

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

LAÍS DANIELA EV

IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE LACTOBACILOS MEDIANTE
SEQUENCIAMENTO PARCIAL DE GENES CONSTITUTIVOS

Porto Alegre

2014

LAÍS DANIELA EV

IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE LACTOBACILOS MEDIANTE
SEQUENCIAMENTO DE GENES CONSTITUTIVOS

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação
em Odontologia da Faculdade de
Odontologia da Universidade Federal
do Rio Grande do Sul, como requisito
parcial para obtenção do título de
Cirurgião-Dentista.

Orientadora: Prof. Dra. Clarissa
Cavalcanti Fatturi Parolo

Porto Alegre

2014

CIP - Catalogação na Publicação

Ev, Laís Daniela

Identificação de espécies de lactobacilos mediante sequenciamento parcial de genes constitutivos / Laís Daniela Ev. -- 2014.

27 f.

Orientadora: Clarissa Cavalcanti Fatturi Parolo.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Curso de Odontologia, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Lactobacilos. 2. pheS. 3. rpoA. 4. groEL. 5. Genes constitutivos. I. Parolo, Clarissa Cavalcanti Fatturi, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, fonte de tudo o que sou, fonte infinita de amor incondicional que me guia em tudo o que faço, amo vocês.

A meu namorado, Rafael, que me encoraja a sempre realizar o melhor de mim. Muito obrigada por acreditar em mim em todos os momentos, muito deste mérito devo a ti.

Agradeço a minha orientadora por seu empenho, dedicação e carinho que tornaram este ano de trabalho mais leve e prazeroso, muito obrigada.

Ao grupo PET por contribuir enormemente em minha formação acadêmica e cidadã, não poderia imaginar como teriam sido meus anos de faculdade sem o suporte de vocês. Especialmente à professora Susana, que me tutorou e inspirou em todos os momentos, obrigada.

Aos colegas do LABIM que me ajudaram amplamente para a consolidação deste trabalho, obrigada por toda ajuda nos trabalhos laboratoriais, aos quais eu não estava acostumada, especialmente à Luiza Mercado, Ariel Rup e Nailê Damé. Aos demais colegas de laboratório, agradeço por tornarem este ambiente tão agradável e confortador, adorei trabalhar com vocês.

A vida é um grande espetáculo. Só não
consegue homenageá-la quem nunca
penetrou dentro de seu próprio ser e
percebeu como é fantástica a
construção de sua inteligência.
Augusto Cury

RESUMO

Ev, Laís Daniela. **Identificação de espécies de lactobacilos mediante sequenciamento de genes constitutivos**. 2014. 27 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

O sequenciamento do gene 16S rRNA apresenta limitações na identificação de espécies de Lactobacilos devido à presença de polimorfismos e de múltiplas cópias deste gene. No sentido de aprimorar a classificação filogenética e superar estas limitações surge a proposta do uso de genes constitutivos, também chamados *housekeeping* genes, que são genes responsáveis pelo metabolismo bacteriano na identificação de lactobacilos. O presente estudo teve como objetivo avaliar o uso dos genes constitutivos *pheS* (subunidade α da fenilalanina), *rpoA* (subunidade α da RNA polimerase) e *groEL* (*hsp60* ou *60-kDa* proteína de choque térmico) na identificação de espécies de lactobacilos orais mediante o sequenciamento parcial destes genes. A metodologia utilizada consistiu na extração do DNA bacteriano de amostras de dentina, seguida pela amplificação dos genes *pheS*, *rpoA* e/ou *groEL* por PCR e sequenciamento dos mesmos. As sequências foram comparadas quanto à sua homologia com sequências de nucleotídeos do banco de dados do Centro Nacional de Informação Biotecnológica (NCBI) dos Estados Unidos. Definiu-se que similaridades deveriam ser iguais ou superiores a 97% para classificação das espécies. Os lactobacilos identificados nesse estudo pertencem às espécies *L. paracasei* (n= 41), *L. rhamnosus* (n= 32), *L. plantarum* (n=1). Na identificação de lactobacilos orais tanto o gene *pheS* quanto o gene *groEL* são marcadores filogenéticos confiáveis e com bom poder discriminatório. No entanto, para os *L. rhamnosus* o gene *groEL* mostrou-se mais eficiente do que o gene *pheS*. O gene *rpoA* não mostrou-se efetivo como marcador filogenético para lactobacilos orais. Assim, sugere-se o uso do sequenciamento parcial do gene *groEL* como primeira alternativa na identificação genotípica de lactobacilos orais e, em casos de não amplificação, o gene *pheS* pode ser utilizado.

Palavras-chave: Lactobacilos. *pheS*. *rpoA*. *groEL*. Genes constitutivos.

ABSTRACT

Ev, Laís Daniela. **Identification of lactobacillus species by housekeeping genes sequencing.** 2014. 27 f. Final Paper (Graduation in Dentistry) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

The 16S rRNA gene sequencing shows limitation on *Lactobacillus* species identification due to the presence of polymorphisms and multiple copies of this gene. In order to improve phylogenetic classification and overcome this limitations, it was introduced the proposal of the study is to use constitutive genes, also called housekeeping genes, that are responsible for the bacterial metabolism for lactobacillus identification. The present study aims to evaluate the use of *pheS* (α fenilalanin subunit), *rpoA* (α of RNA polymerase subunit) and *groEL* (*hsp60* ou *60-kDa* thermal shock proteins) genes partial sequencing in the identification of oral *Lactobacillus* species. The present approach consisted of DNA extraction of lactobacilli previous isolated from dentin, followed by the PCR amplification of the genes *pheS*, *rpoA* and/or *groEL* genes and sequencing. The sequences were compared by the homology with sequences from the National Center of Biotechnology Information (NCBI) of United States database nucleotides. Similarities were defined to be equal or higher than 97% for species taxonomy. The lactobacilli identified from this study were *L. paracasei* (n= 41), *L. rhamnosus* (n= 32), *L. plantarum* (n=1) species. For the lactobacilli identification either *pheS* gene or *groEL* gene were reliable phylogenetic markers with good discriminatory capacity. However, for *L. rhamnosus* the gene *groEL* was more efficient than *pheS*. The *rpoA* gene was not an effective filogenetic marker. Hence, it is suggested that the partial sequence of the *groEL* gene should be the first alternative on oral lactobacillus genotypic identification, and when its amplification is not possible, *pheSgroEL* gene should be used instead.

Keywords: *Lactobacillus*. *pheS*. *rpoA*. *groEL*. Housekeeping genes.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	OBJETIVO	12
3	METODOLOGIA	13
4	RESULTADOS	17
5	DISCUSSÃO	22
6	CONCLUSÃO	25
	REFERÊNCIAS	26

1 INTRODUÇÃO

Lactobacilos são microrganismos produtores de ácido láctico que compreendem o maior grupo de gram-positivos, não-esporulados, bastonetes e catalase-negativos (HAMMES; VOGEL, 1995; ROGOSA et al., 1951). O gênero *Lactobacillus* pertence à classe *Bacilli*, da ordem dos *Lactobacillales* e da família *Lactobacillaceae* (TANNOCK, 1999; FELIS; DELLAGLIO, 2007). São bactérias acidogênicas e acidúricas (TANNOCK, 1999), características que lhes conferem a capacidade de produzir ácido láctico e de sobreviver em meio ácido, respectivamente.

