



Universidade do Algarve

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Listeria monocytogenes em
condições de simulação do sistema
gastrointestinal e a infecção no
modelo de *Galleria mellonella*

Denise Schrama

Dissertação do Mestrado em Biologia Molecular e Microbiana

30 de Setembro 2011



Universidade do Algarve

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Listeria monocytogenes em
condições de simulação do sistema
gastrointestinal e a infecção no
modelo de *Galleria mellonella*

Denise Schrama

Nº 25557

Dissertação do Mestrado em Biologia Molecular e Microbiana

Dissertação orientada pela Professora Doutora M. Leonor Faleiro

30 de Setembro 2011

The mind likes a strange idea as little as the body likes a strange protein and resists it with similar energy. It would not perhaps be too fanciful to say that a new idea is the most quickly acting antigen known to science. If we watch ourselves honestly we shall often find that we have begun to argue against a new idea even before it has been completely stated.

Wilfred Batten Lewis Trotter (1872-1939) English surgeon.

Agradecimentos

À professora M. Leonor Faleiro pela orientação, transmissão de conhecimentos, ajuda e apoio ao longo deste percurso da minha vida. Agradeço muito.

Aos meus colegas do laboratório (Elsa, Jessie, Liseta, Shane e Noel) pela vossa amizade, apoio, ajuda e tudo mais ao longo do trabalho experimental. Por estarem sempre disponíveis para qualquer ajuda. Muito obrigada.

Aos meus amigos pelo vosso interesse e apoio nesta fase da minha vida, e em especial à Joana e Ana por estarem sempre disponíveis e presentes em qualquer momento. Muito obrigada a todos.

Às minhas colegas do mestrado em biologia molecular e microbiana (Lorena, Telma, Maria e Vera) pela vossa amizade e apoio nestes anos de aprendizagem.

À Josie pela amizade desde do 1º ciclo, pelo apoio, ajuda e interesse mostrado mesmo estando muito longe.

Aos meus pais que me sempre apoiarem durante a minha vida académica, sempre estão ao meu dispor para me ajudarem, apoiarem, assistirem e estão presentes nos momentos mais valiosos. Ao meu irmão, por ser uma pessoa especial.

Resumo

A bactéria *Listeria monocytogenes* é o agente etiológico da listeriose, uma doença de origem alimentar. No grupo de risco estão incluídos os idosos, grávidas e doentes imunocomprometidos. Embora rara, esta doença tem uma taxa de mortalidade associada muito elevada (cerca de 20 a 30%). A maioria dos surtos são provocados pelos serovares 1/2a, 1/2b e 4b. Entre os alimentos implicados destacam-se os produtos lácteos, entre os quais o queijo tem especial relevância. No presente estudo pretendeu-se avaliar o impacto de uma exposição prévia a condições sub-letais de pH e sal (pH 5,5 e 3,5% (p/v) NaCl) na protecção das células a subseqüentes condições de stress designadamente ao passar pelo sistema gastrointestinal. Para atingir este objectivo as células da estirpe *L. monocytogenes* C882 foram submetidas a uma exposição de condições de adaptação num meio de simulação de queijo durante 2h a 20°C e em seguida foram transferidas para um modelo de simulação do sistema gastrointestinal. Como controlo foram utilizadas células que não sofreram uma adaptação prévia (pH 7,0 sem adição de sal). As respostas fisiológicas foram avaliadas através da análise do proteoma intracelular. Foi ainda avaliado o impacto das condições de adaptação na patogenicidade desta estirpe através do modelo *Galleria mellonella* L.(Lepidoptera: Pyralidae).

Os resultados obtidos evidenciam uma capacidade de sobrevivência no modelo de simulação do sistema gastrointestinal semelhante entre as células adaptadas e não adaptadas. No entanto, a análise do proteoma intracelular evidencia a montagem de diferentes estratégias moleculares pelas células adaptadas em comparação com as células não adaptadas. Com o modelo de *G. mellonella* não foram encontradas diferenças significativas ($P > 0,05$) no potencial de virulência entre as células adaptadas e não adaptadas das estirpes C882 e Scott A. Contudo foi possível verificar que a estirpe C882 é mais virulenta que a estirpe clínica Scott A.

Palavras-chave: *Listeria monocytogenes*, respostas de tolerância, resistência, sistema gastrointestinal, proteómica, *Galleria mellonella*.

Abstract

Listeria monocytogenes is the etiologic agent of listeriosis, a foodborne illness. The elderly, pregnant women and immunocompromised patients are included in the risk group. Although this disease is rare, a very high mortality rate is associated (20 to 30%). The majority of outbreaks are caused by serovars 1/2a, 1/2b and 4b. Among the implicated food dairy products stand out, among them cheese has special relevance. The present study aimed to evaluate the impact of a prior exposure to sublethal conditions of pH and salt (pH 5,5 and 3,5% (w/v) NaCl) in protecting cells from subsequent stress conditions such as when passing the gastrointestinal tract. To achieve this target cells of *L. monocytogenes* C882 were exposed to adaptation conditions in a simulated cheese medium for 2 h at 20°C and then transferred to a simulation model of the gastrointestinal system. As control, cells that did not undergo a pre-adaptation (pH 7 without added salt) were used. The physiological responses were evaluated through the analysis of the intracellular proteome. The impact of the adaptation conditions in the C882 pathogenicity was rated through the use of the insect model *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: *Pyralidae*).

The results show a similar ability between the adapted and non-adapted cells to survive in the simulated model of the gastrointestinal system. However, the intracellular proteome analysis highlights the assembly of different molecular strategies in adapted cells compared to non-adapted cells. Using the model of *G. mellonella* no significant differences ($P > 0,05$) in the virulence potential between adapted and non-adapted cells of the strain C882 and Scott A was found. However, it was possible to verify that the C882 strain is more virulent than the clinical strain Scott A.

Key words: *Listeria monocytogenes*, tolerance response, resistance, gastrointestinal system, proteomics, *Galleria mellonella*.

Abreviaturas

2DE – Duas dimensões.

ActA – Actina A.

ATP – Adenosina trifosfato.

ATR – Resposta de tolerância ao ácido.

ADP – Adenosina difosfato.

BSA – Albumina de soro bovino acetilada.

BHI – Infusão de coração e cérebro.

cDNA – Ácido desoxiribonucleico complementar.

CFU – Unidade formadora de colónias.

CHAPS – 3-[(3-colamidopropil)dimetilamónio]-1-propanosulfonato.

DNA – Ácido desoxiribonucleico.

DNase – Desoxiribonuclease.

D.O. – Densidade óptica.

DTT – Ditioneitol.

EDTA – Ácido etilenodiaminatetracético.

HIV – Vírus da imunodeficiência humana.

Hly – Listeriolisina.

hsp – Proteína de choque térmico.

IndA – Indigoidina.

InlA – Internalina A.

kb – Kilobases.

kDa – KiloDalton.

MALDI – Ionização / dessorção da matriz assistida pelo laser.

mA – Miliampère.

ml – Mililitro.

nm – Nanómetro.

OTR – Resposta de tolerância osmótica.

PAGE – Electroforese em gel de poliacrilamida.

PBS – Tampão fosfato salino.

PCR – Reacção de polimerização em cadeia.

pI – Ponto isoeléctrico.

p/v – Peso/volume.
RNA – Ácido ribonucleico.
RNase – Ribonuclease.
rpm – Rotações por minuto.
SDS – Dodecilsulfato de sódio.
SQ – Simulação de queijo.
TEMED – N,N,N',N' – tetrametiletlenodiamina.
TOF – Tempo de voo.
TS – Tampão de solubilização.
TSB – Meio de triptona e soja.
μA – Microampère.
μg – Micrograma.
V – Volt.
W – Watt.

Índice

Agradecimentos	iii
Resumo	iv
Abstract	v
Abreviaturas	vi
Índice	viii
Capítulo I – Introdução	1
1.1 A bactéria <i>Listeria monocytogenes</i>	1
1.2 Doenças causadas por <i>Listeria monocytogenes</i>	2
1.3 Factores de virulência	4
1.4 A origem alimentar	6
1.4.1 Surtos de listeriose	7
1.5 Características de adaptação e resistência	10
1.5.1 Temperatura	10
1.5.2 Resistência à acidez	11
1.5.3 Adaptação ao sal	14
1.5.4 Resposta aos sais biliares e bÍlis	15
1.5.5 Protecção cruzada	17
1.6 Modelos de infecção de <i>Listeria monocytogenes</i>	17
1.6.1 Ratinhos	18
1.6.2 Porquinhos-da-Índia e coelhos	20
1.6.3 Insectos	20
1.7 Objectivos	22
1.8 Fluxograma do trabalho experimental	22
Capítulo II – Material e métodos	23
2.1 Material	23
2.1.1 Equipamento	23
2.1.2 Soluções	24
2.1.3 Meios de cultura	25
2.1.4 Material biológico	26
2.2 Métodos	26
2.2.1 Coloração de Gram	26
2.2.2 Adaptação em meio de simulação de queijo	27

2.2.3 Simulação das condições do tracto gastrointestinal	27
2.2.4 Extracção das proteínas celulares	28
2.2.5 Quantificação das proteínas pelo método de Bradford	28
2.2.6 Electroforese bi-dimensional (2DE)	29
2.2.6.1 Rehidratação e focagem isoeléctrica das tiras de gel de poliacrilamida	29
2.2.6.2 Equilibração	31
2.2.7 Preparação dos géis de poliacrilamida bi-dimensional	32
2.2.8 Coloração dos géis com azul de Coomassie R-250	33
2.2.9 Coloração dos géis com nitrato de prata	33
2.2.10 Digitalização e análise dos géis	34
2.2.11 Identificação das proteínas	34
2.2.12 Virulência no modelo de <i>Galleria mellonella</i> L. (Lepidoptera: <i>Pyralidae</i>)	36
2.2.13 Determinação do número de bactérias em <i>Galleria mellonella</i>	36
2.2.14 PCR em tempo real	37
Capítulo III – Resultados e Discussão	40
3.1 Viabilidade de <i>Listeria monocytogenes</i> C882 no modelo de simulação do tracto gastrointestinal	40
3.2 Perfil proteico	41
3.2.1 Perfil proteico em condições de adaptação	41
3.2.2 Perfil proteico em condições de stress gástrico	46
3.2.3 Perfil proteico em condições de stress osmótico pelos sucos intestinais	50
3.3 Avaliação do potencial de virulência em <i>Galleria mellonella</i>	55
3.4 Cinética do crescimento de <i>L. monocytogenes</i> em <i>Galleria mellonella</i>	57
3.5 Expressão dos genes de virulência	59
Capítulo IV – Conclusões	61
4.1 Conclusões	61
4.2 Perspectivas futuras	63
Capítulo V – Bibliografia	64
Anexos	79

Capítulo I – Introdução

1.1 A bactéria *Listeria monocytogenes*

A bactéria *Listeria monocytogenes* pertence ao filo Firmicutes, classe *Bacilli*, ordem *Bacillales*, família *Listeriaceae* e ao género *Listeria* (Jones e Seeliger, 1991).

Presentemente são reconhecidas oito espécies, das quais apenas duas espécies são patogénicas, nomeadamente *L. ivanovii* (Boerlin *et al*, 1992) unicamente para animais e *L. monocytogenes*, quer para os seres humanos quer para os animais. As restantes espécies *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi*, *L. marthii* e *L. recourtia* não são patogénicas (Jones e Seeliger, 1991; Glaser *et al*, 2001; Graves *et al*, 2010).

A bactéria *L. monocytogenes* foi descrita pela primeira vez por Murray *et al* em 1926 (Murray *et al*, 1926). Isolou uma bactéria do fígado de coelhos e cobaias doentes e denominou-a de *Bacterium monocytogenes* devido a uma monocitose característica (Gray e Killinger, 1966; Farber e Peterkin, 1991). No ano seguinte a denominação foi alterada por Pirie *et al* (Gray e Killinger, 1966) para *Listerella hepatolytica*. Em 1929, na Nova Islândia, o investigador Gill, foi o primeiro a isolar a bactéria *L. monocytogenes* em animais domésticos (Gill, 1933). No mesmo ano Nyfeldt foi o primeiro a confirmar a infecção por *Listeria* em seres humanos (Gray e Killinger, 1966). Em 1940 o comité de nomenclatura deu o nome actual a esta bactéria (Gray e Killinger, 1966; Comité de nomenclatura, 1954).

Tem a forma de um bacilo curto com as extremidades encurvadas e mede cerca de 1-2 µm por 0,5 µm e as células podem formar paliçadas (Jones e Seeliger, 1991; Madigan e Martinko, 2006). É uma bactéria anaeróbia facultativa ou microaerofílica e reage de modo positivo à coloração de Gram (Farber e Peterkin, 1991). A temperatura óptima de crescimento é de 37°C, no entanto pode crescer a temperaturas relativamente baixas (4 a 10°C) (Jones e Seeliger, 1991). Possui catalase mas não oxidase. Não forma esporos. A temperaturas entre 20-25°C o organismo produz flagelina que se agrega à superfície da célula (flagelos peritriciais), dando-lhe uma mobilidade característica de “cambalhota”, ou seja sobre o seu próprio eixo. Contudo, a 37°C a produção desta proteína é anulada e conseqüentemente a mobilidade (Farber e Peterkin, 1991). É uma bactéria quimiorganotrófica, utiliza compostos orgânicos como fonte de energia (Jones

e Seeliger, 1991). Tem um metabolismo homofermentativo, produzindo ácido (L(+)-lactato) sem produção de gás a partir de glicose (Jones e Seeliger, 1991). As colônias apresentam uma tonalidade azul sob luz transmitida num ângulo de 45° no fundo da placa (iluminação de Henry) (Jones e Seeliger, 1991). Na presença de sangue a bactéria produz um halo de hemólise (β -hemólise) (Farber e Peterkin, 1991) e produz uma reacção positiva no teste de Christie Atkins Munch-Petersen (CAMP).

