICB-UFMG

Utilização das bactérias lácticas na atualidade

A principal função das bactérias lácticas nos alimentos é a acidificação dos produtos alimentares em um pH próximo de 4, que impede o desenvolvimento de bactérias indesejáveis pela produção de ácidos orgânicos, majoritariamente ácidos lácticos. Isso permite que o período de conservação dos produtos fermentados seja muito maior que a dos produtos onde a matéria-prima não seja fermentada.

Um dos papéis principais das bactérias lácticas é a higiene. Outro papel é desenvolver as propriedades organolépticas dos alimentos fermentados. Por meio da produção de um grande número de enzimas glicolíticas, lipolíticas e proteolíticas, as BL transformam os nutrientes fundamentais dos produtos agrícolas em compostos com propriedades organolépticas complexas. Essas atividades bioquímicas permitem às BL modificar pouco a pouco a estrutura e o aroma dos alimentos fermentados e de contribuir para o desenvolvimento das suas qualidades gastronômicas.

Além dessas funções de ordem tecnológica, atribuímos também às BL, que nós ingerimos vivas, atividades probióticas. Dizemos que uma bactéria possui uma atividade probiótica quando, se ingerida viva por um hospedeiro determinado, exerce sobre este um efeito benéfico direto ou indireto (Füller,

1989). Por exemplo, em animais de criação cuja alimentação foi suplementada com certas bactérias, estas agem no aumento da taxa de crescimento desses animais. Essa noção já havia sido suscitada por Metchnikoff, em 1908. Entretanto, ela só despertou interesse há poucos anos e se inscreve no quadro de evolução comportamental dos consumidores em busca de uma alimentação benéfica à saúde. As indústrias agroalimentares integraram esse novo desafio e assistimos ao aparecimento quase cotidiano de novos produtos, sobretudo lácticos, aos quais são atribuídas qualidades probióticas nem sempre comprovadas.

As atividades probióticas na atualidade

Três tipos de atividades probióticas foram estabelecidas cientificamente. A primeira é relacionada à digestibilidade

da lactose. Esse açúcar, presente em abundância nos produtos lácticos, pode induzir fenômenos de intolerância nos consumidores que possuam deficiência congênita em lactase, a enzima que o degrada. O quadro clínico pode ser traduzido por diarreias, cólicas abdominais ou flatulência. Curiosamente esses sintomas aparecem quando a lactose é absorvida do leite, mas são ausentes quando absorvidas do iogurte nas mesmas proporções. Existem duas explicações para o fenômeno: a flora bacteriana do iogurte (*Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*) (1º) suplementaria a deficiência em lactase do hospedeiro com a sua própria; (2º) estimulária, na mucosa intestinal do hospedeiro, a produção endógena da lactase.

Uma outra atividade probiótica exercida pelas BL é higienizar o tubo digestivo, que hospeda uma flora microbiana abundante, sendo que parte dela pertence ao grupo das bactérias lácticas. Essa flora exerce uma função importante na capacidade do hospedeiro de se defender de contaminações digestivas causadas pelas bactérias patogênicas. Assim, a flora endógena do hospedeiro estimulária as respostas imunitárias e teria uma função de barreira protetora ao ocupar os nichos procurados pelos patógenos. Além de servir de barreira protetora, certas BL mostraram-se capazes de diminuir os sinais clínicos ligados a infecções intestinais. Os resultados mais significativos foram obtidos com certos tipos de lactobacilos e também com os bifídios que se

A fermentação láctica constitui uma das formas mais antigas de conservação de produtos oriundos da agricultura ou da indústria agroalimentar. Esse tipo de fermentação está relacionado, em primeiro lugar, com os produtos lácteos (iogurte, queijos, manteiga, creme), mas também com carnes, frios, pão de levedo, chá, sidra, cerveja e vinho (fermentação maloláctica). A fermentação láctica é feita por diversas bactérias chamadas bactérias lácticas (BL) devido à sua atividade principal, que é a conversão dos açúcares do meio em ácido láctico. As espécies bacterianas em questão pertencem a cinco gêneros: *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Pediococcus*. São cocos ou bacilos gram-positivos que possuem uma percentagem em G+C no genoma inferior a 54. Devido a essa caracterização, existe uma controvérsia em se a espécie *Bifidobacterium* pertence ou não a esse grupo, pois ela possui mais de 55% de G+C no genoma.

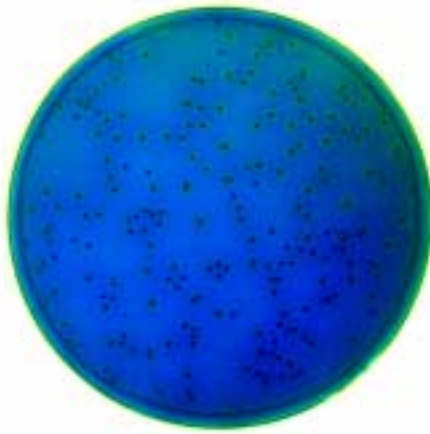


Figura 1. Detecção da nuclease produzida por clones de *Lactococcus lactis*. O meio de detecção contém DNA, ágar e um corante metacromático básico, o azul de toluidina. A interação do DNA com o azul de toluidina faz com que o estado nativo do meio seja azul. Em presença da nuclease, a degradação do DNA libera o corante que se fixa sobre o ágar do meio e a coloração torna-se rosa. Os clones azuis expressam, mas não exportam a nuclease; o acréscimo de um sinal de secreção permite a expressão do fenótipo Nuc⁺ revelado pela aparição de halos rosa em torno das colônias.

mostraram particularmente eficazes no tratamento das diarreias do recém-nascido.

Enfim, está bem estabelecido que certas linhagens de BL possuem atividades adjuvantes que estimulam a resposta imunitária do hospedeiro contra antígenos. Dos lactobacilos, a espécie *casei* mostrou-se capaz de estimular a resposta imunitária das crianças quando vacinadas por via oral contra o rotavírus, vírus responsável pela diarreia aguda infantil nos países em desenvolvimento (Isolauri *et al.*, 1995). Nós veremos que a atividade adjuvante das BL abre caminhos interessantes para aplicações na área médica.

Outras atividades probióticas para as BL foram propostas, e as mais interessantes são as atividades antiolesterolêmicas e antitumorais. No entanto, mais experiências ainda são necessárias para demonstrar que as BL exercem, de fato,

essas atividades *in vivo* (Marteau & Rambaud, 1993).