Estes microrganismos constituem parte da microbiota normal do trato gastrointestinal, vaginal e da cavidade bucal de humanos e animais, desempenhando um importante papel na resistência à colonização exógena, potencialmente de microrganismos patogênicos (VONDRUSKOVA et al., 2010; HAMMES; VOGEL, 1995; KLEIN et al., 1998).

Os lactobacilos representam cerca de 1% da microbiota bucal, sendo as espécies *L. casei* e *L. fermentum* as mais comuns. Diferentes espécies e concentrações de lactobacilos podem ser isoladas das diferentes superfícies do meio bucal. Na saliva os lactobacilos mais comumente encontrados são os *L. acidophilus* e *L. fermentum*, e, em menor quantidade *L. rhamnosus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. salivarius*, *L. xylosus* e *L. delbrueckii* (BADET; THEBAUD, 2008). No biofilme dentário e em dentina cariada são maiores as concentrações de *L. casei* e *L. fermentum*, podendo também ser encontrados *L. rhamnosus*, *L. paracasei*, *L. lactosus*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. salivarius*, *L. pentosus*, *L. brevis*, *L. delbrueckii* e *L. gasseri* (BADET; THEBAUD, 2008).

Eles aparecem durante o primeiro ano de vida, estando presentes em maior número na saliva, no dorso da língua, nas mucosas, no palato duro, no biofilme dentário e, em menor número, na superfície dentária (SOCRANSKY; MANGANIELLO, 1971; STRAETEMANS et al., 1998). A presença de lactobacilos na cavidade bucal depende de diversos fatores e principalmente, da presença de nichos onde estes microrganismos possam se estabelecer como fissuras e sulcos dentários, terceiros molares parcialmente erupcionados e aparelhos ortodônticos (LOESCHE et al., 1984).

Os lactobacilos foram os primeiros microrganismos a serem considerados cariogênicos, porém, atualmente se considera que não são iniciadores, mas sim envolvidos na progressão do processo carioso (JORGE, 2007). Um estudo realizado na Grã Bretanha analisou a presença de

bactérias associadas à doença cárie no biofilme dental de crianças de sete a nove anos de idade. Quanto aos lactobacilos os autores relatam que apenas uma pequena quantidade desses microrganismos estava presente no biofilme dental antes do aparecimento da doença cárie, o que indica que estes microrganismos provavelmente contribuem pouco para o início da cárie. No entanto, a presença de grandes quantidades de lactobacilos dentro das lesões de cárie indica o envolvimento destas bactérias na progressão da doença cárie (IKEDA; SANDHAM; BRADLEY, 1973).

Em alguns casos, lactobacilos também podem desempenhar um papel benéfico no meio bucal, inibindo o crescimento de algumas bactérias cariogênicas. Em seu estudo, Michalek et al. (1981) apresentou evidências de que, ao invés de contribuir para o progresso das lesões de cárie, *L. casei*, quando presentes no biofilme dentário, podem reduzir a concentração de *Streptococcus mutans* em ratos gnobióticos cárie induzidos (BADET; THEBAUD, 2008). A presença de lactobacilos na cavidade bucal é considerada benéfica ao hospedeiro, no entanto, quando há desequilíbrio ecológico os lactobacilos da cavidade bucal podem estar relacionados à doença cárie por serem altamente acidogênicos e produtores de ácido lático, que é considerado o ácido de maior cariogenicidade.

A contagem de lactobacilos tem sido usada como coadjuvante no diagnóstico da atividade cariogênica e pode servir como marcador da adesão do paciente ao tratamento, pois haverá diminuição da contagem de lactobacilos como efeito das alterações dietéticas e/ou selamento de cavidades cariosas. O cultivo e a identificação de lactobacilos podem ser aplicados no diagnóstico, tratamento e prevenção da cárie dentária (KRASSE, 1988; JORGE, 2007).

Historicamente os lactobacilos presentes na cavidade bucal eram analisados de maneira quantitativa, com o cultivo e a contagem de unidades formadoras de colônias de lactobacilos. No entanto, com o avanço dos estudos sobre a etiologia da doença cárie, a análise qualitativa de lactobacilos passou a ser importante para a identificação de lactobacilos associados com saúde e doença, pois se constatada a implicação de determinadas espécies de lactobacilos na doença, a etiologia da doença cárie poderia ser melhor caracterizada. Esse conhecimento tem o potencial de melhorar o diagnóstico, a prevenção e o tratamento da cárie dentária.

Apesar da importância da identificação dos lactobacilos presentes na cavidade bucal, a maioria dos estudos atuais analisa os lactobacilos apenas de maneira quantitativa, mesmo que a análise qualitativa específica das espécies seja interessante no intuito de comparar as espécies presentes na cavidade bucal de indivíduos saudáveis e as encontradas na saliva, biofilme dental

ou amostras de dentina de indivíduos cárie ativos (BADET; THEBAUD, 2008). A classificação dos lactobacilos a partir de características fisiológicas e metabólicas muitas vezes não mostra correlação com os resultados de estudos filogenéticos com sequenciamento do *16S* rRNA (BLAIOTTA et al., 2008). E por isso, a identificação genotípica tem sido considerada como método de escolha para a caracterização dos lactobacilos orais. A análise precisa e individualizada das cepas é importante do ponto de vista científico e industrial. A relação taxonômica e filogenética entre espécies é muitas vezes delineada em função do tipo de cepa, que, portanto, precisa ser representativo (DELLAGLIO; FELIS; TORRIANI, 2002).

Os lactobacilos são geneticamente diversos, apresentando grande variação na percentagem de Guaninas e Citosinas em seu genoma (33 a 52% G+C %mol) (LONDON, 1976). O número de espécies está continuamente sendo modificado devido à descrição de novas espécies e/ou à reclassificação de outras (BLAIOTTA et al., 2008). Até o presente momento foram descritas 202 espécies e 29 subespécies de lactobacilos (LPSN, 2014).

A análise de espécies de lactobacilos é amplamente estudada na indústria alimentícia, no entanto, são poucos os estudos relacionados à identificação genotípica de lactobacilos bucais (LIPINSKI et al., 2003). Diversos autores utilizam o sequenciamento do gene 16S rRNA para a identificação fenotípica de lactobacilos, no entanto esta análise é problemática pois não permite a identificação precisa das espécies de lactobacilos. Múltiplas cópias do gene 16S rRNA com diferentes polimorfismos já foram descritas em *L. paracasei/casei*, *L. rhamnosus* e *L. zae* por Vasquez et al. (2005). A presença de polimorfismos e de múltiplas cópias do 16S rRNA pode explicar o baixo poder discriminatório do sequenciamento desse gene no gênero lactobacilos (VASQUEZ et al., 2005). A utilização de genes constitutivos (housekeeping genes - responsáveis pelo metabolismo bacteriano) surge como alternativa para superar esta limitação.