Em relação à sua caracterização serológica são reconhecidas 13 serovares (Thévenot *et al*, 2006; Jaradat e Bhunia, 2003) (1/2a; 1/2b; 1/2c; 3a; 3b; 3c; 4a; 4ab; 4b; 4c; 4d; 4e; 7). A aplicação de alguns métodos de tipagem agrupou os isolados de *L. monocytogenes* em quatro linhagens com características próprias (Rasmussen *et al*, 1995; Roberts *et al*, 2006; Ward *et al*, 2008). A maioria dos isolados são agrupados na linhagem I ou II. A linhagem I inclui as serovares 1/2b, 3b e 4b, a linhagem II inclui as serovares 1/2a, 1/2c e 3c, e a linhagem III inclui as serovares 4a, 4c e 4b atípicas. Algumas serovares (4a, 4c e 4b atípicas) que estavam incluídas numa linhagem denominada IIIB passaram a constituir uma linhagem distinta, a linhagem IV (Jeffers *et al*, 2001; Ward *et al*, 2008).

1.2 Doenças causadas por *Listeria monocytogenes*

Um número significativo de doenças como a listeriose, gastroenterites, meningites, encefalites e septicemia (Jiang *et al*, 2010) podem ser causados pela bactéria *Listeria monocytogenes*. As serovares mais implicadas nos casos de listeriose (mais de 95% dos casos) são as serovares 1/2a, 1/2b e 4b (Thévenot *et al*, 2006; Swaminathan e Gerner-Smidt, 2007). As taxas de incidência são particularmente elevadas em indivíduos imunocomprometidos, infectados com HIV, recém-nascidos, idosos e mulheres grávidas (Swaminathan e Gerner-Smidt, 2007; Conly e Johnston, 2008). Em mulheres grávidas pode provocar o aborto espontâneo, nados mortos ou nascimentos prematuros (Organização mundial de saúde, 2004).

No tratamento de infecções causadas por *L. monocytogenes* são utilizados vários antibióticos, sendo a ampicilina o mais comum ou penicilina G combinado ou não com gentamicina (Charpentier e Courvalin, 1999). Os doentes que são alérgicos à penicilina podem tomar vancomicina em combinação com um aminoglicosídeo, como a gentamicina (Jones, 1990). É recomendado fazer um tratamento de pelo menos duas

semanas, e no caso de grávidas durante três a quatro semanas (Allerberger e Wagner, 2009). As primeiras estirpes resistentes aos antibióticos foram isoladas em 1988. Estas estirpes conseguem resistir a concentrações de tetraciclina superiores a 10 µg/ml. No mesmo ano, em França foi isolada a primeira estirpe multiresistente contra os antibióticos cloranfenicol, eritromicina, estreptomicina e tetraciclina (Charpentier e Courvalin, 1999; Poyart-Salmeron *et al*, 1992). Em 1990 foi isolado um plasmídeo de 37-kbp que contem genes de resistência para estes antibióticos (Farber e Peterkin, 1991). A bactéria *Listeria monocytogenes* é intrinsecamente resistente ao ácido nalidíxico (>128 mg/l) e a susceptibilidade às fluoroquinolonas está a diminuir (0,5 – 2 mg/l) (Allerberger e Wagner, 2009).

A listeriose é caracterizada por duas formas, a forma invasiva e a forma não invasiva. A forma invasiva pode ocorrer em pessoas sãs, mas é mais comum ocorrer em pessoas idosas, imunocomprometidos, com terapia imunossupressora, diabéticos, alcoólicos, doentes com doenças auto-imunes, com uma disfunção nas células-T ou em pessoas com doenças hematológicas (Swaminathan e Gerner-Smidt, 2007). A listeriose não invasiva pode resultar numa gastroenterite febril - em que os sintomas são de uma gripe leve com febre, dores musculares e diarreia ou como listeriose cutânea (Swaminathan e Gerner-Smidt, 2007).

As duas formas de listeriose resultam da capacidade de *L. monocytogenes* ser capaz de ultrapassar as diferentes barreiras (Lecuit, 2007) (Figura 1), nomeadamente 1) pode transpor a barreira intestinal e infectar, através dos linfonodos, o baço e o fígado, 2) ultrapassar a barreira hemato-encefálica e infectar o sistema nervoso central e 3) tem a capacidade de ultrapassar a barreira placentária provocando a listeriose neonatal. A mãe possui sintomas de gripe mas o feto adquire uma infecção sistémica que pode resultar na morte ou nascimento prematuro, uma vez que não tem o sistema imune desenvolvido (Swaminathan e Gerner-Smidt, 2007). No terceiro trimestre da gravidez, a imunidade com as células T está mais enfraquecida, assim sendo é nesta altura que a maioria das infecções maternas ocorrem (Allerberger e Wagner, 2009). A doença pode ter um tempo de incubação de 30 dias.

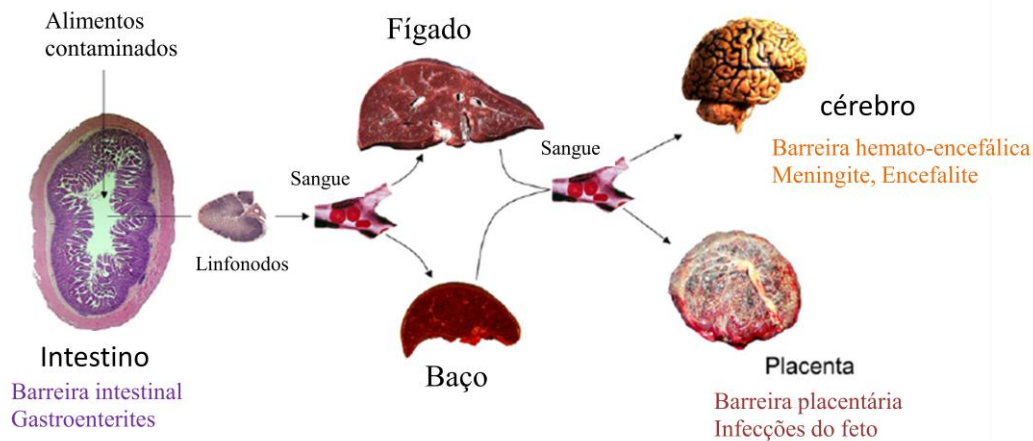


Fig. 1 – Várias vias de listeriose humana (Fonte: Lecuit, 2007).

1.3 Factores de virulência

Como foi referido anteriormente a bactéria *L. monocytogenes* é capaz de ultrapassar três barreiras de tecidos, a barreira intestinal, a barreira hemato-encefálica e a barreira placentária (Lecuit, 2007; Balestrino *et al*, 2010). A bactéria pode deslocar-se de célula para célula fora do espaço extra celular, evitando o contacto com o sistema imunitário do hospedeiro (Clauss e Lorber, 2008). No processo de infecção ocorre a internalização das células bacterianas, a sua replicação e sobrevivência em diferentes tipos de células (Balestrino *et al*, 2010). Para iniciar a infecção é necessário a adesão da bactéria através duma proteína da superfície celular, de cerca de 88 kDa, (Conte *et al*, 1996) a internalina A (InlA). A internalização protege a bactéria dos anticorpos (Bonazzi *et al*, 2009). A InlA liga-se a E-caderina, uma molécula de adesão da célula hospedeira. Uma outra internalina é necessária durante o processo de invasão das células vizinhas, esta é a internalina B (InlB), que se liga ao receptor Met do factor de crescimento do hepatócito (HGF) (Freitag *et al*, 2009; Balestrino *et al*, 2010; Bonazzi *et al*, 2009). Só a InlA é importante para passar a barreira intestinal, no entanto InlA e InlB são necessárias em conjunto para atravessar a barreira placentária (Bonazzi *et al*, 2009). Após a internalização as células bacterianas ficam encerradas num fagolisossoma e a sua libertação para o citoplasma da célula hospedeira requer a acção de uma citolisina de 58 kDa (Conte *et al*, 1996) denominada listeriolisina O (LLO). Esta citolisina forma poros transmembranares com a interacção de duas fosfolipases (B e C), permitindo a libertação das células bacterianas e a sua replicação no citosol. Nesta fase as células de

L. monocytogenes sintetizam num dos pólos a proteína actina (proteína de superfície, de 90 kDa, ActA) formando caudas de actina que servem como força de propulsão e lhes permitem a mobilidade, quer pelo citoplasma da célula infectada quer a invasão das células vizinhas (Figura 2) (Freitag *et al*, 2009; Balestrino *et al*, 2010). A actividade lítica da listeriolisina O é inibida por colesterol e agentes oxidantes, e é activada por tióis. Os mutantes deficientes em LLO não são virulentos (Farber e Peterkin, 1991). Esta proteína fica inactiva a pH 7 e tem um pH óptimo de 5,5 (Geoffroy *et al*, 1987). Bielecki e colaboradores clonaram, em 1990, o gene da hemolisina (*hlyA*) em *Bacillus subtilis*, a qual depois expressou a proteína e tornou-se capaz de crescer intracelularmente e foi letal para ratinhos, provando assim a importância da hemolisina na virulência de *L. monocytogenes* e a sua importância no crescimento intracelular (Farber e Peterkin, 1991).

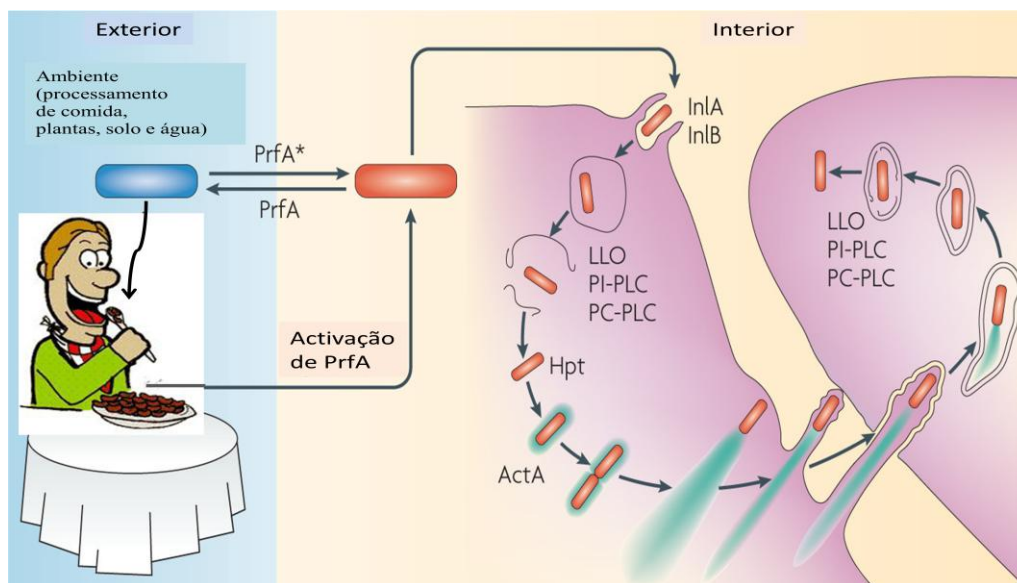


Fig.2 – O processo de internalização de *Listeria monocytogenes* (Fonte: Freitag *et al*, 2009).

Os factores de virulência, fosfolipases B e C, listeriolisina O, actina, metaloprotease e as internalinas A e B são reguladas por um regulador de transcrição comum, o PrfA (Figura 3) e no seu conjunto formam a ilha de patogenicidade de *Listeria* (LIPI-1) que tem um tamanho de 10 kb (Cossart e Lecuit, 1998). Dados recolhidos de abordagens de transcriptómica e proteómica evidenciam que o regulador PrfA para além dos genes de virulência tem um papel de regulação num número considerável de genes, são cerca de 145 genes os já identificados (Freitag *et al*, 2009).

Os mutantes de *L. monocytogenes* com o gene *PrfA* interrompido têm um crescimento reduzido e são, em modelo de ratinhos, 100 000 vezes menos virulentos que a estirpe selvagem (Freitag *et al*, 1993). Outros factores, como a enzima superóxido dismutase, a proteína P60 e a ferritina têm sido apontados como outros factores de virulência que não são regulados por *PrfA* (Farber e Peterkin, 1991; Dussurget *et al*, 2005; Kuhn e Goebel, 1989).

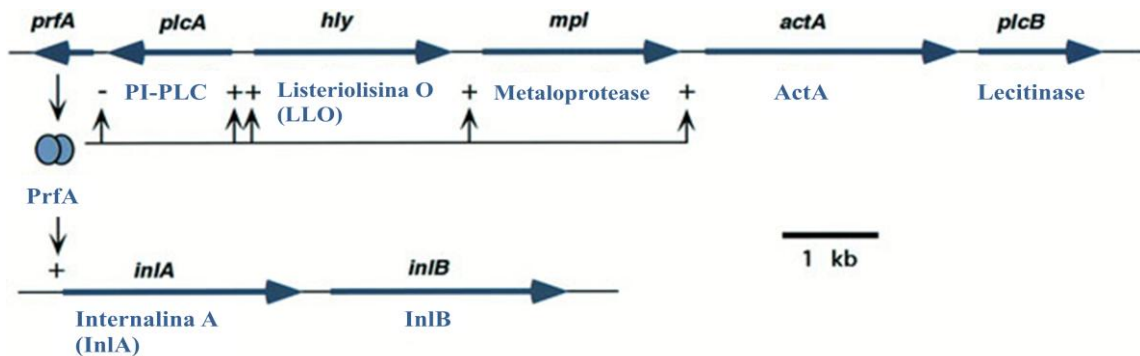


Fig. 3 – A ilha de patogenicidade LIPI-1 (Fonte: Cossart e Lecuit, 1998).

1.4 A origem alimentar

A presença de *L. monocytogenes* em inúmeros produtos alimentares tem sido referido (Farber e Peterkin, 1991; Thévenot *et al*, 2006; Schlech, 2000). A maioria dos produtos é de origem animal, no entanto também tem sido detectada em vegetais (Farber e Peterkin, 1991). Entre os produtos alimentares os produtos lácteos, mais propriamente o queijo tem sido bastante associado aos casos de listeriose (Farber e Peterkin, 1991). Em alguns queijos contaminados foram detectados elevados números de *L. monocytogenes*, cerca de 10^7 CFU/g (Van Renterghem *et al*, 1990). A sobrevivência de *L. monocytogenes* durante o processamento e conservação de queijos tipo Camembert é elevada e menor em queijos frescos e requeijão (Farber e Peterkin, 1991). Em Portugal, o queijo fresco foi considerado um produto de risco (Almeida *et al*, 2006). Carne crua ou produtos cárneos (por exemplo, frango e salsichas), e produtos derivados de peixe ou marisco podem conter números consideráveis de *Listeria* spp. (Ramalheira *et al*, 2010; Thévenot *et al*, 2006). Tem capacidade de sobreviver o processo de fermentação de leite magro por *Streptococcus cremoris* ou *S. lactis* (Farber e Peterkin, 1991).