Em resumo, existem evidências de que as BL ingeridas vivas e em quantidades importantes (cerca de 10^8 bactérias por grama de alimento fermentado) são capazes de exercer efeitos biológicos sobre o hospedeiro. Como acabamos de ver, algumas dessas atividades são bem estabelecidas. Outras ainda necessitam de demonstração clara e reprodutível, como o uso de recursos como os testes de duplo cego e a inclusão de um grupo placebo. A dificuldade desse tipo de estudo é que freqüentemente, as linhagens bacterianas presentes nos produtos fermentados são selecionadas por meio de critérios tecnológicos e não probióticos. Além disso, as atividades procuradas são, freqüentemente de pouca intensidade, ficando difícil evidenciá-las em um ecossistema complexo como o tubo digestivo.

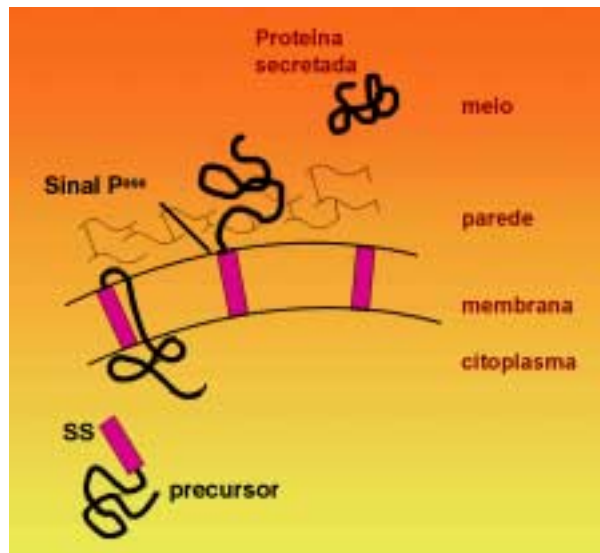


Figura 2. Secreção das proteínas pela via Sec-dependente. Ver texto com a descrição do mecanismo. SS, sequência sinal, Sinal P^{se}, peptídeo sinal.

...e no futuro

A partir do acúmulo dessas constatações, vários laboratórios, há alguns anos, tentaram superproduzir moléculas com efeitos probióticos nas BL. Essa perspectiva começou lentamente a se tornar realidade graças aos conhecimentos acumulados nos últimos 15 anos sobre a genética das BL, e, sobretudo, da *Lactococcus lactis*. Muitas técnicas genéticas estabelecidas para essa bactéria foram adaptadas para as outras espécies de BL. Hoje, podemos intro-

duzir DNA em um grande número de BL; foram também desenvolvidos instrumentos genéticos de um amplo espectro de hospedeiros (plasmídios, transposons, sistemas de expressão indutíveis, etc.) e a

seqüência de genomas de diversas espécies de BL está sendo feito.

A idéia é utilizar as BL como veículo de diversas atividades biológicas a serem introduzidas no tubo digestivo. Uma dessas poderá ser a de produzir enzimas para suplementar deficiências pancreáticas ou vitamínicas para melhorar a saúde do hospedeiro ou oferecer-lhe um melhor conforto intestinal. Essas aplicações se situam na área de desenvolvimento de produtos de um novo tipo de alimento, o "alimento-saúde". Nessa categoria de produtos, as BL não serão somente escolhidas pelas suas aptidões tecnológicas, mas também pelas suas atividades probióticas. Podemos pensar que, no futuro, um tipo de produto fermentado poderá ter várias versões, segundo o conteúdo das BL adaptadas a diferentes deficiências o que, por exemplo, facilitaria a digestão de certos glicídios ou suplementariam nutrientes raros, e outros.

Uma outra perspectiva particularmente atraente é utilizar as BL como vacinas vivas (Daugen, 1994). Nesse caso, tentaremos fazer com que as BL produzam antígenos ou peptídeos imunogênicos capazes de induzir uma resposta imunitária contra um certo patógeno. Essa seria uma solução promissora para controlar doenças endêmicas causadas por numerosos vírus ou bactérias patogênicas que entram no organismo pela via oral (como, por exemplo, água potável e alimentos) e se desenvolvem na mucosa digestiva. A mucosa digestiva é um órgão linfóide importante e a indução de imunidade de mucosa permite uma luta precoce contra numerosas infecções. A noção de vacina viva administrada oralmente é também atraente no âmbito sócio econômico: essas seriam vacinas de fácil administração e de baixo custo. Esses argumentos incitaram a Organização Mundial de Saúde (OMS) a colocar o desenvolvimento desse tipo de vacinas como objetivo prioritário de saúde pública. Nesse tipo de aplicação, as BL constituiriam uma nova categoria de produtos: "bactérias-medicamentos".

Dos genes às proteínas: pesquisas em andamento

Para desenvolver essas novas aplicações com as BL, as linhas de pesquisa seguiram basicamente os seguintes eixos:

• Seleção de linhagens de BL

É a seleção das linhagens de BL mais adaptadas para as aplicações desejadas. Um dos critérios importantes é sua resistência à forte acidez gástrica (~pH 2). Essa

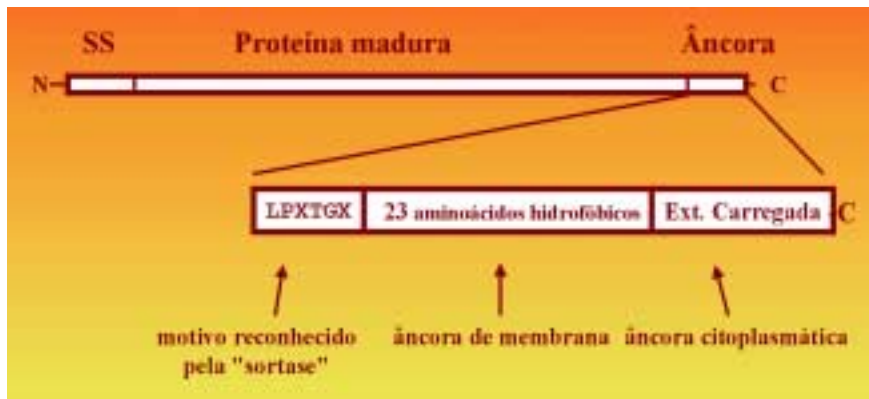


Figura 3A. A estrutura das proteínas ancoradas nas bactérias gram-positivas: estas proteínas são sintetizadas sobre a forma de precursor com uma sequência sinal N-terminal e uma sequência de ancoramento C-terminal; esta última tem uma estrutura composta de três partes, de um motivo LPXTGX, de um fragmento transmembrânico e de uma extremidade C-terminal com carga, frequentemente, positiva.

resistência ao ácido é variável de uma espécie para outra, mas podemos fazer adaptações ou modificações genéticas para aumentá-la.