A utilização dos genes *pheS* (subunidade α da fenilalanina) e *rpoA* (subunidade α da RNA polimerase) tem provado ser um sistema confiável para a identificação de todas as espécies reconhecidas do gênero *Enterococcus* (NASER et al., 2007). A análise simultânea dos genes *pheS* e *rpoA* proporciona uma alternativa na identificação confiável e rápida de diferentes espécies de lactobacilos, apresentando um poder discriminatório maior do que o da análise com 16S rRNA. A variação no poder discriminatório dos genes investigados, juntamente com o fato de que diferentes genes podem fornecer árvores topológicas parecidas, destacou a necessidade de análise simultânea de vários *loci* codificadores de proteínas para uma análise de identificação robusta (NASER et al., 2005).

A análise do gene *groEL* (*hsp60*) também mostra-se como um marcador confiável para a identificação de qualquer espécie de lactobacilos, permitindo uma identificação rápida e confiável de lactobacilos, além da discriminação de espécies com similaridades (BLAIOTTA et al., 2008).

Entretanto, há carência da literatura que embase a melhor escolha de genes alternativos ao 16S rRNA e que seja apropriado para a identificação espécie específica de lactobacilos orais.

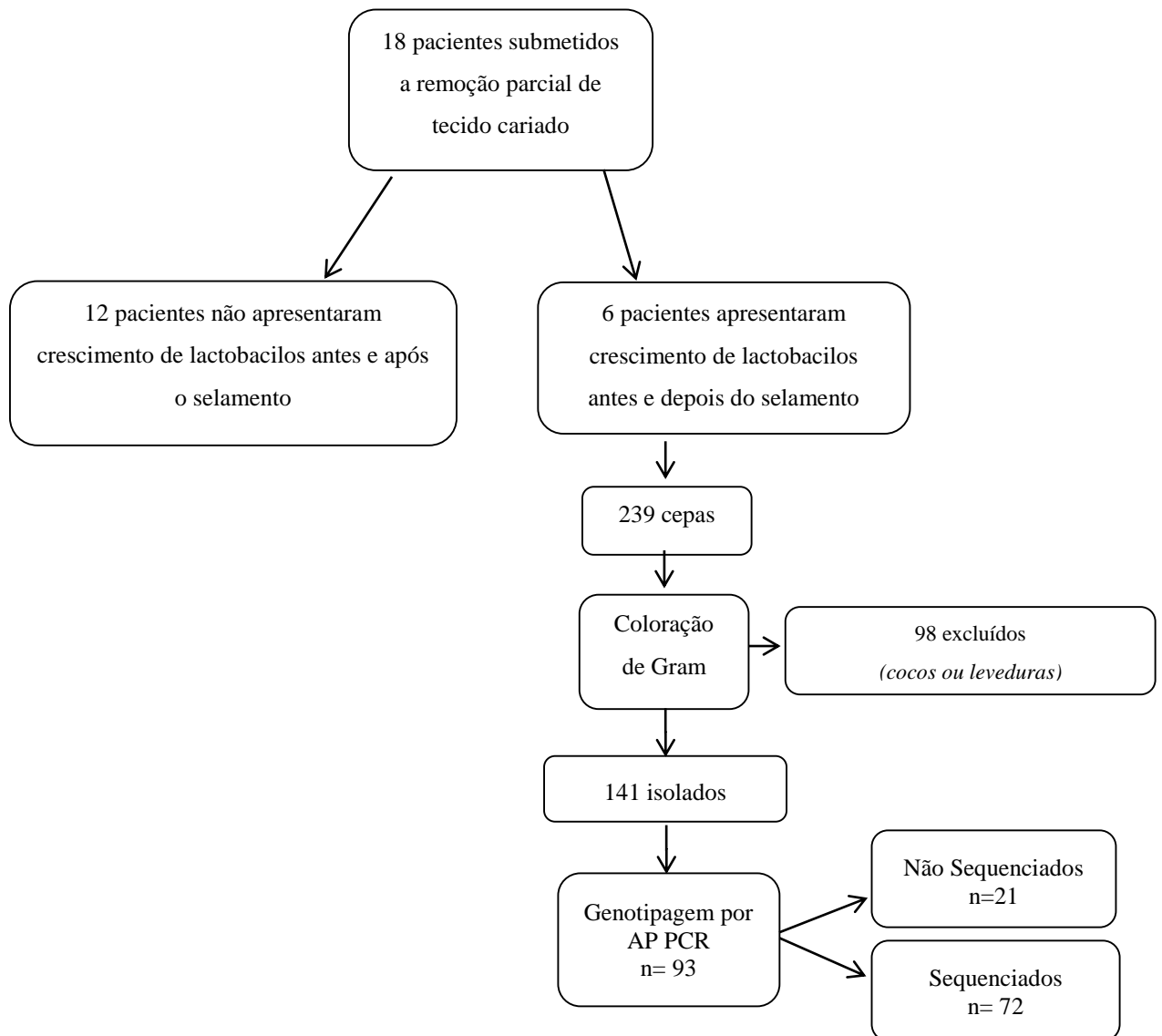
2 OBJETIVO

Avaliar o uso dos genes constitutivos *pheS* (subunidade α da fenilalanina), *rpoA* (subunidade α da RNA polimerase) e *groEL* (*hsp60* ou *60-kDa* proteína de choque térmico) na identificação de espécie específica de lactobacilos orais mediante o sequenciamento parcial destes genes.

3 METODOLOGIA

Os lactobacilos analisados nesse estudo foram provenientes de seis dos 18 pacientes participantes de um ensaio clínico randomizado realizado com amostras de dentina cariada selada (FIRMINO, 2011). Duas amostras por paciente foram coletadas: uma antes e outra após três meses de selamento cavitário. As amostras foram, então, cultivadas em ágar Rogosa para o crescimento seletivo de colônias de prováveis lactobacilos e foram selecionados até sete isolados por tipo morfológico por amostra. Todos os isolados foram submetidos à coloração de Gram. Os bacilos Gram-positivos foram armazenados em BHI glicerol 15% (Himedia, Mumbai, Índia) para posteriormente serem realizadas as análises genotípica e fenotípica. Previamente à identificação a nível de espécies, os isolados foram genotipados pela técnica de AP-PCR (DALALBA, 2013). De um total de 141 isolados de prováveis lactobacilos, 93 foram genotipados e, destes, 72 puderam ser identificados. A figura 1 mostra o fluxograma do estudo até a obtenção da amostra total de isolados estudados.

Figura 1- Fluxograma mostrando a amostra total de isolados estudados.



Fonte: da autora, 2014

O estudo desenvolveu-se na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, no Departamento de Odontologia Preventiva e Social, no laboratório de Bioquímica e Microbiologia Bucal. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (processo nº 19218). Foi obtido o consentimento informado de todos os participantes.

Para a identificação dos isolados a nível de espécie, foi realizada a extração de DNA genômico através de lactobacilos provenientes de estoques congelados e incubados em BHI ágar (Himedia, Mumbai, Índia) por 24h a 37°C em microaerofilia. A partir desta cultura, o DNA

genômico foi extraído através da suspensão de uma alça de cultura de 5 µL em 50 µL de água ultrapura estéril, sendo realizada leve fricção contra as paredes do tubo de micro centrífuga para lisar as membranas celulares bacterianas.