O crescimento de *L. monocytogenes* nos alimentos está dependente da temperatura e do pH, até mesmo, o congelamento ou desidratação podem não ser suficientes para eliminar a sua sobrevivência (Farber e Peterkin, 1991). Os ambientes de processamento de alimentos são facilmente contaminados através da matéria-prima já que a bactéria *L. monocytogenes* é ubíqua e tem a capacidade de crescer a temperaturas baixas (psicrotrófica) e consegue aderir a diferentes superfícies podendo sobreviver nelas por longos períodos (Thévenot *et al*, 2006).

Em biofilme, as células de *L. monocytogenes*, como a maioria das bactérias em biofilme são mais resistentes, contra inúmeros factores de stress, incluindo a acção de detergentes e desinfectantes, permitindo a sua permanência em ambientes de processamento de alimentos durante vários meses e até décadas (Jordan *et al*, 2008; Swaminathan e Gerner-Smidt, 2007).

No ano de 2006 foram estabelecidas novas normas para os estados da União Europeia em relação a presença de *Listeria monocytogenes* nos alimentos (Comissão Europeia, 2005). Os alimentos tipo pronto-a-comer, permitem o crescimento desta bactéria, e por isso foi-lhes atribuída tolerância zero. Outros produtos (carne, peixe) que são colocados no mercado durante o seu tempo de prateleira podem conter até 100 CFU/g (Samara e Koutsoumanis, 2009; Thévenot *et al*, 2006).

1.4.1 Surtos de listeriose

A taxa caso-fatalidade em surtos de listeriose é cerca de 20-30% (Organização Mundial de Saúde, 2004; Swaminathan e Gerner-Smidt, 2007). Nos Estados Unidos da América, de Agosto 1998 até 6 Janeiro 1999 ocorreram pelo menos 50 casos causados por uma estirpe rara de *L. monocytogenes*, serovar 4b. Durante este surto morreram 6 adultos e 2 mulheres grávidas sofreram aborto espontâneo (Organização Mundial de Saúde, 2004). Em 2007 foram confirmados 1554 casos de listeriose na Europa (Jiang, *et al*, 2010).

O estudo caso-controlo, em 1981, de um surto de listeriose perinatal num hospital no Canadá identificou a alface como a fonte de infecção (Schlech, 1983). A investigação deste surto e de um outro, em 1985, relacionado com o consumo de queijo tipo Mexicano (Linnan *et al*, 1988) evidenciou, pela primeira vez, a transmissão de *L. monocytogenes* através da via alimentar. Um surto de listeriose, em 1983 no estado

Massachusetts nos EUA foi associado com uma pasteurização do leite incorrecta, no entanto a inspecção do equipamento não resultou na detecção de *L. monocytogenes*, contudo a infecção dos animais que forneceram o leite foi confirmada (Fleming *et al*, 1985). Um outro surto, em 1985 na Califórnia, onde ocorreram 142 casos, o consumo de queijo tipo americano foi o veículo alimentar implicado. A origem do surto foi associada a uma pasteurização inadequada do leite ou pela mistura de leite não pasteurizado com leite pasteurizado no fabrico do queijo (Linnan *et al*, 1988). Numa pequena zona na Suíça, em 2005, surgiram 10 casos de listeriose devido ao consumo de queijo de pasta mole (Bille *et al*, 2006). Outro surto que envolveu o consumo de queijo de pasta mole ocorreu na República Checa, no ano 2006 com 78 casos (Vít *et al*, 2007). Entre 2006 e 2007 na Alemanha 16 pessoas ficaram doentes devido ao consumo de carne fatiada tipo pronto-a-comer (Encontro Internacional, 2009). Neste mesmo momento ocorreu um surto de proporções elevadas onde cerca de 189 doentes foram afectados e no processo de infecção foi implicado o consumo de queijo (de coalhada ácida) produzido por leite pasteurizado (Koch *et al*, 2010). Um resumo dos vários surtos de listeriose reportados é apresentado na Tabela 1.

Foi verificado o aumento de casos de listeriose na Europa (Allerberger e Wagner, 2009) e as causas ainda não foram estabelecidas, mas alguns factores podem estar na origem deste aumento, nomeadamente a introdução de novos tipos de embalagens dos alimentos, práticas de sanitização inadequadas durante o processamento dos alimentos cárneos com utilização de máquinas de fatiar, temperaturas de conservação inadequadas, ausência de um sistema de identificação de riscos (HACCP) eficaz e falta de formação e treino dos trabalhadores da indústria alimentar. O controlo desta bactéria torna-se difícil, mesmo após a identificação dos factores mais relevantes para o aumento dos casos de listeriose, uma vez que lhe assistem características fisiológicas que lhe possibilitam a sobrevivência e eventual crescimento em ambientes hostis, como os que se praticam durante o processamento dos alimentos.

Tabela 1: Surtos de listeriose invasiva no período de 1981-2010.

Ano	Local	Nº de casos	Casos perinatais	Nº de mortos	Alimento suspeito	Serovar	Referência
1981	Nova Escócia, Canadá	41	34	18	Salada de repolho	4b	Schlech, 1983
1983	Massachusetts, EUA	49	7	14	Leite pasteurizado	4b	Fleming, 1985
1985	Califórnia, EUA	142	93	48	Queijo tipo Mexicano	4b	Linnan, 1988
1983-1987	Suíça	122	65	34	Queijo Vacherin mont- d'Or	4b	Büla, 1995
1987-1989	Reino unido	823	?	?	Paté	4b	McLauchlin, 1991
1989-1990	Dinamarca	26	3	7	Queijo azul	4b	Jensen, 1994
1992	França	279	92	85	Língua de porco em geleia	4b	Rocourt, 1993
1993	França	38	31	10	Rillettes	4b	Goulet, 1998
1994	Ilinoís, EUA	45	1	0	Leite de chocolate	1/2b	Dalton, 1997
1998-1999	Vários estados, EUA	108	?	14	Cachorro-quente	4b	Graves, 2005
1999	Finlândia	25	0	6	Manteiga	3a	Lyytikäinen, 2000
1999-2000	França	10	3	3	Rillettes	4b	Valk, 2001
1999-2000	França	32	9	10	Língua de porco em gelatina	4b	Valk, 2001
2000	Vários estados, EUA	30	8	7	Carne de peru tipo pronto-a-comer	1/2a	Olsen, 2005
2000	Carolina do Norte, EUA	13	11	5	Queijo tipo Mexicano	4b	MacDonald, 2005
2001	Suécia	120	?	?	Queijo fresco	?	Danielsson-Tham, 2004
2002	Vários estados, EUA	54	12	8	Carne pronta-a-comer de peru	4b	Gottlieb, 2006
2002	Quebec, Canada	17	3	0	Queijo feito de leite cru	?	CCDR, 2003
2003	Texas, EUA	41	?	5	Queijo tipo Mexicano	4b	TDSHS, 2007
2006-2007	Alemanha	189	11	26	Queijo comercial	4b	Koch, 2010
2008	Canadá	92	?	?	Queijo	?	Taillefer, 2010
2009	Áustria-Alemanha	14	0	4	Queijo ácido	1/2a	Fretz, 2010
2010	Louisiana, EUA	14	0	2	"Hog head cheese" *	1/2a	CDC, 2011

* No Alentejo é conhecido como cabeça de xara, não é um queijo mas sim um tipo de terrina à base de carne recolhida da cabeça de porco ou novilho e conservada em vinagre. Por vezes são também incluídas as patas de porco.

1.5 Características de adaptação e resistência

1.5.1. Temperatura

A bactéria *Listeria monocytogenes* é capaz de crescer entre 4 e 45°C, no entanto existem estirpes com a capacidade de crescer a -0,4°C (Cacace *et al*, 2010), e algumas conseguem sustentar uma condição de choque térmico de 30 minutos a 63°C (Vasseu *et al*, 1999). A sua sobrevivência e crescimento a temperaturas de refrigeração torna o controlo deste agente patogénico difícil (Gandhi e Chikindas, 2007).

A membrana celular de *L. monocytogenes* contém 55 a 60% de proteínas, 30 a 35% de lípidos (80 a 85% fosfolípidos) - que se encontram num estado fluído e cristalino - e cerca de 1,3 a 2,3% de açúcares (glicose, galactose, ribose e arabinose) (Bierne e Cossart, 2007). A membrana celular é caracterizada por um número ímpar de ácidos gordos de cadeia ramificada (Gandhi e Chikindas, 2007). Quando a temperatura é baixa ocorre uma alteração na composição dos lípidos membranares e um aumento dos ácidos gordos com quinze átomos de carbono (C_{15:0}) com a consequente diminuição nos ácidos gordos C_{17:0}. Ocorre também um aumento no número de ácidos gordos insaturados (Gandhi e Chikindas, 2007). Desta forma há uma diminuição nas interações carbono-carbono entre as cadeias o que resulta numa fluidez mais apropriada para o crescimento a temperaturas baixas. Na mesma sequência da diminuição da temperatura a bactéria *L. monocytogenes* produz proteínas de choque térmico relacionadas com temperaturas baixas, denominadas de “cold shock proteins”, ou proteínas de choque térmico (Csps) e proteínas de aclimação ao frio (Caps) (Gandhi e Chikindas, 2007).

Vários solutos de baixo peso molecular, como por exemplo glicina betaína, carnitina e prolina, protegem as células durante o crescimento a temperaturas baixas, ou seja, funcionam como crio-protetores (Liu *et al*, 2002; Becker *et al*, 2000). O osmólito glicina betaína é considerado o mais importante dos agentes crio-protetores para *L. monocytogenes*, pois permite o seu crescimento a temperaturas tão baixas como 4°C (Sleator *et al*, 2001).

Becker *et al* descobriu em 2000 o papel de um factor sigma alternativo (σ^B) no crescimento de *L. monocytogenes* a temperaturas baixas e no transporte dos agentes crio-protetores. A exposição da bactéria a um choque térmico de frio durante 30 minutos aumentou a expressão do factor σ^B (Olesen *et al*, 2009). Os investigadores adicionaram 1 mM de betaína ou carnitina a uma cultura de *L. monocytogenes* a 8°C e observaram

um aumento na taxa de crescimento de 0,009 para 0,018 e 0,017 h⁻¹ respectivamente. O mutante deficiente no gene *sigB* não conseguiu transportar, quer betaína quer carnitina (Becker *et al*, 2000; Gandhi e Chikindas, 2007).

1.5.2 Resistência à acidez

Os alimentos como iogurtes e leites fermentados são caracterizados por uma ligeira acidez e nos quais o agente patogénico *L. monocytogenes* tem a capacidade de sobreviver, mas também consegue resistir aos baixos valores de pH nos fagossomas dos macrófagos (Cotter e Hill, 2003). Vários ácidos orgânicos são utilizados como conservantes alimentares pela sua acção antimicrobiana uma vez que a sua forma não dissociada pode passar pela membrana celular provocando o desequilíbrio do valor de pH intracelular, alterações nas funções da membrana, alterações na osmolaridade para valores letais e, por último comprometendo vias metabólicas essenciais (Faleiro, 2011 e referências aí indicadas).

A utilização de fosfato tri sódico (TSP) foi aprovado para controlar a presença de *Salmonella* na carne de frango, no entanto este agente é ineficaz no controlo de *L. monocytogenes* no tecido de carne (Dickson *et al*, 1994). O tratamento de alface com cloro diminui o número de *L. monocytogenes* quando se aumenta a concentração deste químico, no entanto em couve não se observa qualquer diferença na inactivação (Zhang e Farber, 1996). Salmide (um composto oxi-halogenico baseado em cloreto de sódio) é eficaz na eliminação de *L. monocytogenes* em couves quando aplicado a concentrações de 100 a 200 ppm durante 10 min (Zhang e Farber, 1996). A sobrevivência de *L. monocytogenes* na superfície de alface tratada com 1% de ácido láctico ou acético sofre uma redução (Zhang e Farber, 1996) mas a utilização de ácido láctico em combinação com 100 ppm de cloro resulta numa redução mais eficaz (Zhang e Farber, 1996). Akbas e Ölmez, 2007, concluíram que a utilização de 0,5% de ácido láctico é suficiente para diminuir o número de *L. monocytogenes* na superfície das folhas de alface. Também nos casos de aplicação de 0,5% de ácido acético, ácido cítrico e ácido ascórbico é possível a diminuição do número de bactérias (Akbas e Ölmez, 2007). O ácido sórbico é um inibidor eficiente do crescimento de *L. monocytogenes*, mas tem a desvantagem que permanece no interior do alimento registando-se uma diminuição da concentração à

superfície (Carlin *et al*, 2001). Estes ácidos são geralmente considerados seguros (GRAS) para uso em produtos alimentares (Zhang e Farber, 1996).

A capacidade de *L. monocytogenes* sobreviver ao stress ácido é dependente da fase de crescimento (Cotter e Hill, 2003). As células de *L. monocytogenes* na fase estacionária sobrevivem 100% quando são expostas a valores letais de pH (pH 3,5) durante 1 hora, no entanto quando se encontram a meio da fase exponencial são mais susceptíveis e sofrem uma redução no número de células (Cotter e Hill, 2003).

A primeira defesa contra infecções no sistema gastrointestinal é a acidez das secreções gástricas que atingem valores da ordem de 1 a 3 (Stopforth *et al*, 2005). Por esta razão o número de organismos que se encontra no estômago é muito reduzido. Os doentes que são incapazes de produzir ácido clorídrico ou sofreram uma gastrectomia apresentam um excesso de crescimento de bactérias no estômago (Cotter e Hill, 2003).