Um outro critério é a capacidade de a linhagem se manter por menor ou maior tempo no tubo digestivo; certas BL, como as *L. Lactis*, transitam dentro do tubo digestivo e são rapidamente evacuadas nas fezes; outras, como certos lactobacilos, são capazes de colonizar o tubo digestivo. Uma ou outra dessas duas situações pode ser preferida, de acordo com a aplicação que pretendemos utilizar.

Um último critério a ser considerado é o caráter imunoestimulante das linhagens. Nós vimos que certas BL têm uma atividade adjuvante que potencializa a resposta imunitária. Mas o nível dessa imunoestimulação varia segundo as linhagens e esse parâmetro deve ser levado em consideração na elaboração de linhagens vacinais.

• Expressão (indutível) de genes heterólogos

No desenvolvimento de “alimentos-saúde”, procuramos identificar enzimas de BL cuja super expressão permitirá induzir efeitos benéficos para o hospedeiro. Neste caso fazemos uma autoclonagem ou pelo menos clonagem semi-homóloga (gene proveniente da mesma espécie ou do mesmo grupo microbiano). No caso de desenvolvimento de vacinas vivas o caso é oposto, porque procuramos produzir antígenos virais ou bacterianos.

Para estas aplicações, nós desenvolvemos técnicas para identificação de sinais (chamados promotores) que controlam a expressão gênica nas BL. Procuramos promotores ditos indutíveis. Estes

possuem uma atividade fraca ou nula mas, quando sobre a ação de um estímulo, iniciam ou aumentam fortemente a expressão do gene que eles controlam. As BL presentes dentro do tubo digestivo recebem um grande número de estímulos físico-químicos (temperatura de 37°C, presença de sais biliares, estados sucessivos de carência e abundância nutricional de acordo com o trânsito do bolo alimentar, etc...) e numerosos estudos são feitos no nosso laboratório para caracterizar promotores que respondem a estas variações do meio exterior.

• Exportação de proteínas heterólogas

Se a presença de um promotor “ad hoc” permite a expressão de um determinado gene, é necessário que, em seguida, o produto desse gene (enzima ou antígeno) seja produzido em um local que lhe facilite o contato com o seu substrato ou seu alvo. Na maioria dos casos, tentamos que essa enzima ou antígeno produzido seja apresentado no meio externo em sua forma livre (secreção), ou ligada aos envelopes bacterianos (ancorada). Nos dois casos, a proteína recém-sintetizada deve ser exportada, ou seja,

deve deixar o compartimento citoplasmático e ser dirigida para a parede celular ou para o meio externo. Essa proteína está sujeita a encontrar vários obstáculos, tais como proteases, que podem degradá-la ainda no citoplasma, a necessidade de atravessar a membrana citoplasmática e, posteriormente, a parede celular. Após essas etapas serem vencidas, a atividade desejada dependerá das moléculas estarem em sua conformação nativa.

Nosso laboratório está engajado nos estudos desses mecanismos de exportação, etapa obrigatória para controlar a produção de moléculas dotadas de atividades biológicas nas BL. Para facilitar nosso trabalho, escolhemos uma proteína modelo, NUC. Ela é uma nuclease de *Staphylococcus aureus*, enzima esta que degrada ácidos nucleicos e cuja atividade pode ser detectável por um teste de colorimetria (fig.1). Exploramos esse teste para detectar os clones de BL capazes de expressar e de exportar essa nuclease. Expressamos o gene da nuclease (*nuc*) em *L. lactis* (Le Loir *et al*, 1994). Quando somente a porção do gene *nuc* codificando para a enzima madura é expressa, a nuclease é produzida no citoplasma e os clones recobertos do meio de detecção, aparecem sobre fundo azul (fig.1). Por outro lado, quando a mesma porção de *nuc* é expressa em fusão com um sinal de secreção, a nuclease produzida pode ser detectada pelo aparecimento de halos rosa em torno das colônias (fig.1). A nuclease utilizada nesse experimento é chamada de repórter, pois sua atividade nos permite localizar as proteínas exportadas entre uma população heterogênea,

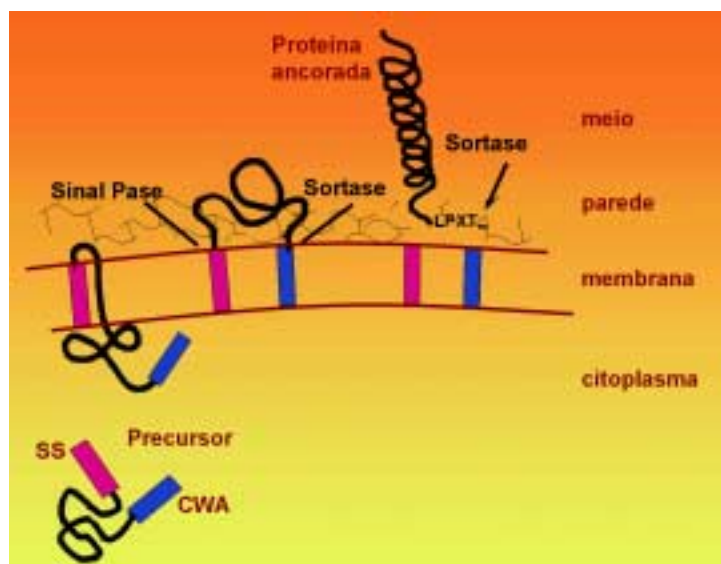


Figura 3B. O mecanismo de exportação das proteínas ancoradas, ver texto com descrição do mecanismo. CWA, *C*ell *W*all *A*nchor para a região de ancoramento à parede celular.

que contém também proteínas citoplasmáticas. Esse sistema repórter é usado no nosso laboratório em diferentes linhas de pesquisa.