A identificação das espécies de lactobacilos foi realizada através da amplificação dos genes *pheS* (subunidade α da fenilalanina), *rpoA* (subunidade α da RNA polimerase) ou *groEL* (hsp60 ou 60-kDa proteína de choque térmico) por PCR do DNA extraído em termociclador Techne TC – 312 (Techne, Cambridge, United Kingdom). Inicialmente, as sequências iniciadoras para o gene *pheS* foram utilizadas e, no caso de não haver amplificação, o gene *rpoA* foi amplificado, no caso de ainda não haver amplificação, foi sequenciado o gene *groEL*. As sequências de nucleotídeos iniciadores estão relacionadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Sequências de nucleotídeos

Nome do primer	Sequência (5' → 3')	Gene	Temperatura de anelamento	Referência
<i>pheS-21F</i>	CAYCCNGCHCGYGAYATGC	<i>pheS</i>	57°C/56°C/55°C	(Naser et al., 2005)
<i>pheS-23R</i>	GGRTGRACCATVCCNGCHCC			
<i>pheS-22R</i>	CCWARVCCRAARGCAAARCC			
<i>rpoA-21F</i>	ATGATYGARTTTGAAAAACC	<i>rpoA</i>	50°C	(Naser et al., 2005)
<i>rpoA-23R</i>	ACHGTRTTRATDCCDGCRCG			
<i>groEL1F</i>	GAAGGNATGAAGAAYGTBAC	<i>groEL</i>	47°C	(Podlesny et al., 2011)
<i>groEL1R</i>	AATGTHCCACGVATCTTG			

Para a reação de PCR foram utilizados 2,5 µL de tampão 10X; 1,5 µL MgCl₂ 25mM; 1 µL dNTP (3,125 mM); 0,5 µL Taq polymerase (AB-gene, Epsom, UK); 1 µL de cada oligonucleotídeo iniciador; e 1 µL de DNA alvo em 16,5 µL de água ultrapura estéril. O volume final da reação foi de 25 µL. O programa de amplificação para *pheS 21F/23 ou 22R* foi: desnaturação inicial do DNA por 5 min a 95 °C; 5 ciclos de 1 min a 95 °C; 2min15s a 57 °C e 1min15s a 72 °C; 15 ciclos de 35s a 95 °C, 1min15s a 56 °C e 1min15s a 72 °C; 10 ciclos de 35s a 95 °C; 1min15s a 55 °C e 1min15s a 72 °C; e extensão final de 7 min a 72 °C. O programa de amplificação para *rpoA 21F/23R* foi de desnaturação inicial do DNA por 5 min a 95 °C; 5

ciclos de 1min a 95 °C; 2min15s a 55 °C e 1min15s a 72 °C; 15 ciclos de 35s a 95 °C; 1min15s a 50 °C e 1min15s a 72 °C; 10 ciclos de 35s a 95 °C, 1min15s a 48 °C e 1min15s. O programa de amplificação para *groELIF/IR* foi de desnaturação inicial do DNA por 5 min a 94 °C; 30 ciclos de 30s a 94 °C; 1min a 47 °C e 2min a 72 °C; e extensão final de 10min a 72 °C. Os produtos da PCR foram separados em gel de agarose 1% contendo SyBR Green (Invitrogen) através de eletroforese com 50 volts por 10 minutos. A visualização do produto da PCR foi realizada através de transiluminador UV com aquisição digital da imagem.

Havendo um único fragmento, o produto da PCR era purificado através da utilização do kit de purificação PureLink quick PCR purification kit (Invitrogen, Löhne, Alemanha) e enviado para sequenciamento de Sanger. Nessa análise apenas uma das fitas de DNA foi sequenciada. O protocolo de ciclagem e purificação seguiu as orientações do fabricante. Para a reação de sequenciamento, os oligonucleotídeos iniciadores foram diluídos a 3pmol e enviados juntamente com a amostra para serem sequenciados. O sequenciamento foi realizado utilizando-se o sequenciador ABI 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, Warrington, UK) da empresa ACTgene (UFRGS, Porto Alegre, Brasil). Após, as sequências de nucleotídeos obtidas foram manualmente editadas utilizando o programa BioEdit (versão 7.0.8, Ibis Biosciences, Isis Pharmaceuticals).

Para identificação das cepas, as sequências foram comparadas quanto à sua homologia com sequências de nucleotídeos do banco de dados do Centro Nacional de Informação Biotecnológica dos Estados Unidos (NCBI, 2014). As sequências do gene *groEL* foram comparadas também quanto a sua homologia com sequências de nucleotídeos do banco de dados cpnDB (Chaperonin Sequence Database, 2014). Definiu-se que similaridades deveriam ser iguais ou superiores a 97% para classificação das espécies. Após a análise dos dados foi confeccionado um dendograma mostrando a relação filogenética dos lactobacilos isolados utilizando o programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) versão 5.2.1, para os genes *pheS* e *groEL*.

4 RESULTADOS

Os lactobacilos identificados nesse estudo pertencem às espécies de *L. paracasei* (56,95%), *L. rhamnosus* (44,45%) e *L. plantarum* (1,39%), conforme mostra a Tabela 2. A espécie de lactobacilos mais frequentemente encontrada nas amostras de dentina cariada foi *L. paracasei*. O resultado da homologia com sequências de nucleotídeos do gene *groEL* do banco de dados do Centro Nacional de Informação Biotecnológica (NCBI) dos Estados Unidos e do banco de dados cpnDB (Chaperonin Sequence Database) foram semelhantes. Do total de 72 isolados, 39 foram sequenciados com o gene *pheS*, 37 foram sequenciadas com o gene *groEL* e 4 foram sequenciados com ambos os genes, apresentando em dois casos concordância com a espécie identificada e em dois casos discordância. A reação de PCR com os oligonucleotídeos para o gene *rpoA* não apresentou amplificação. De forma interessante, a maioria dos isolados que não amplificaram com os oligonucleotídeos para o gene *pheS* eram da espécie de *L. rhamnosus* (29 de 72) ou em poucos casos (8 de 37) *L. paracasei*.

A Figura 2 mostra a análise filogenética dos lactobacilos a partir do sequenciamento parcial do gene *pheS*. Pode-se observar a formação de clusters/grupos. O primeiro grupo concentra o maior número de isolados com 38 das amostras pertencentes à espécie *L. paracasei*. O segundo cluster mostra ATCC do *L. casei* e do *L. zae* que se mostram agrupadas na árvore filogenética. O terceiro grupo é composto por amostras de *L. rhamnosus*. Uma amostra foi identificada como pertencente à espécie *L. plantarum*. As demais espécies de lactobacilos puderam ser separadas em diferentes grupos através da análise filogenética com exceção das espécies *L. gasseri* e *L. johnsonii*.

A figura 3 mostra a relação filogenética dos lactobacilos analisados a partir do sequenciamento parcial do gene *groEL*. Assim como no gene *pheS*, a amostra apresentou diferentes agrupamentos. O primeiro grande grupo é de *L. rhamnosus*. O segundo é composto por *L. casei* e *L. zae*, como no dendograma do gene *pheS*. O terceiro grupo é composto pelo grupamento de *L. paracasei*. As demais espécies conseguiram ser diferenciadas entre si com exceção das espécies de *L. gasseri* e *L. johnsonii* e de *L. crispatus* e *L. acidophilus*.