Quando a bactéria é exposta a uma ligeira acidez da ordem de valores de pH de 5,5 é induzida uma resposta de tolerância ao ácido (ATR) (Gandhi e Chikindas, 2007; O'Driscoll *et al*, 1996; Davis *et al*, 1996; Dyckes e Moorhead, 2000; Faleiro *et al*, 2003), isto sugere que quando o microrganismo é adaptado previamente a condições sub - letais torna-se capaz de ultrapassar condições mais agressivas. Mais especificamente, quando as células permaneceram pelo menos 1 hora a pH 5,5 antes de serem expostas a valores letais de pH 3,5 exibem uma melhor sobrevivência em comparação com as células não adaptadas (O'Driscoll *et al*, 1996). A maioria das estirpes consegue atingir uma ATR máxima após 2 horas de adaptação (Faleiro *et al*, 2003).

A importância da síntese proteica na indução das respostas de ATR foi demonstrada através da adição de cloranfenicol (antibiótico que inibe a síntese proteica das células bacterianas) imediatamente antes da exposição ao pH 5,5, não ocorre indução de ATR (O'Driscoll *et al*, 1997). No entanto, quando o antibiótico foi adicionado 10 minutos após a exposição ao valor de pH 5,5 a indução de ATR não é impedida (O'Driscoll *et al*, 1997).

São reconhecidos vários sistemas de resistência ao ácido que assistem as bactérias Gram-positivas, como por exemplo o complexo F_1F_0 ATPase, o sistema de glutamato decarboxilase (GAD) e o sistema da arginina deiminase (Figura 4) (Faleiro, 2011; Soni *et al*, 2011 e referências aí indicadas).

A F_1F_0 ATPase é uma enzima de multisubunidades que funciona como um canal para transporte de prótons ao longo da membrana celular com utilização de ATP. A bomba de prótons tem o papel de manter o pH intracelular estável (Cotter e Hill, 2003).

As células de *L. monocytogenes* tratadas com um inibidor da actividade de ATPase (N,N'-d ciclohexilcarbodiimida (DCCD)) são mais sensíveis a exposição a valores de pH 3,0 do que células não tratadas (Soni *et al*, 2011; Cotter e Hill, 2003; Gandhi e Chikindas, 2007).

Reacções de descarboxilação consomem iões de hidrogénio para controlarem o pH do ambiente bacteriano, um exemplo é o glutamato decarboxilase (GAD) que combina um aminoácido (glutamato) com um protão intracelular produzindo γ -aminobutirato (GABA). Este produto é depois enviado para fora da célula por um transportador localizado na membrana da célula. A perda do protão da célula resulta num aumento do pH no citoplasma e a libertação do γ -aminobutirato alcalino aumenta ligeiramente o pH exterior (Cotter *et al*, 2001; Cotter e Hill, 2003; Gandhi e Chikindas, 2007). Cotter e colaboradores descobriram, em 2001, que a adição de glutamato aumenta a sobrevivência da estirpe selvagem *L. monocytogenes* LO28 no suco gástrico. A eliminação dos genes *gadA* e *gadB* do sistema GAD resulta numa maior sensibilidade a valores de pH baixos.

A via da arginina deiminase cataboliza arginina em ornitina, amónia e CO_2 . A ornitina é transportada para fora da célula em troca de uma molécula de arginina através de um transportador, independente de energia, ligado à membrana (Ryan *et al*, 2009). O amoníaco produzido combina com protões intracelulares produzindo o ião NH_4^+ aumentando assim o pH citoplasmático (Ryan *et al*, 2009). A presença desta via em bactérias orais é considerado benéfico, no entanto este sistema não parece desempenhar um papel na indução do ATR (Cotter *et al*, 2001).

Uma adaptação durante 24 horas ao stress ácido (pH 5,5) induziu a transcrição relativa do gene *sigB* (Olesen *et al*, 2010). O factor sigma regula a expressão do gene *gadB* envolvido no sistema de glutamato decarboxilase. O mutante *sigB* da estirpe *L. monocytogenes* 10403S mostrou um nível inferior de resistência ao ácido na fase estacionária em comparação com a estirpe selvagem (Wiedmann *et al*, 1998).

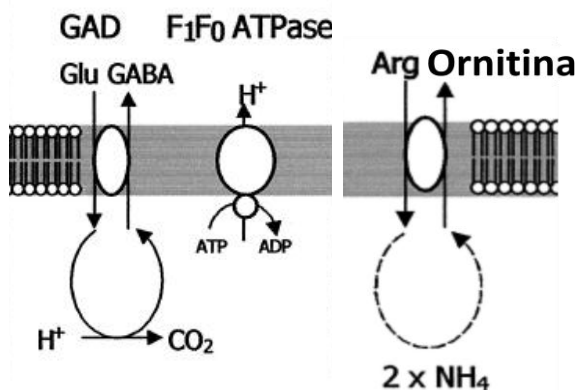


Fig. 4 - Mecanismos de resistência à acidez (Fonte: Cotter e Hill, 2003).

1.5.3 Adaptação ao sal

A utilização de sal (NaCl) como conservante alimentar tem sido largamente utilizado na indústria alimentar, em particular nas indústrias da carne. Com a utilização de sal a actividade da água é reduzida (Duché *et al*, 2002; Gandhi e Chikindas, 2007). O consumo da carne resulta numa ingestão de 20% de NaCl da dose diária recomendada diariamente. A bactéria *L. monocytogenes* é capaz de sobreviver a elevadas quantidades de NaCl, cerca de 10% (p/v) (McClure *et al*, 1989). Tal como no processo de adaptação à acidez a bactéria *L. monocytogenes* também consegue responder com uma maior tolerância a concentrações elevadas de sal quando exposta previamente a concentrações intermédias de sal (Faleiro *et al*, 2003; Adrião *et al*, 2008).

O fenómeno de osmoadaptação foi descrita pela primeira vez por Faleiro *et al* (2003) onde várias estirpes de diferentes origens alimentares foram sujeitas a um processo de osmoadaptação num meio definido (3,5% (p/v) NaCl) e as estirpes isoladas de queijo exibiram uma resposta de osmotolerância, enquanto que as estirpes isoladas de carne variaram na sua exibição de osmotolerância. Um exemplo deste tipo de resposta é exemplificado na Figura 5.

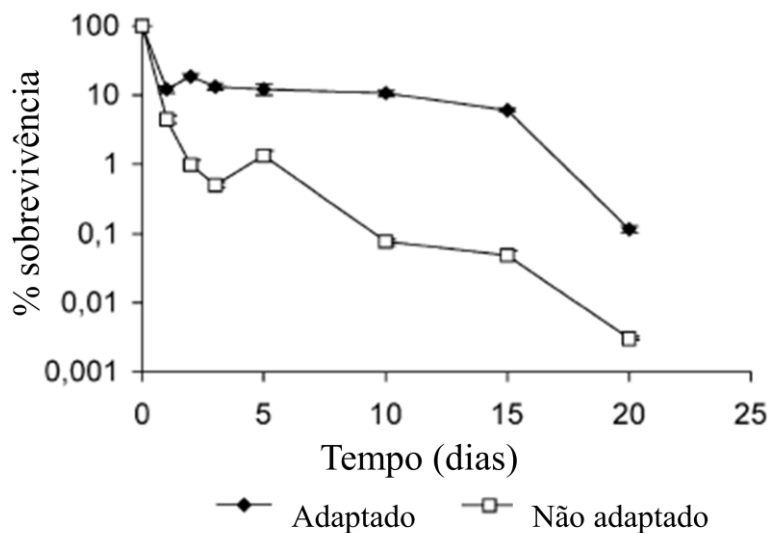


Fig. 5 – Indução de osmotolerância de *L. monocytogenes* C882 a 20% (p/v) [3,4 M] NaCl a 30°C. As células foram adaptadas em meio TM com 3,5% (p/v) NaCl por 2 horas a 30°C. As células não adaptadas foram cultivadas em meio TM sem adição de NaCl (Fonte: Faleiro *et al*, 2003).

Duché *et al.*, (2002) identificou proteínas de choque ao sal (Ssp) que são induzidas rapidamente mas por pouco tempo e proteínas de aclimação ao stress (Sap) que também são induzidas rapidamente mas permanecem expressas durante várias horas após as condições voltarem ao normal (Duché *et al.*, 2002).

Os solutos de baixo peso molecular (crio-protetores) referidos anteriormente, no caso da exposição das células de *L. monocytogenes* a baixas temperaturas, também funcionam como osmoprotectores. A presença destes solutos resulta num aumento da taxa de crescimento das células durante a exposição a condições de stress osmótico em comparação com as células em stress osmótico, mas sem a presença de osmoprotectores. O composto glicina betaína, geralmente presente em concentrações elevadas em alimentos de origem vegetal, protege o crescimento de *L. monocytogenes* na presença de concentrações da ordem de 0,3 a 0,7 M de NaCl (Sleator *et al.*, 2001).

Em meios complexos, como TSB (meio de triptona e soja) a bactéria *L. monocytogenes* consegue sobreviver na presença de 25,5% (p/v) de NaCl durante 4 dias a 37°C (Shahamat *et al.*, 1980). No entanto quando os investigadores reduziram a temperatura até 22°C a sobrevivência aumentou para 24 dias e para 132 dias a 4°C (Shahamat *et al.*, 1980). Isto implica que a resistência ao sal está dependente da temperatura (Shahamat *et al.*, 1980).

O factor σ^B também contribui na protecção contra o stress osmótico, pois as células mutantes de *L. monocytogenes* LO28 são mais sensíveis ao stress osmótico em comparação com a estirpe selvagem. Um outro gene que contribui para a resposta ao stress osmótico é o gene *ctc*, e a expressão deste gene é dependente do factor σ^B . (Gardan *et al.*, 2003; Gandhi e Chikindas, 2007).

A exposição ao sal pode contribuir para uma maior expressão de alguns factores de virulência (Olesen *et al.*, 2010). Uma adaptação a 4,5% (p/v) de NaCl durante 24 horas induziu a transcrição de genes envolvidos na invasão (internalinas) e no ciclo intracelular (*prfA*) (Olesen *et al.*, 2010).

1.5.4. Resposta aos sais biliares e bÍlis

Para a bactéria *L. monocytogenes* sobreviver no tracto intestinal tem que tolerar 1 litro de bÍlis, que é segregado pelo fÍgado, todos os dias. A bÍlis é uma secreção digestiva que tem um papel na solubilização e emulsificação das gorduras (lÍpidos), que

afecta as proteínas e fosfolípidos da membrana celular e pode perturbar a homeostasia (sistema que mantém a temperatura e pH interno estável) (Begley *et al*, 2005). A bÍlis tem ainda uma actividade antimicrobiana (Dussurget *et al*, 2002). A bÍlis é uma solução aquosa amarela esverdeada composta pelos ácidos biliare, colesterol, fosfolípidos, e a biliverdina (Begley *et al*, 2006). Sais biliare são moléculas anfipáticas, que podem degradar membranas virais e bacterianas contendo lípidos (Dussurget *et al*, 2002).

A bactéria *L. monocytogenes* é considerada uma bactéria comum do tracto gastrointestinal de humanos e animais (Warriner e Namvar, 2009). Possui a enzima BSH (hidrolase dos sais biliare) que está envolvida na transformação de ácidos biliare conjugados em ácidos biliare não conjugados que precipitam a pH baixo tornando-os menos tóxicos, contribuindo para a sobrevivência de *L. monocytogenes* no tracto intestinal (Dussurget *et al*, 2002; Begley *et al*, 2006). Foi proposto que a forma não dissociada (protonada) dos sais biliare pode ser tóxica devido a acidificação intracelular, e para as células se protegerem formam compostos não conjugados que são mais fracos. A desvantagem é que os ácidos biliare não conjugados são menos eficientes na emulsificação dos lípidos e na formação das micelas. Mutações no gene *bsh* torna as células mais sensíveis ao stress pela bÍlis e os sais biliare. O gene *bsh* é positivamente regulado pelo PrfA (Begley *et al*, 2006).

A bÍlis do porco tem a maior semelhança com o humano, no entanto a bÍlis de bovino é importante para o estudo de tolerância, portanto para o estudo no sistema gastrointestinal utilizam-se ambas (Begley *et al*, 2005).

As células de *L. monocytogenes*, na fase estacionária, que crescem na presença de CO₂ são altamente susceptíveis aos sais biliare (Begley *et al*, 2005). A actividade de BSH aumenta com a descida do nível de oxigénio externo e as células bacterianas ficam sob stress oxidativo quando expostas à bÍlis – devido à produção de radicais livre de oxigénio (Dussurget *et al*, 2002).

A colonização da vesícula biliar com *L. monocytogenes* sugere uma tolerância a níveis elevados de bÍlis. Begley *et al* demonstrou, em 2005, que a estirpe LO28 tolera concentrações elevadas de bÍlis porcino, bovino e humano.

Uma adaptação a níveis extremamente baixas de bÍlis (0,08%) durante 5 segundos, resultou numa protecção substancial contra níveis normalmente letais. Esta adaptação é independente da síntese proteica (Begley *et al*, 2005).

1.5.5 Protecção cruzada

A bactéria *L. monocytogenes* é resistente contra ligeiras alterações no ambiente, mas na presença de alterações relevantes ocorre uma resposta ao stress complexa, que se direcciona mais para a sobrevivência da bactéria em vez do seu crescimento (Hill *et al*, 1995).

Uma resposta de tolerância ao ácido (ATR) resulta numa adaptação das células bacterianas a uma condição ligeiramente ácida (pH 5,0 a 6,0). Esta resposta, além de dar resistência contra uma posterior exposição ácida letal, pode igualmente conferir uma protecção cruzada, nomeadamente contra temperaturas elevadas, stress oxidativo, osmótico, presença de etanol e bacteriocinas (O'Driscoll *et al*, 1996; Faleiro *et al*, 2003; Chorianopoulos *et al*, 2011).