• Pesquisa de sinais de exportação nas BL

Em todo o organismo vivo, as proteínas que serão exportadas para fora da célula possuem sinais que indicam ao organismo a sua localização final. Esses sinais podem ser de três tipos, mas todos os tipos são constituídos principalmente por aminoácidos hidrofóbicos. Eles são reconhecidos pela maquinaria de secreção celular que encaminha a proteína em direção à membrana através da qual ela é translocada (fig.2). O sinal hidrofóbico pode ser clivado por uma peptidase, sinal que tem o efeito de liberar a proteína madura no meio extracelular (é a secreção mostrada na fig.2) ou ser clivado no momento em que a proteína madura é modificada pelos ácidos graxos, o que leva à sua associação com a membrana ou, então, ficar inserida dentro da membrana, o que resulta em uma proteína transmembrânica. Para identificar as proteínas de *L. lactis* que possuam um tal sinal de exportação, utilizamos as propriedades de *nuc* como repórter (ver fig.1). Pela construção de uma biblioteca de DNA representativa do genoma bacteriano, construída na extremidade 5' do gene *nuc*, podemos identificar fragmentos de DNA que codificam sinais de exportação, pois os clones que integrem esses fragmentos de DNA tornam-se capazes de exportar a nuclease e de desenvolver, então, halos rosa. Caracterizamos desta maneira um grande número de sinais que permitem a exportação da nuclease (Poquet *et al.*, 1998).

• Caracterização da maquinaria de secreção de *L. lactis*

Desenvolvemos no nosso laboratório um vetor para mutagênese aleatória por transposição, que nos permitiu identificar genes implicados na secreção de proteínas (Maguin *et al.*, 1996). O postulado inicial é que a inserção do transposon nos vários loci do genoma pode gerar clones hiposecretadores (caso um gene constitutivo da maquinaria de secreção tenha sido

interrompido pelo transposon) ou hipersecretores de nuclease (no caso onde a inserção do transposon tenha desregulado um gene constituinte ou um colaborador da maquinaria de secreção). Os genes atingidos são em seguida sequenciados para construir, gradativamente, o quebra-cabeça dos componentes celulares implicados na secreção das proteínas. Como o genoma da linhagem IL 403 de *L. lactis* foi inteiramente sequenciado no nosso laboratório, procuramos por homologia, os genes que podem intervir no processo de exportação no sentido mais amplo das suas etapas mais precoces às mais tardias: da conformação e estabilidade da proteína, antes e depois da translocação.

• Caracterização da maquinaria de ancoramento das proteínas em *L. lactis*

Nas bactérias gram-positivas, as proteínas ancoradas à parede são sintetizadas sob a forma de um precursor que possui

uma sequência sinal N-terminal e um sinal de ancoramento C-terminal. Este último é constituído de cerca de trinta aminoácidos, sendo 20 deles hidrofóbicos, que formam um fragmento transmembrânico. O processo de exportação desse tipo de proteína é quase idêntico ao das proteínas secretadas que possuem um sinal que interage com a maquinaria de secreção celular. Entretanto, neste caso, a translocação da proteína é incompleta devido ao fato de o fragmento transmembrânico C-terminal impedir a sua transferência. (fig.3). A última etapa do processo de exportação é o corte da proteína a nível do motivo LPXTG e a formação de uma ligação peptídica entre o C-terminal da proteína e um aminoácido do peptídioglicano. O complexo enzimático que faz a hidrólise ao nível do motivo LPXTG e sua ligação à parede foi denominado de *sortase* e, por enquanto ainda não foi caracterizado. Com esse objetivo, o mesmo vetor de transposição é utilizado para fazer mutagênese dos clones capazes de ancorar a nuclease e então procuramos os transposantes capazes de secretá-la. O sequenciamento dos genes atingidos deve permitir identificar os componentes do sistema de ancoramento das proteínas em *L. lactis*. Esse estudo é importante em vários níveis. Permitirá o domínio da apresentação na superfície das moléculas úteis. Deverá também ter impacto importante na terapia das doenças infecciosas. Por analogia das estruturas C-terminais das proteínas ancoradas nas bactérias gram positivas, supomos que o mecanismo molecular de ancoramento das proteínas parietais seja conservado em todas essas bactérias. Entre as proteínas que se ancoram utilizando essa via, algumas são fatores de virulência de bactérias patogênicas como *Staphylococcus aureus* ou *Streptococcus pyogenes*. O complexo *sortase* nas bactérias gram-positivas podem ser um novo alvo na luta contra esses patógenos que, nos últimos anos, desenvolveram mecanismos de multiresistência aos antibióticos.

Das proteínas aos “alimentos-saúde” e vacinas vivas

Se a caracterização das maquinarias de exportação das proteínas devem, no futuro, permitir otimizar os sistemas de

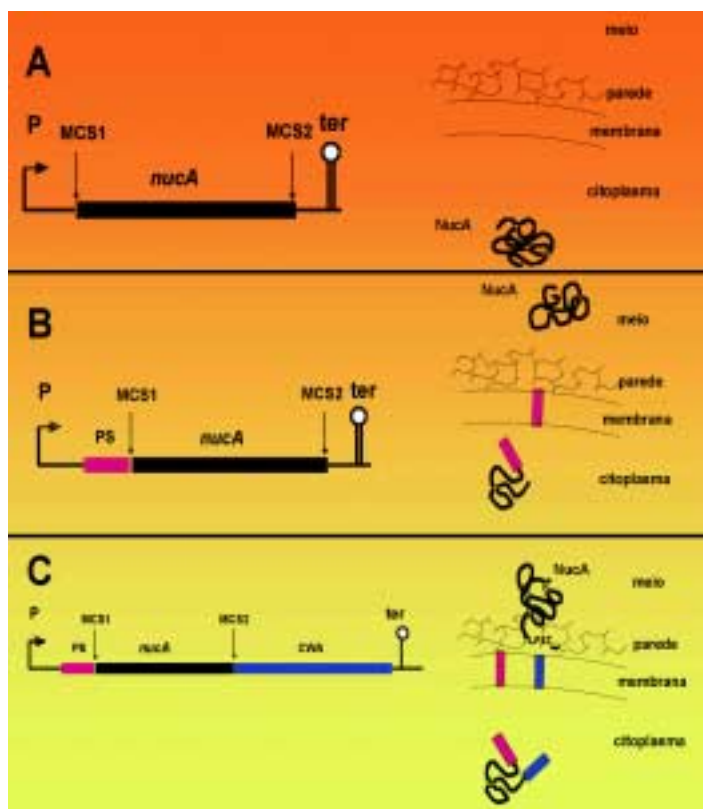


Figura 4. Os sistemas de expressão (A), de secreção (B) e de ancoramento (C) e a localização final da nuclease A dentro da célula. P, promotor; SS, sequência sinal, *nucA*, porção do gene da nuclease especificando a nuclease A; CWA, ver Fig. 3B; ter, terminador de transcrição; MCS, Múltiplos sítios de clonagem destinados à inserção de genes que codificam para peptídeos e proteínas desejadas.