Tabela 2 - Classificação das espécies dos lactobacilos isolados de acordo com o gene sequenciado e sua respectiva homologia.

(continua)

Código cepas	Espécie	Gene sequenciado	Homologia
12	L. paracasei	<i>pheS</i>	100%
14	L. paracasei	<i>pheS</i>	100%
15	L. paracasei	<i>pheS</i>	100%
16	L. paracasei	<i>pheS</i>	100%
17	L. paracasei	<i>groEL</i>	100%
18	L. paracasei	<i>pheS</i>	100%
19	L. paracasei	<i>pheS</i>	100%
22	L. paracasei	<i>pheS</i>	100%
24	L. paracasei	<i>pheS</i>	98%
36	L. paracasei	<i>pheS</i>	100%
44	L. paracasei	<i>pheS</i>	99%
45	L. paracasei	<i>pheS</i>	100%
47	L. paracasei	<i>groEL</i> <i>pheS</i>	100% 99%
50	L. rhamnosus	<i>groEL</i>	99%
51	L. paracasei	<i>pheS</i>	100%
55	L. paracasei	<i>pheS</i>	100%
56	L. paracasei	<i>pheS</i>	100%
59	L. paracasei	<i>pheS</i>	100%
61	L. paracasei	<i>pheS</i>	97%
64	L. paracasei	<i>pheS</i>	100%
67	L. paracasei	<i>pheS</i>	100%
68	L. paracasei	<i>pheS</i>	100%
69	L. paracasei	<i>pheS</i>	100%
70	L. paracasei	<i>pheS</i>	100%
72	L. paracasei	<i>pheS</i>	100%
75	L. paracasei	<i>groEL</i>	96%
77	L. rhamnosus	<i>groEL</i>	100%
78	L. paracasei	<i>pheS</i>	97%
79	L. rhamnosus	<i>groEL</i>	100%
82	L. paracasei	<i>groEL</i>	100%
86	L. paracasei	<i>pheS</i>	100%
87	L. paracasei	<i>pheS</i>	100%
91	L. rhamnosus	<i>groEL</i>	99%
93	L. rhamnosus	<i>groEL</i>	100%
98	L. rhamnosus	<i>groEL</i>	100%
99	L. rhamnosus	<i>groEL</i>	99%

(conclusão)

Código cepas	Espécie	Gene sequenciado	Homologia
100	L. rhamnosus	<i>groEL</i>	99%
101	L. rhamnosus	<i>groEL</i>	100%
102	L. rhamnosus	<i>groEL</i>	100%
103	L. rhamnosus	<i>groEL</i>	100%
104	L. rhamnosus	<i>groEL</i>	100%
106	L. rhamnosus	<i>groEL</i>	100%
107	L. rhamnosus	<i>groEL</i>	97%
108	L. rhamnosus	<i>groEL</i>	100%
110	L. plantarum	<i>pheS</i>	98%
115	L. paracasei	<i>groEL</i>	100%
117	L. rhamnosus	<i>groEL</i>	99%
118	L. paracasei	<i>pheS</i>	100%
119	L. rhamnosus	<i>groEL</i>	100%
129	L. rhamnosus	<i>groEL</i>	99%
133	L. rhamnosus	<i>groEL</i>	99%
134	L. rhamnosus	<i>groEL</i>	99%
135	L. rhamnosus	<i>pheS</i>	99%
136	L. paracasei	<i>pheS</i>	100%
138	L. rhamnosus	<i>pheS</i>	99%
139	L. rhamnosus	<i>groEL</i>	95%
140	L. rhamnosus	<i>groEL</i>	99%
142	L. rhamnosus	<i>groEL</i>	97%
143	L. rhamnosus	<i>groEL</i>	97%
164	L. rhamnosus	<i>groEL</i>	100%
179	L. paracasei	<i>pheS</i>	99%
180	L. rhamnosus	<i>groEL</i>	97%
181	L. paracasei	<i>pheS</i>	100%
182	L. paracasei	<i>pheS</i>	100%
184	L. paracasei	<i>groEL</i>	99%
		<i>pheS</i>	100%
185	L. rhamnosus	<i>groEL</i>	98%
	L. paracasei	<i>pheS</i>	100%
188	L. rhamnosus	<i>groEL</i>	99%
	L. paracasei	<i>pheS</i>	99%
193	L. rhamnosus	<i>groEL</i>	95%
196	L. paracasei	<i>groEL</i>	100%
197	L. rhamnosus	<i>groEL</i>	99%
203	L. paracasei	<i>pheS</i>	100%
204	L. paracasei	<i>pheS</i>	100%

Figura 2 - Análise filogenética de lactobacilos gerada a partir do sequenciamento parcial do gene *pheS* (388 pb). As cepas identificadas com as letras *pheS* seguidas de números representam os lactobacilos isolados da dentina cariada. As cepas identificadas pelas letras AM seguidas de números foram obtidas de bases de dados do Pubmed.