No estudo de Faleiro *et al*, (2003) estirpes de *L. monocytogenes* de diferentes origens alimentares foram adaptadas a valores intermédios de pH ácido (pH 5,5 ajustado com ácido láctico) e transferidas para meio de cultura com 20% (p/v) de NaCl. Neste estudo observou-se que as estirpes adaptadas provenientes de queijo têm uma maior sobrevivência quando expostas ao stress osmótico do que as não adaptadas. Todas as estirpes beneficiaram da adaptação ao ácido, excepto um isolado de carne. Foi igualmente realizado o inverso, as células sofreram uma osmoadaptação a 3,5% (p/v) NaCl e, em seguida foram sujeitas a condições ácidas letais (pH 3,5 ajustado com ácido láctico) e neste caso foi registado uma variação na resposta de tolerância ao ácido entre as diferentes estirpes (Faleiro *et al*, 2003).

A exposição de células de *L. monocytogenes* na fase exponencial ao ácido (pH 5,5), calor (42°C) ou sal (5% NaCl) aumentou a tolerância à bÍlis (Begley *et al*, 2005).

1.6 Modelos de infecção de *Listeria monocytogenes*

O nosso sistema immune é muito eficiente e é submetido a um constante ataque por inúmeros microrganismos os quais recorrem a diferentes factores de virulência para encontrar eventuais saídas ao processo de defesa do hospedeiro (Wollert *et al*, 2007). Esta constante alteração dos factores dificulta o estudo do agente patogénico *in vivo*. Para o estudo da virulência de *L. monocytogenes* existem modelos com utilização de ratinhos, porquinhos-da-Índia e em insectos como a *Galleria mellonella* (Wollert *et al*,

2007; Stephens *et al*, 1991; Joyce e Gahan, 2010; Mukherjee *et al*, 2009). Para utilizar os modelos de animais é preciso ter em conta as condições éticas estabelecidas, por exemplo, pela Federação Europeia dos Animais de Laboratório (Felasa). No caso de injeções via intravenosa os animais têm que ser anestesiados primeiro (Pérez-Garcia *et al*, 2002).

1.6.1 Ratinhos

Não existem infecções naturais de *L. monocytogenes* em ratinhos (Lecuit, 2007). A infecção via oral de ratinhos não é possível, uma vez que a sua passagem pelas células epiteliais do intestino é baixa, muito semelhante à da espécie não patogénica, *L. innocua* (Pron *et al*, 1998). Para ultrapassar esta barreira foram introduzidas outras vias de administração, como por exemplo a via intravenosa. Nos ratinhos esta via de inoculação já mostra resultados de infecção letal, com a qual pode ser determinada a dose letal e pode ser determinada a sua virulência (Lecuit, 2007). Como foi referido no ponto 1.3 o factor de virulência, a internalina A (InlA) liga-se a E-caderina humana (uma proteína transmembranar, que tem um papel na adesão celular), no entanto a InlA não se consegue ligar à E-caderina dos ratinhos (mEC1), apesar de uma significativa percentagem de homologia (90%). A internalina B (InlB) reconhece o receptor Met nos ratinhos (Figura 6). Não se consegue estudar a interacção de InlA e de InlB desta maneira e para ultrapassar este obstáculo foram elaborados dois métodos para modificar a InlA. Um deles foi modificar a InlA, de tal maneira que consegue reconhecer a mEC1, ou seja uma murinização (adaptação da bactéria aos ratinhos) em vez de humanizar os ratinhos, que resulta num modelo animal flexível para investigar a listeriose *in vivo* (Wollert *et al*, 2007). Outra maneira é criar um ratinho transgénico que expressa o receptor humano (neste caso a E-caderina). Este receptor pode estar no lugar do mEC1 ou pode estar em conjunto com o seu ortólogo não funcional (Lecuit, 2007).

Quando se inocula através da via intravenosa, pode-se encontrar, após alguns minutos, a maioria das células bacterianas no baço e no fígado (Camejo *et al*, 2009). Após a administração das células de *L. monocytogenes* via intravenosa os factores de virulência são expressos (Camejo *et al*, 2009). Um total de 568 genes tem uma expressão diferente durante a infecção no hospedeiro quando comparado com o crescimento no meio de cultura Brain Heart Infusion (BHI) a 37°C (Camejo *et al*, 2009).

A análise de expressão de 31 genes conhecidos a estarem envolvidos na virulência de *Listeria* no modelo de ratinhos mostrou 29 sobre expressos durante a infecção. O grupo de genes de virulência contendo os genes *prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* e *plcB* tem uma elevada actividade nos primeiros 3 dias da infecção. Os genes *inlA*, *inlB* e *uhpT* (transportador de fosfato) também são activados durante a infecção. Dois genes implicados na sobrevivência intracelular e positivamente regulados pelo PrfA, *lmo0206* e *lmo0207* são activados nos ratinhos infectados. Três genes que codificam factores de virulência envolvidos em modificações da parede celular bacteriana (*murA*, *iap* e *pgdA*) têm uma expressão elevada *in vivo*. A maioria dos genes implicados em respostas ao stress têm uma expressão elevada no hospedeiro, como por exemplo as chaperoninas DnaK e GroEL. Setenta genes regulados pelo factor SigB têm uma expressão mais elevada *in vivo* (Camejo *et al*, 2009).

Estudos recentes usando várias serovares de *L. monocytogenes* mostraram que inoculações orais de ratinhos com estirpes epidémicas da serovar 4b conseguem provocar infecções sistémicas, sugerindo desta maneira o papel de factores de virulência específicos (Czuprynski *et al*, 2003).

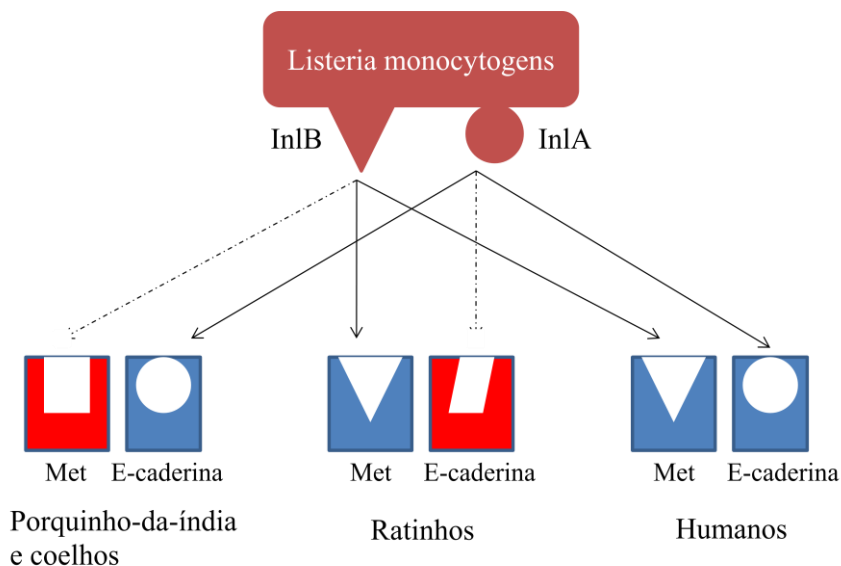


Fig. 6 - Especificidade de InlA e InlB nas várias espécies (Fonte: Lecuit, 2007).

1.6.2 Porquinhos-da-índia e coelhos

O porquinho-da-índia foi um dos animais nos quais Murray identificou a bactéria *L. monocytogenes* (Murray, 1955). A via de infecção neste modelo é, como nos ratinhos, a via intravenosa. As infecções orais falham no desenvolvimento da infecção do sistema nervoso central neste modelo (Gray e Killinger, 1966; Lecuit, 2007). A InlA reconhece a E-caderina nos porquinhos-da-índia e nos coelhos e a InlB não reconhece o receptor Met nestes dois animais (Figura 6) (Wollert *et al*, 2007).

Como a listeriose é uma doença grave em grávidas, Bakardjiev e colaboradores, (2004) desenvolveram o modelo de porquinhos-da-índia grávidas devido à semelhança da placenta destes animais com a dos humanos. A dose mais baixa que causou infecção materna e feto-placental foi de 10^6 bactérias. Após a infecção ocorreram alguns abortos espontâneos e após 48 horas encontraram o dobro de bactérias na placenta. A infecção com um mutante de *L. monocytogenes* 10403S com o gene InlA eliminado resultou num decréscimo de duas vezes no processo de invasão (Bakardjiev *et al*, 2004).

1.6.3 Insectos

O estudo de infecções em insectos foi realizado pela primeira vez no século 19 por Pasteur (Kavanagh e Reeves, 2004). A mariposa de cera, *Galleria mellonella* é cada vez mais utilizada como modelo de estudo da virulência de microrganismos (Joyce e Gahan, 2010; Mukherjee *et al*, 2010; Kavanagh e Reeves, 2004). Pertence à ordem *Lepidoptera* e à família *Pyralidae*. As larvas são brancas opacas, aproximadamente 3 cm em comprimento e pesam entre 0,3 e 0,5 gramas (Kavanagh e Reeves, 2004). A fagocitose, encapsulação e reacções citotóxicas promovem a imunidade dos invertebrados (Stanley-Samuelson *et al*, 1991). As lectinas, que têm uma actividade antibacteriana, também ajudam na protecção dos insectos (Stanley-Samuelson *et al*, 1991). O sistema imune inato tem uma elevada homologia funcional e estrutural nos insectos e mamíferos (Kavanagh e Reeves, 2004). A primeira linha de defesa é o cutículo, que serve de pele como nos mamíferos. Uma ferida no cutículo activa a resposta imune humoral, com a produção de agentes antibacterianos (Kavanagh e Reeves, 2004). A cavidade do insecto contém a hemolinfa, que tem uma função análoga ao sangue nos mamíferos, transporta, por exemplo nutrientes e moléculas de sinal (Kavanagh e Reeves, 2004). Quando há uma invasão de microrganismos ocorre uma alteração na população que circula no hemócito e há nova produção de proteínas

(Kavanagh e Reeves, 2004). Células granulares e plasmatócitos estão envolvidas no processo da fagocitose do material estranho em *G. mellonella*. A enzima de protecção ao stress oxidativo, a superóxido, bem como o gerador de stress oxidativo, o peróxido de hidrogénio foi detectado nestes insectos, que podem contribuir para o sistema imunitário inato. O superóxido interage com o óxido nítrico para formar o peroxinitrito que é um agente oxidante com elevadas propriedades citotóxicas (Kavanagh e Reeves, 2004). A lisozima que tem a capacidade de eliminar um grande número de bactérias Gram-positivas foi encontrada nas células hemostáticas (Kavanagh e Reeves, 2004).

O modelo de *G. mellonella* tem uma grande vantagem sobre os outros modelos de infecção, já que as larvas podem ser incubadas a 37°C para simular a temperatura do corpo humano (Joyce e Gahan, 2010). Mukherjee *et al*, (2010) e Joyce e Gahan, (2010) estudaram a capacidade de infecção de *Listeria* neste modelo. Através de uma experiência para a dose letal chegaram a conclusão que 10⁶ CFU/larva é a quantidade de células que melhor indica a virulência da estirpe (Mukherjee *et al*, 2010). No estudo de Joyce *et al* (2010) foi utilizada uma estirpe de *L. monocytogenes* transformada que é bioluminescente para observar o seu crescimento na larva. Os autores do referido estudo observaram que duas horas após a infecção o nível de bioluminescência diminuiu rapidamente e após 4 horas o nível aumenta continuando desta maneira até às 10 horas pós infecção. O mesmo foi observado quando foi determinada a viabilidade - por métodos clássicos (Joyce e Gahan, 2010). Foi ainda observado que durante a infecção de *G. mellonella* com *L. monocytogenes* ocorre um aumento na pigmentação (Joyce e Gahan, 2010).

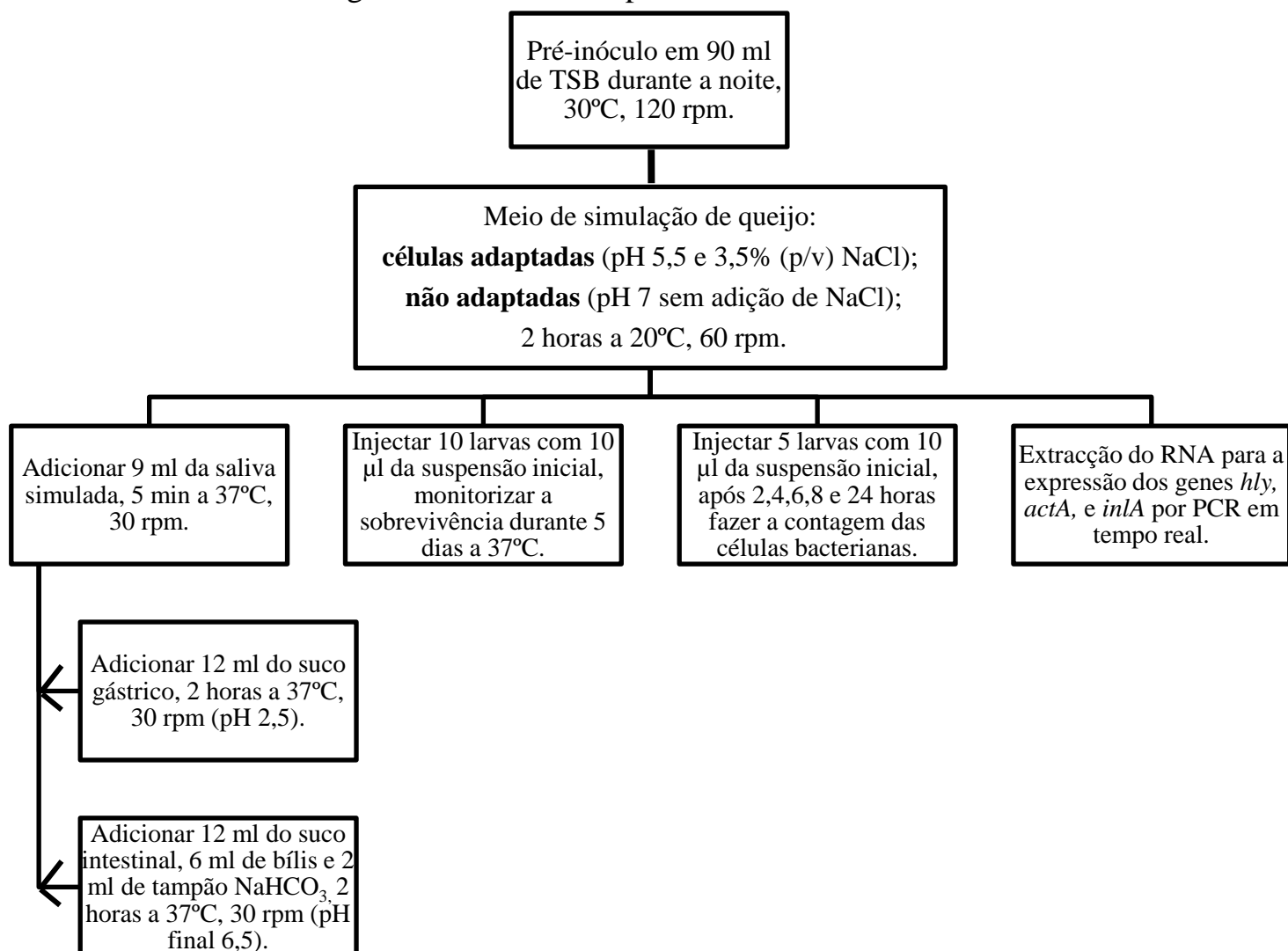
Para estudar quais os factores de virulência importantes na infecção foram utilizados mutantes de *L. monocytogenes* EGD nos genes *actA*, *inlA*, *sigB*, PrfA e LLO. Entre as mutantes com o gene *actA*, *inlA* e *sigB* eliminados e a estirpe selvagem não se observa diferença na virulência. No entanto para mutantes de PrfA ocorre uma diminuição na virulência e no caso das mutantes em LLO a virulência foi totalmente anulada (Joyce e Gahan, 2010). Como é reconhecido que estes genes de virulência têm uma expressão que é dependente da temperatura (McGann *et al*, 2007; Peel *et al*, 1988) os autores acima indicados estudaram o efeito da temperatura a 30°C e a 37°C utilizando a mesma estirpe selvagem e mutantes e verificaram que a morte das larvas ocorreu a ambas as temperaturas, no entanto existe um atraso de 5 a 7 h a 30°C no valor de mortalidade. Foi então sugerido a utilização da temperatura de 37°C na realização deste tipo de ensaios (Joyce e Gahan, 2010; Mukherjee *et al*, 2010).