GÊNETICA DE BACTÉRIAS LÁCTICAS

Os trabalhos feitos no Brasil com bactérias lácticas são essencialmente aplicados à indústria de alimentos e envolvem a utilização dessas bactérias em produtos fermentados, principalmente aqueles derivados do leite. Alguns grupos estão realizando estudos de taxonomia clássica e molecular, análises da diversidade genética entre as espécies isoladas de um mesmo meio ou de meios diferentes, análises da diversidade das espécies presentes dentro de ecossistemas microbianos que contêm bactérias lácticas (produtos alimentícios fermentados) e o papel desta diversidade dentro do funcionamento dos ecossistemas (manutenção ou desaparecimento das populações, atividade metabólica, expressão de genes específicos).

Mundialmente, os estudos genéticos que utilizam a biologia molecular das bactérias lácticas começaram na década de oitenta e resultados importantes começaram a aparecer recentemente. O repasse dessa tecnologia e o estabelecimento de colaborações com grupos que já estão trabalhando nessa tecnologia é de extremo interesse para o Brasil, sobretudo neste momento em que se discute e se regulamenta, no mundo inteiro, a utilização de microrganismos geneticamente modificados. Com esses objetivos, os professores Vasco Azevedo e Sérgio Costa Oliveira coordenaram um curso sobre Genética de Bactérias Lácticas realizado entre os dias 14 a 18 de setembro, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Contou com o patrocínio e apoio das pós-graduações em Bioquímica e Imunologia, Genética e Microbiologia e das empresas Pharmacia Biotech, Applied Biosystems Perkin Elmer, Gibco BRL Life Technologies, Nestlé Nutrição Infantil, Fiemg e CAPES. Os professores do curso fazem parte da equipe que escreveu este artigo. Todas as informações sobre esse evento podem ser obtidas na HOME PAGE:

<http://www.icb.ufmg.br/~vasco/baclar>.

exportação de moléculas úteis, os conhecimentos atuais permitem pensar nas suas aplicações. Dentro desse panorama, desenvolvemos vetores de expressão, de secreção e de ancoramento (Le Loir *et al.*, 1998; Piard *et al.*, 1997 a-b). Concebemos esses vetores com “cassetes” que nos permitem trocá-las entre si, o que possibilita modular o nível de expressão do gene de interesse e determinar a localização final do seu produto dentro da célula. O esquema do princípio desses vetores está representado na figura 4.

Esses vetores são atualmente utilizados para construir linhagens de BL produtoras de antígenos que serão administrados por via oral em modelos animais para caracterizar: (i) o nível de expressão necessário para gerar uma resposta imunitária, (ii) a relação entre a localização celular do antígeno testado (localização citoplasmática, na parede ou extracelular) e a natureza da resposta imune, (iii) o período necessário de permanência do vetor bacteriano no tubo digestivo para induzir uma resposta imune no hospedeiro. Nesse último ponto, utilizamos animais com a flora digestiva controlada, o que nos permite modular o tempo de permanência no tubo digestivo da bactéria apresentadora de antígeno.

Conclusões e perspectivas

As práticas alimentares de numerosos grupos de indivíduos os conduzem a ingerir quantidades impressionantes de BL. Essas bactérias absorvidas vivas são capazes de exercer, na mucosa intestinal, atividades biológicas inerentes a elas. A demonstração de um efeito biológico no hospedeiro é difícil, devido ao fato de o nível basal dessas atividades ser muito baixo. Para remediar esse problema, várias pesquisas foram empreendidas super-expressando certas atividades nessas bactérias para demonstrar de maneira absoluta os seus efeitos nos hospedeiros. Esse campo de investigação em saúde pública é fascinante e promissor.

Se o interesse atual por “produtos-saúde” é evidente, não devemos esquecer o clima de incerteza que envolve o desenvolvimento de organismos geneticamente modificados. Devemos privilegiar as vias de autoclonação, que evitam a introdução de DNA estrangeiro. Dentro desse panorama, devemos distinguir os produtos destinados à alimentação, nos quais devemos procurar “risco zero” para os consumidores, e os produtos oriundos de bactérias vacinais, para as quais o risco de disseminação horizontal deve ser inferior aos riscos de uma população exposta a certo patógeno de sofrer com a doença. Neste último caso, o desenvolvimento de

sistemas de confinamento que impeçam a sobrevivência das bactérias no ambiente devem ser procurados.

Referências Bibliográficas

Dougan G. 1994. The molecular basis for the virulence of bacterial pathogens: implications for oral vaccine development. *Microbiol.* 140: 215-224.

Fuller R. 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66: 365-378.

Isolauri E., Joensuu J., Suomalainen H., Luomala M. et Vesikari T. 1995. Improved immunogenicity of oral D_xRRV reassortant rotavirus vaccine by *Lactobacillus casei* GG. *Vaccine* 13: 310-312.

Le Loir Y., Gruss A., Ehrlich D. et Langella P. 1994. Direct screening of recombinants in Gram positive bacteria using the secreted Staphylococcal nuclease as a reporter. *J. Bacteriol.* 176: 5135-5139.

Le Loir Y., Gruss A., Ehrlich S.D. et Langella P. 1998. A nine-residue synthetic propeptide enhances secretion efficiency of heterologous proteins in *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 180 : 1895-1903.

Maguin E., Prevost H., Ehrlich S.D. et Gruss A. 1996. Efficient insertional mutagenesis in Lactococci and other Gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* 178 : 931-935.

Marteau P. et Rambaud J.C. 1993. Potential of using lactic acid bacteria for therapy and immunomodulation in man. *FEMS Microbiol. Rev.* 12 : 207-220.

Metchnikoff E. 1908. The prolongation of life. Optimistic studies. G.P. Putman's Sons, New York, Londres.

Piard J.C., Hautefort I., Fischetti V.A., Ehrlich S.D., Fons M. et Gruss A. 1997a. Cell wall anchoring of the *Streptococcus pyogenes* M6 protein in various lactic acid bacteria. *J. Bacteriol.* 179: 3068-3072.