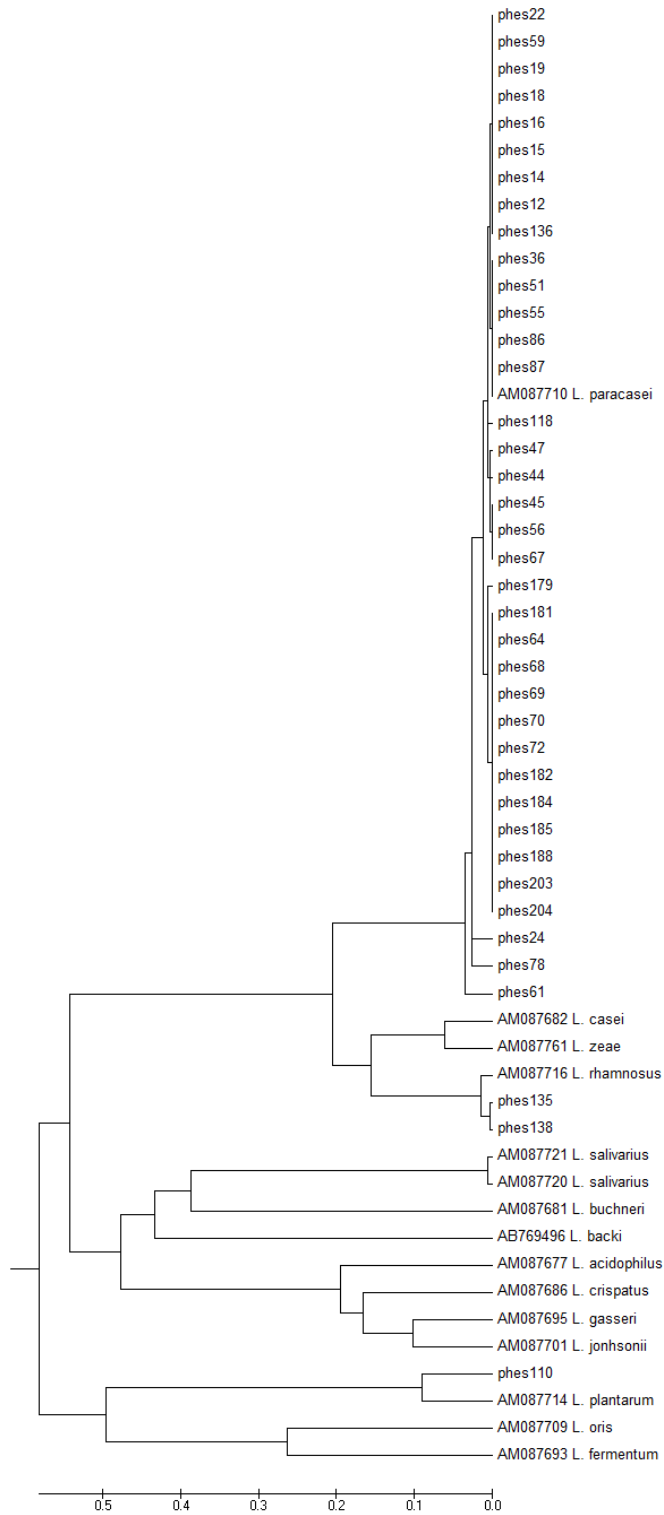
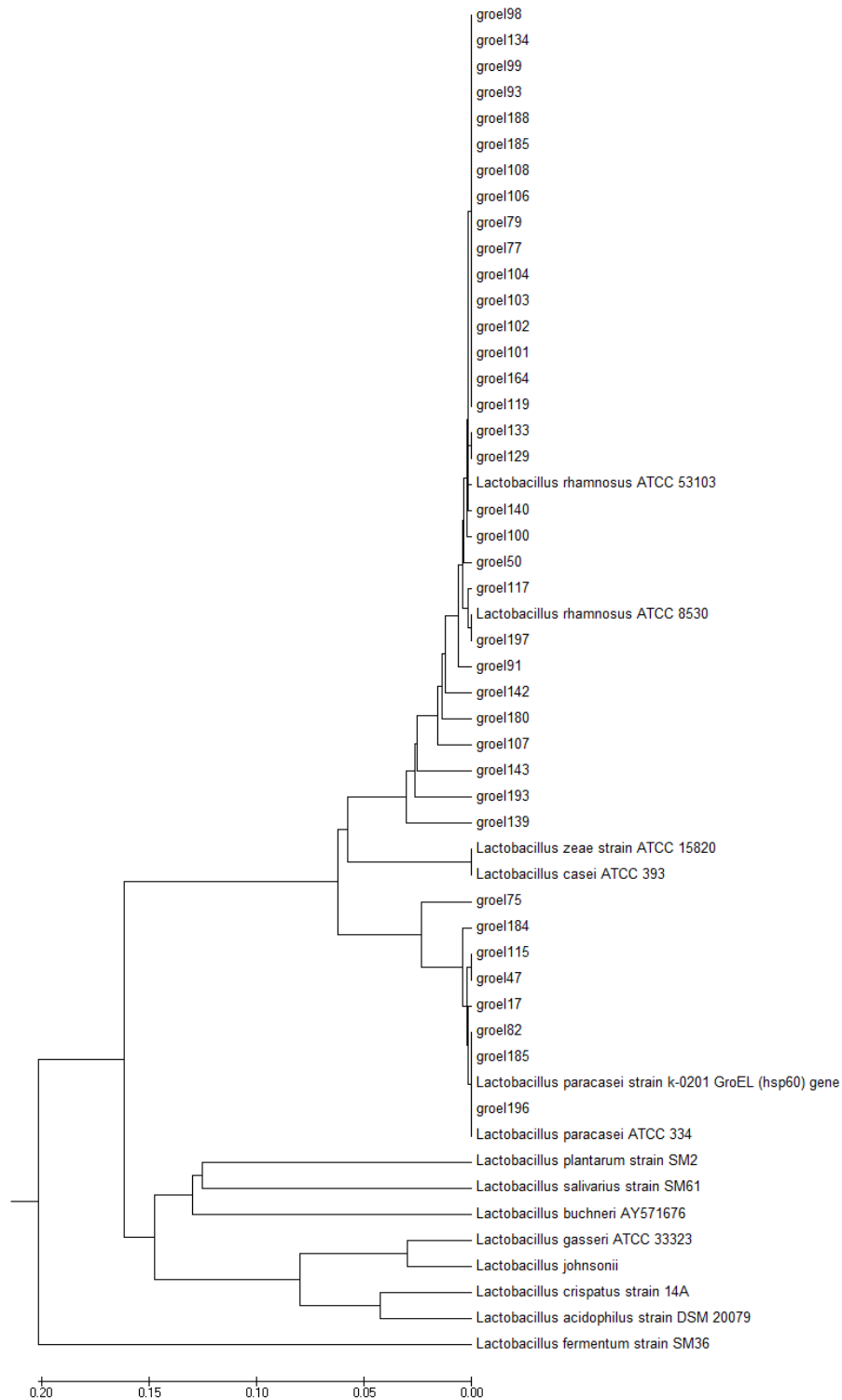


Figura 3 - Análise filogenética de lactobacilos gerada a partir do sequenciamento parcial do gene *groEL* (303 pb). As cepas identificadas com as letras *groEL* seguidas de números representam os lactobacilos isolados da dentina cariada. As cepas identificadas pelos nomes das espécies foram obtidas de bases de dados do Pubmed.



5 DISCUSSÃO

O gene 16S rRNA tem sido considerado como padrão na identificação de isolados no estudo de ecologia microbiana e de diagnóstico molecular. Apesar disso, espécies próximas não são passíveis de diferenciação através do sequenciamento do gene 16S rRNA, como é o caso dos lactobacilos (NASER et al., 2007). Além disso, múltiplas cópias com sequências variadas no genoma bacteriano limitam o uso do gene 16S rRNA na identificação de isolados (WANG; WANG, 1997). Outros genes conservados, que também são universais, têm sido propostos como opções de marcadores filogenéticos na identificação de lactobacilos apresentando um bom poder discriminatório. Genes que codificam proteínas podem diferir e evoluir mais rapidamente do que genes que codificam a estrutura molecular do RNA, nos quais pequenas alterações nas sequências de nucleotídeos podem ser catastróficas (HILL et al., 2004).

Genes presentes em cópia única são ideais como marcadores moleculares para identificação de isolados. Alguns genes já testados na identificação de lactobacilos foram *tuf* (VENTURA et al., 2003; CHAVAGNAT et al., 2002), *recA* (FELIS et al., 2001; TORRIANI; FELIS; DELLAGLIO, 2001), *mle* (GROISILLIER; LONVAUD-FUNEL, 1999), *ISLplI* (PETROVIC; NIKSIC; BRINGEL, 2006) e *groEL* (BLAIOTTA et al., 2008). Estudos anteriores indicam o sequenciamento dos genes *pheS* e *rpoA* como alternativas interessantes para identificação de lactobacilos (NASER et al., 2007) pois avaliaram um grande número de espécies de lactobacilos. Um estudo anterior realizado com lactobacilos orais sequenciou 222 lactobacilos orais utilizando esses genes (PAROLO, 2009) e identificou *L. paracasei*, *L. fermentum*, *L. rhamnosus* e *L. gasseri*. No presente estudo, o gene *rpoA* mostrou-se pouco efetivo na identificação de lactobacilos de dentina cariada pois não pode ser amplificado em vários isolados. A literatura aponta que o sequenciamento do gene *rpoA* em *Enterococcus* gerou uma classificação de espécies similar a obtida com o sequenciamento do gene 16S rRNA, e que o sequenciamento do gene *pheS* foi mais adequado para o delineamento de espécies, do que o gene *rpoA* (NASER et al., 2005). Levando em consideração o desempenho inferior do gene *rpoA* em comparação ao gene *pheS* para *Enterococcus* e a falta de amplificação com o gene *rpoA* em lactobacilos de dentina cariada, descartamos este gene como um marcador filogenético para lactobacilos orais. O gene *pheS* pode ser amplificado em 52% dos isolados. O gene *pheS* apresenta maior poder discriminatório em relação ao gene 16S rRNA e já foi utilizado para identificação de lactobacilos (NASER et al., 2007).