1.7 Objectivos

O presente estudo tem como objectivo principal a análise do proteoma intracelular da estirpe de *L. monocytogenes* C882 quando exposta a condições de adaptação (pH 5,5 e 3,5% (p/v) NaCl) num meio de cultura de simulação de queijo e depois submetida a um modelo de simulação do tracto gastrointestinal. A viabilidade das células bacterianas no modelo foi avaliada.

De modo a analisar o possível efeito das condições de adaptação no potencial de virulência foram utilizadas as larvas de *G. mellonella*.

1.8 Fluxograma do trabalho experimental



Capítulo II - Material e Métodos

2.1 Material

2.1.1 Equipamento

- Agitador magnético com aquecimento Agimatic-E (Selecta, Espanha);
- Autoclave Uniclave 88 (AJC, Lisboa, Portugal);
- Balança analítica XS-410 (Fisher Scientific, Portugal);
- Balança analítica AE 200 (Mettler, EUA);
- Banho SW 22 (Julabo, Alemanha);
- Bomba de vácuo (Millipore, EUA);
- Câmara de Fluxo Laminar Bio48 (Faster, Itália);
- Câmara de PCR Mini-V/PCR (Telstar, Espanha);
- Centrifuga Mikro 22R (Hettich, Reino Unido);
- Centrifuga Megafuge 1.0R (Heraeus, Reino Unido);
- Congelador ultra low temperature freezer -80°C U725 (Innova New Brunswick Scientific, EUA);
- Espectrofotómetro Novaspec®II (Amersham Pharmacia Biotech, Espanha);
- Espectrofotómetro Nanodrop 2000c (Thermo Scientific, EUA);
- Ettan IPGphor II Isoelectric Focusing System (GE Healthcare, Espanha);
- Electrophoresis power supply EPS-301 (Amersham Pharmacia Biotech, Espanha);
- Incubadora Raypa, 30°C (Selecta, Espanha);
- Incubadora 37°C (Binder, EUA);
- Leitor de microplacas Tecan Infinite M200 (Tecan, Suíça);
- Lupa SZ-ST (Olympus, Alemanha);
- Medidor de pH GLP 21 (Crison, Espanha).
- Microscópio ATC 2000 (Leica, Portugal);
- Termociclador T-personal (Biometra, Alemanha);
- Termociclador T1 (Biometra, Alemanha);

- Termociclador iCycler iQ multicolor real time PCR detection system (BioRad, Hercule, EUA);
- Sonicador soniprep 150 (Sanyo, Reino Unido),
- Tina de electroforese Ettan DALTsix (GE Healthcare, Espanha);
- Vortex L46 (Labinco, Holanda).

2.1.2 Soluções

- Tampão de lavagem: 100 mM Tris-HCl pH7, 100 mM EDTA e 0,1 ml 100x protease inhibitor mix, (GE Healthcare, Espanha);
- Tampão de lise: 25 mM Tris-HCl pH7, 25 mM EDTA, 1% DTT e 0,25 ml 100x protease inhibitor mix, (GE Healthcare, Espanha);
- Tampão de solubilização: 7 M ureia, 2 M tioureia, 4% (p/v) CHAPS, 40 mM DTT, 0.8% (v/v) Pharmalyte (GE Healthcare, Espanha);
- Tampão de equilíbrio: 6 M ureia, 75 mM Tris-HCl pH 8.8, 2% SDS, 29.3% glicerol, 0.002% azul de bromofenol;
- Tampão fosfato salino (PBS) 1x: 1,5 mM KH_2PO_4 , 10,6 mM Na_2HPO_4 , 2,7 mM KCl, 0,137 M NaCl;
- Agarose para cobertura do gel SDS-PAGE: 25 mM Tris, 192 mM glycine, 0,1% (p/v) SDS, azul de bromofenol, 0,5% (p/v) agarose;
- Solução corante-Coomassie Blue: 45% (v/v) metanol, 9,1% (v/v) ácido acético, 0.025% Coomassie Brilliant Blue R;
- Solução descorante dos géis SDS-Page: 7.5% (v/v) ácido acético glacial, 5% (v/v) metanol;
- Solução TGS 10x: 250 mM Tris, 1.92 M glicina, 1.0% (p/v) SDS;

Plus One Silver Staining kit (GE Healthcare, Espanha):

- Solução de fixação: 30% (v/v) etanol, 10% (v/v) ácido acético glacial;
- Solução de sensibilização: 30% (v/v) etanol, 5% (p/v) tiosulfato de sódio, 0,83 M acetato de sódio;
- Solução de nitrato de prata: 2,5% (p/v) nitrato de prata;
- Solução de desenvolvimento: 0,24 M carbonato de sódio, 37% (p/v) formaldeído;
- Solução de paragem: 0,039 M EDTA- Na_2 .

Suco de saliva sintético (50 ml)

- KCl 89,6 g/L; KSCN 20 g/L; NaH₂PO₄ 88,8 g/L; Na₂SO₄ 57 g/L; NaCl 175,3 g/L; NaHCO₃ 84,7 g/L; Ureia 25 g/L; 0,1 ml de α -amilase; 1,5 mg de ácido úrico; 2,5 mg de mucina. O valor de pH é $6,8 \pm 0,02$.

Suco gástrico simulado (60 ml)

- NaCl 175,3 g/L; NaH₂PO₄ 88,8 g/L; KCl 89,6 g/L; CaCl₂.2H₂O 22,2 g/L; NH₄Cl 30,6g/L; 90 μ l de HCl (37% g/g); Glicose 65 g/L; Ácido Glucurónico 2g/L; Ureia 25 g/L; Cloridrato de Glucosamina 33 g/L; 0,12 g de BSA; 0,3 g de Pepsina; 30 ml de mucina 12 g/L. O valor de pH é $2,5 \pm 0,02$.

Suco intestinal simulado (30 ml)

- NaCl 175,3 g/L; NaHCO₃ 84,7 g/L; K₂H₂PO₄ 8 g/L; KCl 89,6 g/L; MgCl₂ 5 g/L; 10,8 μ l de HCl (37% g/g); Ureia 25 g/L; CaCl₂.2H₂O 22,2 g/L; 0,06 g de BSA; 0,54 g de Pancreatina; 0,09 g de Lipase. O valor de pH é $8,1 \pm 0,2$.

Suco de bÍlis simulado (20 ml)

- NaCl 175,3 g/L; NaHCO₃ 84,7 g/L; KCl 89,6 g/L; 6 μ l de HCl (37% g/g); Ureia 25 g/L; CaCl₂.2H₂O 22,2 g/L; 0,072 g de BSA; 0,6 g de bÍlis do porco; 0,6 g de bÍlis de bovino. O valor de pH é $8,2 \pm 0,2$.

2.1.3 Meios de cultura

- ÁguA peptonada tamponada (Biokar, França). Preparado de acordo com as instruções do fabricante.
- Caldo de Triptona Soja (TSB, Oxoid, Reino Unido). Preparado de acordo com as instruções do fabricante.
- Agar infusão de coração e cérebro (BHI agar, Biokar, França). Preparado de acordo com as instruções do fabricante, com 1,5% de agar.
- Meio de simulação de queijo: 0,2% de Glicose (modificação), Amicase 15 g/L; Lactato de Sódio 38 ml/L; Extracto de Levedura 3 g/L; Cloreto de Cálcio 0,10 g/L; Sulfato de magnésio heptahidratado 1,02 g/L; Dihidrogenofosfato de Potássio 6,80 g/L; Lactose monohidratado 2,10 g/L; L-metionina 6 g/L.

De modo atingir as condições de pH e sal que se encontram habitualmente em queijo, o respectivo meio foi ajustado a pH 5,5 (com NaOH 2M) e com um teor de NaCl de 3,5% (p/v).

2.1.4 Material biológico

As bactérias utilizadas neste estudo estão indicadas na Tabela 2. As culturas foram mantidas a -80°C em meio TSB suplementado com 25% (v/v) glicerol e recuperadas em meio Triptona Soja Agar (TSA) durante 24 horas a 30°C.

Tabela 2: Estirpes de bactérias utilizadas neste estudo.

Bactéria	Serovar	Referência, Fonte
<i>L. monocytogenes</i> C882	4b	Faleiro <i>et al</i> , 2003
<i>L. monocytogenes</i> Scott A	4b	UL, Reino Unido

UL: Department of Infection, Immunity and Inflammation, University of Leicester, Leicester, Reino Unido.

2.2 Métodos

2.2.1 Coloração de Gram

A coloração de Gram foi utilizada para confirmação da pureza das culturas de *L. monocytogenes*. Para tal, foi preparado um esfregaço de cada uma das culturas. Seguidamente deixou-se secar ao ar, e procedeu-se, em seguida, à sua fixação pelo calor. Após o devido arrefecimento o esfregaço foi inundado com cristal de violeta (Merck), e deixou-se actuar por 2 min. O corante foi eliminado por lavagem com água destilada e o esfregaço foi, depois, tratado com lugol (Merck) que actuou cerca de 30s. Em seguida para a remoção intracelular do complexo lugol/cristal de violeta, foi aplicado álcool iodado (uma mistura de álcool com 5% de lugol) por alguns segundos. De imediato procedeu-se à lavagem com água destilada e, seguidamente à aplicação do segundo corante, a safranina (Merck), que se deixou actuar por 2 min. Após lavagem com água destilada deixou-se secar ao ar. Observou-se ao microscópio óptico com uma ampliação de 1000x.

2.2.2 Adaptação em meio de simulação de queijo

Como indicado no ponto 2.1.4 as células de *L. monocytogenes* C882 sempre que necessário foram recuperadas em meio Triptona Soja Agar (TSA) durante 24 horas a 30°C. O pré-inóculo foi preparado pela transferência de uma ansada da cultura em TSA para 90 ml de TSB com uma incubação a 30°C com agitação (120 rpm) durante a noite. As células do pré-inóculo (30 ml) foram transferidas para o meio de simulação de queijo modificado (adição de 0,2% de glicose que é considerada a quantidade mínima para o crescimento de *Listeria monocytogenes* (Trivett e Meyer, 1971; Kagkli *et al*, 2006, Jones *et al*, 1997; Faleiro *et al*, 2003)) e o valor de pH ajustado a pH 5,5 e adição de 3,5% (p/v) de NaCl. Como controlo as células de *L. monocytogenes* foram submetidas a condições de não adaptação no mesmo meio, mas com um valor de pH de 7,0 e sem adição de sal. O meio de simulação de queijo foi esterilizado por filtração a vácuo, utilizando uma membrana com 0,2 µm de diâmetro de poro (Pall, Texas, USA). As células permanecem neste meio por 2 h a 20°C com agitação suave (60 rpm). A temperatura de incubação escolhida é a geralmente encontrada durante o processamento de queijo. A viabilidade das células foi determinada no início e no final da incubação através do método descrito por Miles e Misra (1938).

2.2.3 Simulação das condições do tracto gastrointestinal

A simulação das condições do tracto gastrointestinal são as descritas por Versantvoort *et al.*, (2005). Após a preparação da saliva sintética e dos sucos gástrico, intestinal e biliar simulados, estes são mantidos a 37°C. A cultura em meio de queijo (100 ml) é submetida a centrifugação a 3214 xg durante 5 min a 4°C. O pellet obtido é ressuspenso em 9 ml de saliva. A incubação decorreu durante 5 min a 37°C com agitação suave (30 rpm). Após este período de incubação adicionou-se 12 ml de suco gástrico. A mistura foi colocada a 37°C durante 2 h. com agitação (30 rpm). Em seguida são adicionados 12 ml de suco intestinal, 6 ml de suco de biliar e 2 ml de tampão NaHCO₃ 84,7 g/L. A incubação decorreu em banho-maria a 37°C durante 2 h com agitação (30 rpm). A viabilidade bacteriana, na saliva, suco gástrico e no suco intestinal foi determinada pelo método de Miles e Misra (1938) em meio BHI agar. As determinações foram realizadas logo após a adição do suco e ao fim de 30, 60 e 120 min.. As diluições da cultura foram realizadas em água peptonada tamponada. O pellet final foi recolhido por centrifugação a 1575 xg durante 10 min a 4°C.