Piard J.C., Jimenez-Diaz R., Fischetti V.A., Ehrlich S.D. et Gruss A. 1997b. The M6 protein of *Streptococcus pyogenes* and its potential as a tool to anchor biologically active molecules at the surface of lactic acid bacteria. *Streptococci and the Host*, édité par Horaud *et al.* Plenum Press, New York.

Poquet I., Ehrlich S. D. et Gruss A. 1998. An export-specific reporter designed for Gram-positive bacteria: application to *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 180: 1904-1912.

Agradecimentos

Agradecemos aos nossos colegas do INRA pelas sugestões e reflexões preciosas.

Queremos também demonstrar o nosso reconhecimento à Dra. Alexandra Gruss pelo seu dinamismo e apoio na realização dos nossos trabalhos.

FUNDAÇÃO
DALMO GIACOMETTI



Transferência genômica Parcial

Pedro Canisio Binsfeld

Institut für Landwirtschaftliche Botanik
Universität Bonn - Alemanha
ulp50b@uni-bonn.de

Emprego no melhoramento de plantas

O melhoramento de plantas tem como propósito o desenvolvimento de novas cultivares que, adaptadas às condições de cultivo, sejam capazes de promover uma estável e elevada produtividade, assim como a qualidade desejada do produto. Visto sob o aspecto metodológico, o melhoramento de plantas é genética aplicada. A sistematização de programas de melhoramento genético de plantas teve início no começo do século, após a redescoberta dos trabalhos de Gregor Mendel, que elaborou as leis básicas da herança genética. Através da aplicação conseqüente dessas leis, foi possível, durante este século, duplicar, triplicar ou, em alguns casos, como por exemplo o do trigo, quadruplicar a produtividade média por hectare (Ordon & Fried, 1998). Evidentemente, o incremento na produtividade não está somente baseado no melhoramento, mas também na melhoria das condições de cultivo e no manejo adequado das culturas.

Até meados da década de 80, os métodos clássicos foram os grandes responsáveis pelo desenvolvimento das novas cultivares. Porém, nos últimos anos, o melhoramento clássico recebeu como ferramentas auxiliares diversas técnicas baseadas no cultivo de tecidos vegetais e biologia molecular, que ampliaram os horizontes na busca da diversidade alélica necessária em um programa de melhoramento. Essas técnicas possibilitam ao melhorista transcender o pool gênico primário, utilizado no melhoramento clássico, permitindo a incorporação de novos alelos ao genoma que confirmam as características desejáveis à cultura.

Das estratégias biotecnológicas disponíveis para transferência gênica entre espécies, a transformação genética é vantajosa quando se trata da transferência de caracteres monogênicos, isto é, características gênicas controladas por um único gene. E quando esse gene de interesse está disponí-



Figura 1. Diagrama esquemático mostrando as etapas básicas da hibridação somática assimétrica, por meio do uso de micronúcleos para a transferência genômica parcial

vel e clonado em um vetor (normalmente plasmídeo), que se encarregará de transferi-lo ao genoma da planta. Entretanto, até o momento, somente um limitado número de monogênicos identificados e clonados estão disponíveis para ser transferidos. Porém, a grande maioria dos caracteres de interesse econômico (produtividade, diversas resistências a pragas e moléstias, tolerância a stresses) são características controladas por poligenes ou genes que tenham mecanismos moleculares desconhecidos. E esses genes controlados por poligenes não podem ser transferidos por meio da técnica da transformação. Nesse caso, a estratégia da hibridação somática apresenta-se como uma alternativa apropriada.

Hibridação somática

Entende-se por hibridação somática simétrica a fusão completa de dois protoplastos com os dois genomas, incluindo o citoplasma e as organelas celulares. O uso dessa tecnologia requer que sejam atendidas 2 condições básicas: primeiro, o isolamento de protoplastos deve ser em quantidade suficiente para se estabelecer um cultivo, e segundo, os protoplastos devem ser totipotentes, isto é, deverão ter a capacidade de proliferar e regenerar uma nova planta. Essas condições básicas já estão estabelecidas para mais de 320 espécies (Binsfeld, 1998). Nas espécies em que mais se utiliza essa técnica são as das famílias solanaceae e brassicaceae. Entretanto, mais recentemente, em muitas outras espécies tem sido empregada com êxito no melhoramento, incluindo espécies recalcitrantes. Entre essas, encontram-se vários membros das famílias da Poaceae, Fabaceae, Rosaceae, além de várias espécies florestais, incluindo frutíferas e essências florestais (Bajaj, 1996).

Por meio da hibridação somática, oferece-se também a possibilidade de gerar variabilidade pela: a) superação da incompatibilidade sexual entre plantas, b) produção de amfidiplóides, c) transferência de DNA citoplasmático, e d) transferência genômica parcial (fragmentação do núcleo da célula doadora).

A hibridação somática comparada à transformação genética não é específica em relação ao resultado buscado, pois a introgressão ou a transferência gênica não são precisamente controladas, o que, na seqüência, envolve um processo de seleção. Porém, em muitas espécies de plantas, assim como na transformação genética, a fusão de protoplastos possibilitou a superação da incompatibilidade sexual. Ao contrário dos genes introduzidos por meio das técnicas de DNA recombinante, essa técnica torna possível a transferência de características gênicas controladas principalmente por poligenes.

Na hibridação somática simétrica (fusão de dois protoplastos completos), normalmente o número de cromossomos do híbrido é a soma dos cromossomos dos genótipos envolvidos na fusão, além das organelas de ambos os parceiros. Durante a primeira divisão da célula híbrida, será definida a composição cromossômica, bem como das organelas que irão compor as células nas próximas gerações. Híbridos somáticos simétricos, pela sua complexa combinação genômica, necessitam de sucessivas gerações de retrocruzamentos com o genótipo desejado no sentido de introduzir somente a característica desejada. Isso, por sua vez, limita seu uso direto em programas de melhoramento, dada a elevada demanda de tempo e disponibilidade de recursos necessários (Ramulu et al., 1995). Por isso, cresce o interesse por métodos de hibridação somática que limitem a transferência genômica durante o processo da fusão, surgindo o que se denomina *transferência genômica parcial* por meio de hibridação somática assimétrica.