Em geral, se dois organismos compartilham similaridade inferior a 97% na sequência do gene analisado, pode-se dizer que eles são pouco relacionados no nível genômico e, portanto, de espécies diferentes. Por outro lado, quando o sequenciamento desses genes apresenta similaridade igual ou superior a 97%, indica serem de espécies muito próximas (FELIS; DELLAGLIO, 2007). Em nosso estudo, um isolado apresentou homologia de 96% o que é considerado inferior ao valor ideal para classificação da espécie. Apesar disso, consideramos a cepa como *L. paracasei* por entender que se trata de uma bactéria muito semelhante a esta espécie, pois ficou agrupada ao mesmo cluster na árvore filogenética.

A análise do sequenciamento do gene *pheS* apresenta uma variação interespecies superior a 10% de divergência e, intraespecies superior a 3% (NASER et al., 2007). As espécies de *L. gasseri* e *L. johnsonii*, *L. casei* e *L. zae* não puderam ser diferenciadas entre si nem com o gene *pheS* nem com o gene *groEL*. Existe até mesmo uma tentativa de reclassificação do *L. casei* para *L. zae* (DELLAGLIO; FELIS; TORRIANI, 2002). *L. crispatus* e *L. acidophilus* puderam ser diferenciados através do sequenciamento do gene *pheS* e não pelo *groEL*. O poder discriminatório dos genes *pheS* e *groEL* pode variar conforme as espécies de lactobacilos estudadas (CLAESSON; SINDEREN; O'TOOLE, 2008; NASER et al., 2007). No estudo de lactobacilos orais o grupo dos *L. casei*, que compreende as espécies *L. rhamnosus*, *L. paracasei*, *L. zae* e *L. casei*, é bastante importante e deve ser considerado na escolha dos marcadores filogenéticos disponíveis. O poder discriminatório para o grupo dos *L. casei* foi semelhante para o gene *pheS* e para o *groEL*. Muitos dos *L. rhamnosus* e alguns *L. paracasei* não puderam ser amplificados com o gene *pheS*. O sequenciamento do gene *groEL* foi a alternativa encontrada para tentar identificar adequadamente os lactobacilos que não foram sequenciados pelo gene *pheS*. Estudos anteriores comprovam a superioridade do gene *groEL* como marcador filogenético em relação ao 16S rRNA (CLAESSON; SINDEREN; O'TOOLE, 2008). Além disso, outra vantagem para ter-se escolhido o gene *groEL* é a possibilidade de utilização de um banco de dados específicos para sequências desse gene (HILL et al., 2004).

Deve-se ter o cuidado na interpretação da homologia utilizando o NCBI pois muitas vezes sequências de *L. paracasei* são erroneamente identificadas com *L. casei*. Esse impasse no resultado obtido pode ser esclarecido através da construção de árvores filogenéticas incluindo as cepas ATCC 393 (*L. casei*) e ATCC334 (*L. "casei"*). Se o isolado aproxima-se filogeneticamente da cepa ATCC 393 ele é um verdadeiro *L. casei*. Caso aproxime-se da cepa ATCC 334 pode ser considerado como *L. paracasei*. Ao se fazer o BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) a homologia das sequências dos lactobacilos variou de 96 a 100%. A

literatura aponta como referência homologia de no mínimo 97%, em nosso estudo apenas uma amostra apresentou homologia inferior a este valor (96%), sendo ainda considerado como *L. paracasei*.

Em quatro casos ambos os genes (*pheS* e *groEL*) foram sequenciados. Curiosamente, em dois casos houve divergência de resultados quanto à espécie identificada pelos genes sequenciados. Isso pode ser atribuído a uma semelhança filogenética entre *L. paracasei* e *L. rhamnosus*. Um terceiro gene constitutivo poderia ser utilizado para a correta classificação desses dois isolados. No presente estudo, mesmo com a utilização de três genes distintos (*pheS*, *rpoA* e *groEL*), 2,26% dos isolados não puderam ser identificados. Outros genes constitutivos poderiam ser utilizados como alternativa, por exemplo, os genes *leuS* e *tuf*. O gene *leuS* já foi usado na genotipagem de *L. paracasei* mostrando o maior número de sítios polimórficos e alelos em relação aos genes *fusA*, *ileS*, *lepA*, *pyrG*, *recA*, *recG* (PAROLO et al., 2011). O gene *tuf* já foi descrito na identificação dos lactobacilos sendo capaz de identificar diferentes espécies de lactobacilos em um grande número de isolados sendo uma outra alternativa possível (VENTURA et al., 2003; CHAVAGNAT et al., 2002). Para identificação de espécies de lactobacilos filogeneticamente relacionadas podem ser necessários múltiplos métodos moleculares para uma discriminação e tipificação taxonômica robusta (NASER et al., 2007).

6 CONCLUSÃO

Na identificação de lactobacilos orais tanto o gene *pheS* quanto o gene *groEL* são marcadores filogenéticos confiáveis e com bom poder discriminatório. O gene *rpoA* não mostrou-se efetivo como marcador filogenético para lactobacilos orais. A identificação de espécies de lactobacilos é complexa. Através dos resultados do presente estudo, sugere-se, então, o uso do sequenciamento parcial do gene *groEL* como primeira alternativa na identificação espécie específica de lactobacilos orais e, em casos de não amplificação, o gene *pheS* pode ser utilizado. Para alcançar uma tipificação taxonômica robusta, múltiplos métodos moleculares (sequenciamento de dois ou três genes *housekeeping*) devem ser utilizados.