2.2.4 Extracção das proteínas celulares

O método utilizado para a extracção das proteínas celulares foi uma adaptação do método descrito por Folio *et al* (2004).

Após recolha do *pellet*, em triplicado para cada cultura, procedeu-se à sua lavagem (por três vezes) com 1 ml de tampão de lavagem (100 mM Tris-HCl pH 7, 100 mM EDTA e 0,1 ml 100x *protease inhibitor mix*, [GE Healthcare]). A centrifugação entre cada passo de lavagem decorreu a 16090 xg durante 5 min a 4°C. Cada *pellet* obtido foi suspenso em 500 µl de tampão de lise (25 mM Tris-HCl pH 7, 25 mM EDTA, 1% DTT e 0,25 ml 100x *protease inhibitor mix*) e posteriormente as amostras foram tratadas por sonicação durante 15 min com o auxílio de esferas de vidro (Sigma). As esferas foram adicionadas às amostras na proporção de 1/2 do volume da amostra original. Para a eliminação das contaminações por ácidos nucleicos adicionou-se 1 µl de DNase RQ1 (1 U/µl), Promega) e 5 µl de RNase A (10 mg/ml, Promega) e incubou-se em gelo por 30 min. Seguiu-se uma centrifugação a 3000 xg durante 10 min a 4°C. Recolheu-se o sobrenadante e colocou-se num eppendorf de 2 ml e ao qual se juntou acetona numa proporção cinco vezes o seu volume. A mistura foi realizada por inversão. A amostra foi colocada a -20°C durante 1 hora e foi depois sujeita a uma centrifugação a 18000 xg 4°C durante 30 min. O sobrenadante foi eliminado e o *pellet* foi secado ao ar. Seguidamente adicionou-se 300 a 400 µl de tampão de solubilização e deixou-se a proteína a solubilizar durante 1 hora. Centrifugou-se 2 min a 2790 xg 4°C e o sobrenadante foi recolhido e a quantificação da proteína foi realizada pelo método de Bradford, em seguida as amostras foram conservadas a -80°C.

2.2.5 Quantificação das proteínas pelo método de Bradford

Para determinar a quantidade de proteína nas amostras obtidas recorreu-se ao método de Bradford (1976), com a utilização do sistema da Bio-Rad Protein Assay. Este método baseia-se numa ligação do corante, no qual ocorre uma troca diferencial das cores do corante em resposta à variação da concentração da proteína. A absorvência máxima para uma solução ácida varia desde 465 a 595 nm quando se dá a ligação à proteína. O corante liga-se primeiro a resíduos de aminoácidos aromáticos e básicos, especialmente arginina.

Preparou-se uma diluição de 1:5 em água destilada. Este reagente diluído pode ser usado aproximadamente durante duas semanas quando conservado à temperatura ambiente. Como padrão foi preparada uma solução de albumina bovina (BSA) em água destilada (1 mg/ml). Para a preparação da curva padrão foram feitas cinco diluições em tampão de solubilização, a partir da solução stock: o volume final foi de 10 µl (200 µg/ml, 400 µg/ml, 500 µg/ml, 600 µg/ml e 800 µg/ml). Como referência colocou-se 10 µl do tampão de solubilização no poço da microplaca. Às amostras a quantificar foi adicionado 2 µl de cada uma a 8 µl de tampão de solubilização. A cada poço da microplaca juntou-se 200 µl do reagente diluído, e a homogeneização decorreu com movimentos circulares e de subida e descida do líquido. A mistura foi incubada por 5 min. a 37°C. Ao fim deste intervalo a absorvência foi medida a 595 nm no leitor de microplacas. A equação da recta foi obtida e em seguida a concentração de proteína nas amostras foi determinada através da curva padrão construída.

2.2.6 Electroforese bi-dimensional (2DE)

No presente estudo utilizou-se a técnica de electroforese bi-dimensional para analisar as respostas de adaptação simultânea de *L. monocytogenes* a um valor de pH (pH 5,5) e de concentração de sal (3,5%, p/v, NaCl) num meio de simulação de queijo seguido de uma exposição a condições de simulação do sistema gastrointestinal.

Esta técnica consiste em separar as proteínas em duas dimensões. Na primeira dimensão as proteínas são separadas através do seu ponto isoeléctrico (pI), ou seja o valor de pH na qual a carga total é neutra. De seguida as proteínas são separadas na segunda dimensão através do seu peso molecular. Desta maneira consegue-se obter as proteínas num gel de poliacrilamida em que estão separadas conforme o seu pI e o peso molecular. Cada passo é explicado nos pontos a seguir.

2.2.6.1 Rehidratação e focagem isoeléctrica das tiras de gel de poliacrilamida

As proteínas derivadas das duas condições em estudo, adaptação (pH 5,5 e 3,5 % NaCl) e não adaptação (pH 7,0 sem NaCl) são solubilizadas em tampão de solubilização para serem aplicadas em tiras de gel para separação das proteínas com base no seu

ponto isoelétrico (pI) (1ª dimensão). A carga de uma proteína depende da sua composição, conformação, presença de grupos prostéticos e do pH onde estão inseridas. Uma proteína tem grupos carregados com ambas as polaridades e por isso tem um ponto isoelétrico, pI, o valor de pH para o qual fica imóvel num campo eléctrico. Geralmente os valores pI das proteínas encontram-se entre os valores de 3-10 e a maioria tem valores inferiores ou iguais a 7,0. As proteínas que são ricas em grupos acídicos têm valores de pI próximos de 3, enquanto que as proteínas que são ricas em resíduos básicos têm valores de pI perto de 10 e as proteínas com quantidades semelhantes de resíduos básicos e ácidos têm valores de pI próximos de 7. Ao aplicarmos uma corrente eléctrica à mistura de proteínas através duma solução, que tem um gradiente de pH estável, na qual o valor de pH aumenta ligeiramente do ânodo para o cátodo, cada proteína vai migrar para a posição no gradiente de pH correspondente ao seu ponto isoelétrico. Se uma molécula de proteína se afasta da sua posição, a sua carga total altera quando se move para uma região com um valor de pH diferente e as forças electroforéticas resultantes vão move-la de volta à sua posição de carga neutra (isoelétrica). Cada espécie de proteína é por isso “focada” numa banda perto do seu ponto isoelétrico que pode ser tão pequeno como 0,01 unidade de pH. Este processo é então chamado de focagem isoelétrica (Voet e Voet, 2004).

O processo de focagem isoelétrica é iniciado com a lavagem dos sarcófagos com álcool a 96% e deixa-se secar ao ar. Para as amostras em estudo usaram-se as tiras Immobiline Drystrips de pH 4-7, lineares, 18 cm (GE Healthcare, Espanha). O valor de gradiente de pH 4-7 foi o escolhido uma vez que a maior parte das proteínas de *L. monocytogenes* se encontram nesta gama de valores (Pinto, *et al* em preparação). Estas tiras aceitam uma quantidade máxima de proteína de 450 µg. As tiras podem receber um volume máximo de 340 µl. Após a determinação da concentração de proteína nas amostras foi calculado o volume a utilizar em cada tira. Num eppendorf colocou-se a quantidade calculada de tampão de rehidratação com Destreak (previne problemas de arrastamento que ocorrem geralmente devido à reoxidação quando se trabalha com géis que contêm regiões básicas acima de 7. O reagente estabiliza os grupos tiol como os disulfuretos reduzindo assim o arrastamento e os pontos extras causados por vários estágios de oxidação) e juntou-se a quantidade de volume da solução proteica necessária para perfazer 450 µg. Com a micropipeta misturou-se bem evitando a formação de bolhas de ar e aplicou-se a amostra ao longo do sarcófago, em forma de gotas, entre os dois eléctrodos. Colocou-se a tira, com o gel em contacto com a amostra, no sarcófago.

Deixou-se rehidratar durante 1 hora à temperatura ambiente. Juntou-se parafina líquida até encher o sarcófago e colocou-se a tampa evitando a formação de bolhas. A rehidratação correu durante 11 horas no IPGphor a 20°C, 30V e 50 μ A/strip. Após este período foi retirada a parafina da tira tendo o cuidado de verificar que o gel estava virado para cima. Voltou-se a colocar a tira com nova parafina no sarcófago e a selar o sistema com a tampa tendo sempre o cuidado de não formar bolhas de ar. O passo seguinte foi prosseguir com a focagem isoelétrica nas seguintes condições: temperatura de 20°C, 50 μ A/strip, 100V durante 1 hora step-n-hold, seguido por 1 hora a 500 V step-n-hold, depois 1 hora gradiente a 8000V e no fim de 8000V até 60000 Vhr step-n-hold. Depois deste procedimento as tiras, sempre que não foram de imediato submetidas a análise por 2DE, foram guardadas a -80°C até ao seu processamento.

2.2.6.2 Equilibração

Antes da electroforese é necessário o processo de equilibração das tiras sujeitas a focagem isoelétrica, de modo a que as proteínas separadas interajam completamente com o SDS (Görg *et al*, 2004). No processo de equilibração das tiras há uma perda selectiva das proteínas que não entraram adequadamente no gel da focagem isoelétrica (O'Farrell, 1975). O tampão de equilibração diminui os efeitos electroosmóticos, os quais são responsáveis por uma transferência reduzida das proteínas da primeira para a segunda dimensão.

No processo de equilibração são utilizados agentes redutores, como o DTT que quebra as ligações dissulfídicas que contribuem para a estrutura terciária, às quais o SDS é incapaz de atingir. A iodoacetamida é um reagente alquilante sulfidrílico, que se liga covalentemente aos sulfuretos livres e previne nova formação das pontes dissulfídicas, bem como a eliminação do excesso de DTT.

Para este procedimento colocou-se, num tubo de equilibração, 5 ml por tira de tampão de equilibração (cada tubo leva no máximo três tiras). Em seguida adicionou-se 50 mg de DTT por tira ao tubo. As tiras foram, então colocadas no tubo tendo o cuidado de verificar que o gel estava para cima e em contacto com a solução. Este passo tem a duração de 20 min e decorre com uma ligeira agitação. A um novo tubo adicionou-se 125 mg de iodoacetamida (GE Healthcare) a 5 ml de tampão de equilibração para o qual foram transferidas as tiras. Mantêm-se nesta solução durante 20 min. durante os quais é aplicada uma ligeira agitação. No fim é retirada a solução e adiciona-se 5 ml de TGS 1x

para prevenir a desidratação das tiras. Podem ser mantidas em TGS apenas 10 min. até serem colocadas no gel de poliacrilamida.

2.2.7 Preparação dos géis de poliacrilamida bi-dimensional

O gel de poliacrilamida bi-dimensional é utilizado para separar as proteínas na sua segunda dimensão, ou seja de acordo com a sua massa molecular. Com esta finalidade iniciamos o processo pela preparação da cassette para os géis de poliacrilamida. Primeiro colocou-se a borracha (preta) no fundo da cassette. Foi colocado um plástico de separação, que facilita a retirada dos vidros após a polimerização, seguido pelo vidro duplo e outro plástico de separação e assim sucessivamente. No final a cassette é terminada com plásticos mais grossos. É importante a lubrificação do local onde se coloca a borracha, para o qual se utiliza o gelseal (GE Healthcare). A tampa é colocada e os parafusos ajustados com as respectivas garras. A solução do gel de poliacrilamida é preparada para um total de 6 géis (Tabela 3).

Tabela 3: Composição do gel a 12,5%

Gel de 12,5 %	
Reagente	Volume
30% acrilamida/bisacrilamida 29:1 (Bio-Rad)	188 ml
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	113 ml
H₂O destilada	140 ml
10% SDS	4,5 ml
TEMED concentrado	0,180 ml
10% APS	4,5 ml

A solução é colocada na cassette e após 2 min. são adicionados 1 a 2 ml de isopropanol (80%) nos vidros duplos para uma melhor horizontalidade do gel. A polimerização decorre por 1 hora. No final deste intervalo de tempo os vidros foram removidos da cassette e passaram-se bem por água para eliminar os resíduos de isopropanol e de acrilamida. Em seguida foram colocados no suporte da tina. As tiras são depois colocadas em contacto com o gel, no lado do cátodo ao qual se juntou um

filtro com 7,5 µl do marcador padrão de proteína (All-Blue, Bio-Rad) e a tira é selada com 2 ml de uma solução de agarose (0,5%, p/v).

Metade do volume da tina é preenchido com tampão TGS 1x e, em seguida o suporte com os géis é colocado. O sistema é fechado com uma tampa reservatório no local correspondente à zona das tiras e ao qual se adiciona TGS 2x. A corrida decorreu a 80 V, 10 mA/gel, 1 W/gel durante 1 hora. De seguida mudou-se para 500 V, 40 mA/gel, 13 W/gel durante 6 horas. Os géis foram corados com azul de Coomassie R-250 ou PlusOne Silver Staining kit (no caso das amostras do suco intestinal).

2.2.8 Coloração dos géis com azul de Coomassie R-250

O corante Coomassie R-250 liga-se as proteínas através de interacções iónicas entre os grupos ácidos sulfónicos do corante e grupos positivos de amina das proteínas, como também através das forças de Van der Waals. A coloração com o corante Coomassie R-250 consegue detectar quantidades de proteínas tão baixas como 0,1 µg. No processo de coloração os géis de poliacrilamida ficam submersos na solução corante (45% (v/v) metanol, 9,1% (v/v) ácido acético, 0.025% Coomassie Brilliant Blue R (Sigma)) durante 24 horas à temperatura ambiente, com agitação lenta. O corante que não se ligou às proteínas é eliminado no passo de descoloração (7.5% (v/v) ácido acético glacial, 5% (v/v) metanol) o qual tem a duração de 24 horas. Após este passo os géis são transferidos para água destilada e são depois digitalizados.