Hibridação somática assimétrica

Consiste na transferência parcial do genoma da célula doadora para uma célula somática receptora. Isso pode ocorrer de variadas formas. Primeiro, a eliminação do genoma doador pode ser induzida mediante o uso da radiação antes da fusão de protoplastos. Outras formas de transferência genômica parcial podem ser por meio de microinjeção ou ainda pela fusão de microprotoplastos contendo micronúcleos com um ou poucos cromossomos do genoma doador. Em geral, o tratamento com radiação reduz a quantidade de DNA transferido, porém, é muito variável e instável. Além disso, a eliminação dos cromossomos é aleatória, de modo que não é possível prever qual será a parte do genoma que será transferido pela fusão assimétrica (Waara & Glimelius, 1995).

Uma maneira de contornar esse problema consiste na identificação de marcadores genéticos que estejam ligados aos genes de interesse agrônomo nos respectivos cromossomos. Por meio dos marcadores genéticos e o uso das técnicas de citometria de fluxo e micromanipulação, consegue-se selecionar os cromossomos ou micronúcleos portadores desses genes, e desta forma pode-se controlar o processo da transferência genômica parcial usando microprotoplastos.

Uso de microprotoplastos como estratégia de transferência genômica parcial

Uma técnica desenvolvida recentemente,

que vem despertando o interesse dos melhoristas é a fusão com microprotoplastos. Microprotoplastos são micronúcleos contendo uma fina camada de citoplasma e envoltos por uma membrana plasmática. Já os micronúcleos são cromossomos condensados de forma isolada no interior da célula e são envoltos por uma membrana nuclear. Essa técnica permite transferir, de forma controlada, um limitado número de cromossomos de uma célula doadora para uma célula receptora, por meio da fusão com microprotoplastos contendo um micronúcleo com um ou poucos cromossomos, ou, ainda, permite a transferência direta dos micronúcleos através de microinjeção. O diagrama esquemático da Figura 1 mostra as principais etapas desse processo de

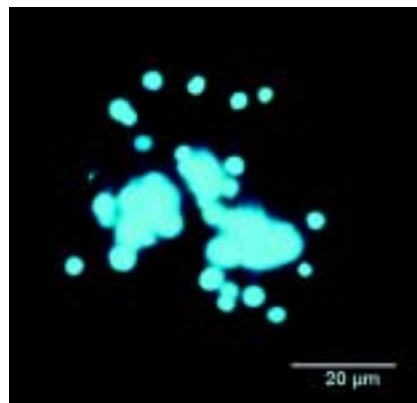


Figura 2. Célula com diversos micronúcleos corados com DAPI e visualizado sob luz ultravioleta em um microscópio de fluorescência

micronucleação e transferência genômica parcial por meio de fusão ou microinjeção.

Entre as etapas mais importantes da transferência genômica parcial por meio de microprotoplastos ou microinjeção, tem-se: 1) o desenvolvimento de uma cultura celular de crescimento ativo; 2) a indução de micronúcleos pelo uso de antimitóticos; 3) o isolamento e seleção de micronúcleos ou microprotoplastos pequenos; 4) a transferência de micronúcleo ou microprotoplasto para a célula receptora; 5) a regeneração e seleção dos híbridos parciais.

A primeira etapa consiste no desenvolvimento de uma suspensão de células que serão usadas como doadoras dos micronúcleos ou microprotoplastos. É condição fundamental que haja desenvolvimento de uma cultura celular em ativo crescimento, de forma sincronizada, de tal maneira que se tenha uma elevada percentagem de células que entrarão em divisão ao mesmo tempo, ou

seja, que estejam em metáfase, para então aplicar os agentes antimitóticos.

Na segunda etapa, induz-se a micronucleação. A micronucleação em plantas pode ser induzida pela exposição prolongada de células mitóticas a agentes que inibem a polimerização dos microtúbulos que formam as fibras dos fusos. Esses agentes se ligam diretamente aos monômeros da tubulina. A colchicina ou os herbicidas Amiprofós metil (APM), Oryzalin ou Cremat são potentes agentes antimitóticos em células de plantas. Na presença dos agentes antimitóticos, durante a metáfase celular, os cromossomos separam-se e distribuem-se de forma isolada ou em pequenos grupos, pela célula. Pela disfunção das fibras do fuso, os cromossomos metafásicos não se separam em duas cromátides irmãs. Após algumas horas, esses são envoltos pela membrana nuclear, resultando na formação de vários pequenos núcleos denominados de micronúcleos (Figura 2).

Na terceira etapa, 24 h após a aplicação dos antimitóticos, adiciona-se Citochalasina-B (CB) que, além de estabilizar os micronúcleos formados, tem por finalidade tornar o processo da micronucleação mais eficaz.

Na quarta etapa, faz-se o isolamento dos micronúcleos ou microprotoplastos. Para tornar o isolamento eficaz, é fundamental que se remova a parede celular das células micronucleadas por meio da digestão enzimática. Após a remoção da parede celular, as células são incubadas por 4 h sob refrigeração (4°C), na presença de spermidina. Esta tem por finalidade proteger o complexo membranário das células micronucleadas.

A quinta etapa consiste na separação dos micronúcleos ou microprotoplastos da célula. Nessa etapa, já deverá estar definido o procedimento metodológico que será usado para transferir o genoma parcial para a célula receptora, o qual pode ser pela fusão química ou pela microinjeção. No primeiro caso, isolam-se os microprotoplastos por meio de ultracentrifugação (120.000 g por 2 h) em um gradiente isosmótico de Percoll. Após, separam-se as bandas formadas com peneiras de nylon de decrescentes tamanhos de poros (20, 15, 10, 5 e 3 µm). No segundo caso, faz-se a lise das células micronucleadas em solução hipotônica, onde a célula se romperá, liberando os micronúcleos: estes serão coletados mediante uma leve centrifugação para separar fragmentos celulares dos micronúcleos, seguindo-se uma filtração sequencial, conforme descrito para o primeiro caso.