REFERÊNCIAS

- BADET, C.; THEBAUD, N. B. Ecology of lactobacilli in the oral cavity: a review of literature. **Open Microbiol. J.**, Hilversum, v. 2, p. 38-48, Apr. 2008.
- BLAIOTTA, G. et al. Lactobacillus strain diversity based on partial hsp60 gene sequences and design of PCR-restriction fragment length polymorphism assays for species identification and differentiation. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 74, no. 1, p. 208-215, Jan. 2008.
- CHAVAGNAT, F. et al. Comparison of partial *tuf* gene sequences for the identification of lactobacilli. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v. 217, no. 2, p. 177 – 183, Dec. 2002.
- CLAESSON, M. J.; SINDEREN, D. van; O'TOOLE, P. W. Lactobacillus phylogenomics – towards a reclassification of the genus. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, Reading, UK. v. 58, no. 1, p. 2945 – 2954, Jan. 2008.
- cpnDB - Chaperonin Sequence Database, 2014. Disponível em: <<http://pbi1.univ-lyon1.fr/bibi>>. Acesso em: 2014.
- DALALBA, R. S. **Diversidade genética de lactobacilos isolados de dentina cariada antes e após selamento.** 2013. 28 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, 2013.
- DELLAGLIO, F.; FELIS, G. E.; TORRIANI, S. The status of the species *Lactobacillus casei* (Orla-Jensen 1916) Hansen and Lessel 1971 and *Lactobacillus paracasei* Collins et al. 1989. Request for an Opinion. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, Reading, UK, v. 52, pt. 1, p. 285-287, Jan. 2002.
- FELIS, G. E. et al. Comparative sequence analysis of a *recA* gene fragment brings new evidence for a change in the taxonomy of the *Lactobacillus casei* group. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, Reading, UK, v. 51, pt. 6, p.2113-2117, Nov. 2001.
- FELIS, G.E.; DELLAGLIO, F. Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. **Curr. Issues Intest. Microbiol.**, Wymondham, Norfolk – UK, v. 8, no. 2, p. 44-61, Sept. 2007.
- FIRMINO, L. B. **Estudo da viabilidade bacteriana em dentina cariada selada.** 2011. 65 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Odontológica) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, 2011.
- GROISILLIER A.; LONVAUD-FUNEL, A. Comparison of partial malolactic enzyme gene sequences for phylogenetic analysis of some lactic acid bacteria species and relationships with the malic enzyme. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, Ames, Iowa, UK, v. 49, pt. 4, p. 1417 – 1428, Oct. 1999.
- HAMMES, W. P.; VOGEL, R. F. The genus *Lactobacillus*. In: WOOD, B. J. B.; HOLZAPFEL, W. H. (Ed.). **The Genera of Lactic Acid Bacteria.** London: Blackie Academic & Professional. 1995. p. 19-54.
- HILL, J. E. et al. cpnDB: a Chaperonin Sequence Database. **Genome Res.**, New York, v. 14, no. 8, p. 1669-1675, Aug. 2004.

IKEDA, T.; SANDHAM, H. J.; BRADLEY, E. L. Changes in streptococcus mutans and lactobacilli in plaque in relation to the initiation of dental caries in negro children. **Arch. Oral Biol.**, New York, v.18, no. 4, p. 555-566, Apr. 1973.

JORGE A. O. C. **Microbiologia bucal**. São Paulo: Liv. Santos, 2007. p. 15-54.

KLEIN, G. et al. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v. 41, no. 2, p. 103–125, May 1998.

KRASSE, B. **Risco de cárie: um guia prático para avaliação e controle**. 2. ed. São Paulo: Quintessense, 1988. p. 63-93.

LIPINSKI, T. et al. Structural analysis of the *Lactobacillus rhamnosus* strain KL37C exopolysaccharide. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 338, no. 7, p. 605-609, Mar. 2003.

LPSN, List of prokaryotics names with standing in nomenclature. Disponível em: <<http://www.bacterio.net/lactobacillus.html>>. Acesso em: 2014.

LOESCHE, W. J. et al. Longitudinal investigation of bacteriology of human fissure decay: epidemiological studies in molar shortly after eruption. **Infect. Immun.**, Washington, v. 46, no.3, p. 765-772, Dec. 1984.

LONDON, J. The ecology and taxonomic status of the lactobacilli. **Annu. Rev. Microbiol.**, Palo Alto – USA, v. 30, p. 279-301, 1976.

MICHALEK, S. M. et al. Oral ecology and virulence of *Lactobacillus casei* and *Streptococcus mutans* in gnotobiotic rats. **Infect. Immun.**, Washington, v. 33, no. 3, p. 690-696. Sept. 1981.

NASER, S. M. et al. Application of multilocus sequence analysis (MLSA) for rapid identification of *Enterococcus* species based on *rpoA* and *pheS* genes. **Microbiology.**, Washington, v. 151, pt. 7, p. 2141-2150, July 2005.

NASER, S. M. et al. Identification of lactobacilli by *pheS* and *rpoA* gene sequence analysis. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, Reading, UK, v. 57, pt. 12, p. 2777-2789, Dec. 2007.

NCBI – Centro Nacional de Informação Biotecnológica dos Estados Unidos, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>>. Acesso em: 2014.

PAROLO, C. C. F. **Estudo dos lactobacilos no biofilme dental**. 2009. 163 f. Tese (Doutorado em Clínica Odontológica) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, 2009.

PAROLO, C. C. F. et al. Genetic diversity of *Lactobacillus paracasei* isolated from in situ human oral biofilms. **J. Appl. Microbiol.**, Oxford, v.111, no. 1, p. 105–113, May 2011.

PETROVIC, T.; NIKSIC, M.; BRINGEL, F. Strain typing with *ISLp11* in lactobacilli. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v. 255, no.1, p. 1 – 10, Feb. 2006.

PODLESNY, M. et al. LC – MS/MS analysis of surface layer proteins as a useful method for the identification of lactobacilli from the *Lactobacillus acidophilus* group. **J. Microbiol. Biotechnol.**, Seoul, Korea, v. 21, no. 4, p. 421-429, Apr. 2011.

ROGOSA, A.; MITCHELL, J. A.; WISEMAN R.F. A selective medium for the isolation and enumeration of oral lactobacilli. **J. Dent. Res.**, Chicago, v. 30, no. 5, p. 682-689, Oct. 1951.

SOCRANSKY, S. S.; MANGANIELLO S. D. The oral microbiota of man from birth to senility. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 42, no. 8, p. 485-496, Aug. 1971.

STRAETEMANS, M. M. et al. Colonization with mutans streptococci and lactobacilli and the caries experience of children after the age of five. **J. Dent. Res.**, Chicago, v. 77, no. 10, p. 1851-1855, Oct. 1998.

TANNOCK, G. W. Identification of lactobacilli and bifidobacteria. **Curr. Issues Mol. Biol.**, Wymondham, Norfolk - UK, v. 1, no. 1-2, p. 53-64, Jan. 1999.

TORRIANI, S.; FELIS, G. E.; DELLAGLIO, F. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus* and *L. paraplantarum* by *recA* gene sequence analysis and multiplex PCR assay with *recA* gene-derived primers. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 67, no. 8, p. 3450 – 3454, Aug. 2001.

VASQUEZ, A. et al. DNA – based classification and sequence heterogeneities in the 16S rRNA genes of *Lactobacillus casei/paracasei* and related species. **Syst. Appl. Microbiol.**, New York, v. 28, no. 5, p. 430-441, July 2005.

VENTURA, M. et al. Analysis, characterization, and loci of the *tuf* genes in lactobacillus and bifidobacterium species and their direct application for species identification. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 69, no. 11, p. 6908 -6922, Nov. 2003.

VONDRUSKOVA H. et al. Alternatives to antibiotic growth promoters in prevention of diarrhoea in weaned piglets: a review. **Vet. Med.**, Brno, Czech Republic, v. 55, no. 5, p. 199–224, 2010.

WANG, G. C.; WANG, Y. Frequency of formation of chimeric molecules as a consequence of PCR coamplification of 16S rRNA genes from mixed bacterial genomes. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 63, no. 12, p. 4645 - 4650, Dec. 1997.