A sexta etapa, é a etapa da fusão ou da transferência por microinjeção. Os microprotoplastos coletados, conforme descrito

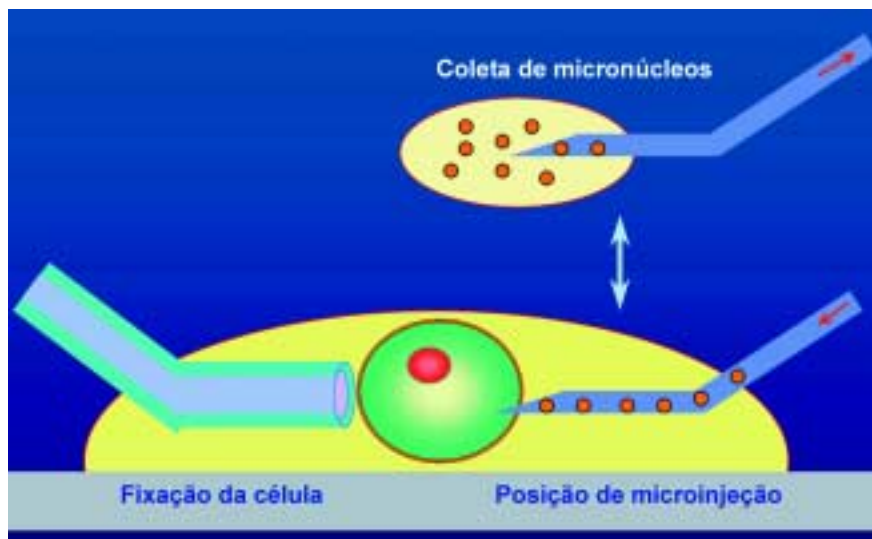


Figura 3. Representação esquemática do processo da microinjeção. Acima está representado a primeira etapa que corresponde a coleta dos micronúcleos e abaixo está representado o posicionamento da célula (protoplasto) para a microinjeção

acima, poderão ser fusionados com protoplastos receptores, mediada por um agente químico, como, por exemplo, o polietileno glicol (PEG). Nesse caso, o protoplasto receptor e o microprotoplasto serão colocados em contato por poucos minutos, na presença de PEG, em uma solução rica em íons de cálcio. Após a fusão, as células são lavadas para remover o PEG, que, em exposição prolongada, se torna tóxico às células. No caso do uso da microinjeção, o procedimento consiste no carregamento da micropipeta do manipulador com micronúcleos, seguindo-se a injeção dos micronúcleos nas células, como mostra na Figura 3. A vantagem da microinjeção em relação à fusão com PEG é o fato desta ser um evento dirigido, isto é, tem-se o controle sobre a quantidade de micronúcleos injetados por célula. Enquanto que no procedimento da fusão química, poderá ocorrer a fusão de um ou mais micronúcleos por célula.

As células receptoras, ou seja, os produtos da fusão e da microinjeção, são cultivados até a fase do desenvolvimento de calo. Os calos formados são transferidos para um meio de diferenciação e regeneração de brotos e raízes, obtendo-se, assim, um híbrido parcial.

A natureza híbrida parcial da planta pode ser identificada pelos caracteres morfológicos, citológicos ou moleculares. Caso haja marcadores moleculares, a análise da natureza híbrida já poderá ser feita durante a fase de calo, o que se mostra como grande vantagem, pois evita todo o

processo de regeneração, que, muitas vezes, é dispendioso, tanto pelo aspecto de tempo como de trabalho.

Aplicação da técnica de micronúcleos no melhoramento de plantas

A tecnologia da hibridação somática assimétrica pelo uso dos micronúcleos encontra inúmeras aplicações em programas de melhoramento de plantas, bem como em estudos das interações genômicas a nível somático. O uso dessa técnica permite:

1) transferência de caracteres desejáveis entre espécies sexualmente incompatíveis. A incompatibilidade sexual entre espécies cultivadas e suas formas silvestres é, assim, superada. Dessa forma, as espécies silvestres podem ser usadas em programas de melhoramento buscando transferir genes de resistência a pragas e moléstias ou tolerância a estresses ambientais ao genótipo cultivado;

2) transferência de caracteres controlados por poligenes ou mesmo de caracteres controlados por genes desconhecidos. Características importantes como resistência a doenças, estresses ambientais ou caracteres ligados à produção são controladas por um variado número de genes que interagem entre si. Estes se encontram com frequência em blocos dentro do genoma. Sendo assim, a transferência de um ou de poucos cromossomos é capaz de transferir um grupo de genes em um único passo;

3) produção de linhas monossômicas e dissômicas em uma única etapa. Isso economiza tempo e um prolongado processo de retrocruzamento necessário para obter tais linhas via método sexual. A partir de linhas monossômicas ou dissômicas, é possível obter substituição ou recombinação entre cromossomos (translocação in-

tergenômica);

4) análise eficiente de genes doados aos híbridos parciais intergenéricos ou interespecíficos, assim como, propicia o estudo básico sobre genes introduzidos (alterações estruturais, deleção, inativação ou cosupressão);

5) estudos sobre a localização dos genes nos cromossomos. Genes podem ser precisamente localizados se for produzida uma população suficientemente grande de linhas monossômicas. Pode ser igualmente empregado no mapeamento de genes específicos aos cromossomos.

6) construção de bibliotecas de cromossomos, tendo por finalidade a análise genômica em trabalhos de melhoramento de plantas a nível molecular. Pode facilitar a clonagem direta de segmentos de DNA nos cromossomos via microcromanipulação (laser), recortando segmentos cromossômicos e os substituindo por segmentos selecionados.

A questão fundamental da técnica aqui apresentada é, em primeiro lugar, a possibilidade da transferência genômica parcial e, associada a esta, a transferência de caracteres poligênicos e segundo, por meio de um refinamento técnico, nos possibilita sectionar segmentos cromossômicos que permitam a transferência de complexos gênicos, resultando assim numa transferência controlada de grupos gênicos. A decisão do uso desta técnica no melhoramento de plantas depende do objetivo e das características genéticas que se deseja transferir.

Bibliografia

Bajaj, Y.P.S. *Biotechnology in Agriculture and Forestry 27, Somatic Hybridization in crop improvement*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1994.

Binsfeld, P.C. *Transferência genômica parcial entre espécies sexualmente incompatíveis por meio de hibridação somática assimétrica*. Tese de Doutorado, UFPel, Pelotas, 1998. 130 p.

Binsfeld, P.C.; Wingender, R.; Schnabl, H. *A protoplast growth procedure for sunflower species (*Helianthus* spp.) in liquid culture*. *Helia*, (in press).

Orton F. & Friedt W. *Von Mendel zum Gentransfer*. Mann-Verlag, 1998. 101 p.

Ramulu, K.S.; Dijkhuis, P.; Rutgers, E.; Blass, J.; Verbeek, W.H.J.; Verhoeven, H.A.; Colijn-Hooymans, C.M. *Microprotoplast fusion technique: a new tool for gene transfer between sexually-incongruent plant species*. *Euphytica*, 85: 255-268, 1995.

Waara S. & Glimenius, K. *The potential of somatic hybridization in crop breeding*. *Euphytica*, 85: 217-233, 1995.