2.2.9 Coloração dos géis com nitrato de prata

Usou-se o método com nitrato de prata (PlusOne Silver Staining Kit, GE Healthcare) para as amostras submetidas ao suco intestinal uma vez que o teor de proteína obtido nestas amostras foi inferior ao obtido nas amostras do suco gástrico e este método tem uma sensibilidade de 100 vezes superior ao de Coomassie R-250. O procedimento foi realizado de acordo com as instruções do fornecedor e que a seguir se indicam. Todos os passos decorrem com agitação suave. Os géis foram colocados numa solução de fixação duas vezes por 60 minutos. De seguida foi aplicada uma solução de sensibilização durante 120 minutos. Os géis foram lavados cinco vezes por 8 minutos com água destilada. A solução de nitrato de prata foi adicionada e deixou-se actuar

durante 60 minutos. A lavagem dos géis decorreu por quatro vezes por 1 minuto. Seguidamente juntou-se a solução de desenvolvimento que actuou entre 2 a 5 minutos e assim que os pontos proteicos atingirem a intensidade desejada a solução foi eliminada e uma solução de paragem da reacção foi adicionada permanecendo em actuação por 45 minutos. Por fim, os géis foram lavados por duas vezes com um tempo de actuação de 30 min e em seguida digitalizados.

2.2.10 Digitalização e análise dos géis

Os géis foram digitalizados no digitalizador Image Scanner II e, posteriormente foram analisados através do programa ImageMaster 2D Platinum Software 6.0 (GE Healthcare). Neste procedimento realizou-se em primeiro lugar a criação de uma nova área de trabalho e respectivo projecto associado. O referido programa permite uma detecção e marcação automática dos pontos proteicos (através das funções editar, spots, detectar). No entanto, esta detecção e marcação inclui, igualmente as bandas do marcador de proteínas e eventuais bolhas de ar que têm que ser eliminadas manualmente (através das funções editar, spots, eliminar). Cada ponto proteico seleccionado foi identificado em cada uma das réplicas. Após este procedimento é realizado o emparelhamento de concordância entre as réplicas dos géis e o gel seleccionado como padrão para cada variável (neste caso os géis correspondentes a pH 5,5 e 3,5% NaCl e pH 7 sem NaCl, através das funções “matches”, “match gels”). Os valores de % de volume de cada ponto proteico foram normalizados e em seguida procedeu-se à análise estatística obtendo-se, em primeiro lugar a análise para cada ponto dentro da respectiva classe (intra-class) e, em seguida a análise entre as duas variáveis em estudo (inter-class). As diferenças foram encontradas através da aplicação do teste de t-student para 95% e 99% de grau de confiança.

2.2.11 Identificação das proteínas

Os métodos mais utilizados para a identificação de proteínas são a sequenciação de Edman, o Western blot, a cromatografia líquida, a espectrometria de massa, o MALDI-TOF, este último é um sistema que consiste num ionizador (matrix assisted laser desorption/ionization) e num analisador (Time-of-flight).

As medições por espectrometria de massa são feitas na fase gasosa em analitos ionizados. É uma técnica que estuda as massas de átomos, moléculas ou fragmentos de moléculas (Harris, 2005). Um espectrómetro de massa consiste numa fonte iónica, um analisador de massa que mede a razão massa-carga (m/z) dos analitos ionizados, e um detector que regista o número de iões em cada valor de m/z . Existem duas técnicas para ionizar e tornar as proteínas voláteis para análise em espectrometria de massa, nomeadamente: ionização de electrospray (ESI, ionização à custa de um campo eléctrico elevado) e ionização/ dessorção da matriz assistida pelo laser (MALDI) (Aebersold e Mann, 2003).

Na técnica de MALDI a macromolécula está numa matriz cristalina de uma molécula orgânica com baixo peso molecular e é irradiada com pulsos intensos curtos (ns), a partir de um laser, num comprimento de onda absorvida pelo material na matriz mas não pela macromolécula. A energia absorvida pela matriz solta as macromoléculas intactas daquela superfície para a fase gasosa (Voet e Voet, 2004).

A técnica de MALDI-MS é normalmente usada para analisar misturas de péptidos relativamente simples, onde sistemas integrados ESI-MS com cromatografia líquida (LC-MS) são usados para analisar misturas mais complexas (Aebersold e Mann, 2003). Polipéptidos curtos (<25 resíduos) podem ser sequenciados directamente através do uso do espectrómetro de massa em tandem (MS/MS; dois espectrómetros de massa unidos em série) (Voet e Voet, 2004). Consegue resolver péptidos numa mistura, isola uma espécie de cada vez e dissocia-o em fragmentos contendo extremidades amino ou carboxilo. Tecnicamente é mais complexo e tem uma pior escala do que o MALDI (Pandey e Mann, 2000).

Existem quatro tipos de analisadores nomeadamente: tempo de voo (TOF), quadruplo, captura de iões, e transformada de Fourier (FT-MS).

A técnica de MALDI usualmente está associada ao TOF, que mede as massas de péptidos intactos, a ESI está associada à captura de iões e aos instrumentos quádruplos, que são usados para fornecer espectros de fragmentos iónicos. Como resultado da sua simplicidade, exactidão na massa, alta resolução e sensibilidade, a técnica MALDI-TOF é usada maioritariamente para identificar proteínas (Aebersold e Mann, 2003).

Os pontos proteicos de interesse foram excisados manualmente e enviados para o laboratório “Protein and Nucleic Acid Chemistry Laboratory” da Universidade de Leicester, Reino Unido para serem analisados por MALDI-TOF ou LC-MS/MS e identificados pelo programa MASCOT.

2.2.12 Virulência no modelo de *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: *Pyralidae*)

O efeito da adaptação em meio de simulação de queijo das células de *L. monocytogenes* na virulência foi avaliado utilizando o modelo de *Galleria mellonella*, vulgarmente conhecida como larva da cera. O procedimento seleccionado foi o descrito por Joyce e Gahan (2010) e Mukherjee *et al.* (2010). As larvas utilizadas no presente estudo pesavam entre 250 e 350 mg e foram oferecidas pelo Prof. Doutor Luís Neto do Centro de Estudos de Ciências e Tecnologia Agrárias da Universidade do Algarve. As larvas foram mantidas à temperatura ambiente, no escuro até à sua utilização. Como referência foi utilizada a estirpe *L. monocytogenes* Scott A. As bactérias foram recuperadas da conservação a -80°C em TSA durante 24 h a 30°C. O pré-inóculo foi preparado pela transferência de uma ansada da cultura em TSA para 30 ml de TSB com uma incubação a 30°C com agitação (120 rpm) durante a noite. Centrifugou-se 15 ml da cultura a 3500 rpm durante 10 min. a 4°C. As células foram ressuspensas em 50 ml de meio de simulação de queijo a pH 5,5 e 3,5% NaCl e como controlo a pH 7,0 sem NaCl. Mantiveram-se neste meio durante 2 horas a 20°C com agitação suave (60 rpm). Ao fim deste período recolheu-se 1 ml da cultura e sujeitou-se a uma centrifugação a 2790 xg durante 5 min. a 4°C. As células foram, em seguida ressuspensas em 1 ml de PBS estéril. Foram infectadas 10 larvas com 10 µl da suspensão inicial na segunda pro-pata direita do segundo conjunto de pro-patas utilizando uma microseringa de 50 µl (Sigma). Antes da infecção das larvas a superfície de cada larva foi desinfectada com álcool a 70%. Após a injeção as larvas foram colocadas em placas de Petri estéreis e incubadas a 37°C com uma monitorização a cada 24h durante 5 dias. As larvas foram consideradas mortas quando não respondiam ao toque ou quando se transformaram em pupa. Para a determinação da viabilidade foram preparadas diluições decimais as quais foram inoculadas em placas com meio Palcam agar (Oxoid) pelo método de Miles e Misra (1938).

2.2.13 Determinação do número de bactérias em *Galleria mellonella*

Para a contagem do número de células de *L. monocytogenes* durante o processo de infecção das larvas procedeu-se da mesma maneira do que o método descrito no

ponto 2.2.12 e a viabilidade bacteriana foi determinada após 2, 4, 6, 8 e 24 horas. Para isso um conjunto de 5 larvas infectadas de cada condição e intervalo de tempo foram anestesiadas, individualmente em álcool a 70% durante 1 minuto com a ajuda de uma vareta de vidro estéril, foram sacrificadas em 5 ml de PBS estéril e prepararam-se diluições decimais em água peptonada estéril. As diluições foram semeadas em meio Palcam agar (Biokar diagnosis, Beauvais, França) e a incubação decorreu a 37°C durante 24 a 48 horas.

2.2.14 PCR em tempo real

Como já foi referido a virulência de *L. monocytogenes* está associada à expressão de alguns genes, entre eles os que codificam a listeriolisina (*hly*), actina A (*actA*) e internalina (*inlA*) e, em particular no modelo de *Galleria mellonella* é fundamental a participação do gene *hly* (Joyce e Gahan, 2010) pelo que a expressão destes genes no final do período de adaptação foi avaliada. Para isto recorreu-se a técnica de transcrição reversa seguida de PCR em tempo real. Esta técnica é de fácil execução, rápida, bastante sensível e permite analisar a expressão de mRNA. Permite a quantificação de pequenas alterações na expressão de genes, bem como de transcritos raros. A quantificação relativa baseia-se na expressão do gene alvo *versus* gene de referência, presente em todos os tipos de células.

As reacções são caracterizadas pelo ciclo de PCR em que a amplificação alvo é detectada, o ponto que detecta o ciclo no qual a reacção atinge o limiar da fase exponencial é designado por *Cycle Threshold* (CT), ou seja, o valor do tempo em que a intensidade de fluorescência é superior à fluorescência base. Este ponto permite a quantificação exacta e reprodutível com base na fluorescência obtida. Consequentemente, quanto maior for a expressão de um gene, menor será o tempo necessário para que haja aumento do sinal de fluorescência, originando um Ct mais baixo.

A emissão de sinal por parte do composto fluorescente (o utilizado foi o SYBR®Green, Bio-Rad), dá origem a um sinal que aumenta em proporcionalidade directa à quantidade de produto de PCR. Como tal, os valores da fluorescência são gravados durante cada ciclo e representam a quantidade de produto amplificado.

Assim, para verificação da expressão dos genes através da técnica de transcrição reversa seguida de PCR em tempo real começou-se por extrair o RNA das estirpes C882

e ScottA nas condições em estudo. Para isso cada estirpe foi cultivada, em triplicado, em 50 ml de meio de simulação de queijo a pH 5,5 e 3,5% NaCl e a pH 7,0 sem NaCl durante 2 horas a 20°C com 60 rpm. Centrifugou-se 2 ml do meio a 2790 xg durante 5 min. a 4°C e o pellet foi lavado com soluto de Ringer estéril. Procedeu-se a extracção de RNA utilizando o kit *SV RNA isolation* (Promega) segundo as instruções do fornecedor. Quantificou-se o RNA no espectrofotómetro Nanodrop 2000c (Thermo Scientific) e procedeu-se à síntese de cDNA para cada amostra através do kit *iScript™ cDNA synthesis* (Bio-Rad). Desta forma para uma reacção de 20 µl, juntou-se 4 µl de *iScript reaction mix* (5x), 1 µl de *iScript reverse transcriptase*, 1 µg de RNA extraído e perfez-se o volume com água livre de nucleases. Em seguida a reacção ocorreu pela incubação sequencial a 25°C por 5 min., 30 min. a 42°C e 5 min. a 85°C. As amostras foram guardadas a -20°C até ao seu processamento.

Seguidamente, prepararam-se as reacções para o PCR em tempo real adicionando, para uma reacção de 25 µl, 12,5 µl de *IQ SYBR Green supermix* (Bio-Rad), 0,5 µl de cada um dos *primers* (Tabela 4), 2 µl do cDNA sintetizado e o volume é ajustado com água livre de nucleases. O gene *rpsP* (lmo1797) foi utilizado como endógeno. A análise da eficiência dos *primers* foi calculada de acordo com o descrito por Rasmussen, 2001 (anexo 2).

O PCR em tempo real foi executado no aparelho *icycler iQ multicolor real time PCR detection system* (Bio-Rad, Hercule, USA). As condições de amplificação estão indicadas na Tabela 5. A expressão relativa de cada gene foi determinada de acordo com o descrito por Pfaffl, 2001.

Tabela 4: Sequência dos *primers* utilizados no PCR em tempo real.

Gene	Sequência (5'-3')	Tm °C	Referência
<i>rpsP</i> F	5' - GTT TAA AAC GTA TTG GTT CTA – 3'	50,1	Este estudo
<i>rpsP</i> R	5' - TTA TAA GTA CCA ATA GTT TCG – 3'	50,1	
<i>hly</i> F	5' - CTC AGC ATT GAT TTG CCA GGT – 3'	57,9	Este estudo
<i>hly</i> R	5' - TAC ATT TGG ATA AGC TTG AGC – 3'	54,0	
<i>actA</i> F	5' - TGG CGA AAG AGT CAG TTG CGG – 3'	61,8	Este estudo
<i>actA</i> R	5' - ATC ACG TAC CCA TTT CCC CGC – 3'	61,8	
<i>inlA</i> F	5' - GGC ACA TTG GCG AGT TTA ACA – 3'	57,9	Este estudo
<i>inlA</i> R	5' - GTT ACT TAT TTG GTT AGC TCC – 3'	54,0	

Tabela 5: Condições utilizadas para a análise da expressão dos genes de virulência por PCR em tempo real.

Temperatura (°C)	Tempo	Nº de ciclos	Ciclo
94	04:00	1	1
94	00:45	45	
57	00:30	45	2
72	00:30	45	
65	00:10	130*	3

* Captura de fluorescência para obtenção da curva de *melting*.

Capítulo III – Resultados e Discussão

3.1 Viabilidade de *Listeria monocytogenes* C882 no modelo de simulação do tracto gastrointestinal

A sobrevivência da estirpe *L. monocytogenes* C882 no modelo de simulação do tracto gastrointestinal foi avaliada e os resultados são apresentados na Figura 7. É possível observar que as células adaptadas e não adaptadas sobrevivem de modo semelhante ($P > 0,05$) à exposição dos sucos gastrointestinais. Não houve, portanto um benefício da exposição prévia das células de *L. monocytogenes* C882 a condições de baixo valor de pH e sal (pH 5,5 e 3,5% (p/v) NaCl). Estes resultados evidenciam a capacidade da estirpe *L. monocytogenes* C882 de sobreviver ao baixo valor de pH (2,5) dos sucos gástricos, bem como a passagem pelo suco intestinal.

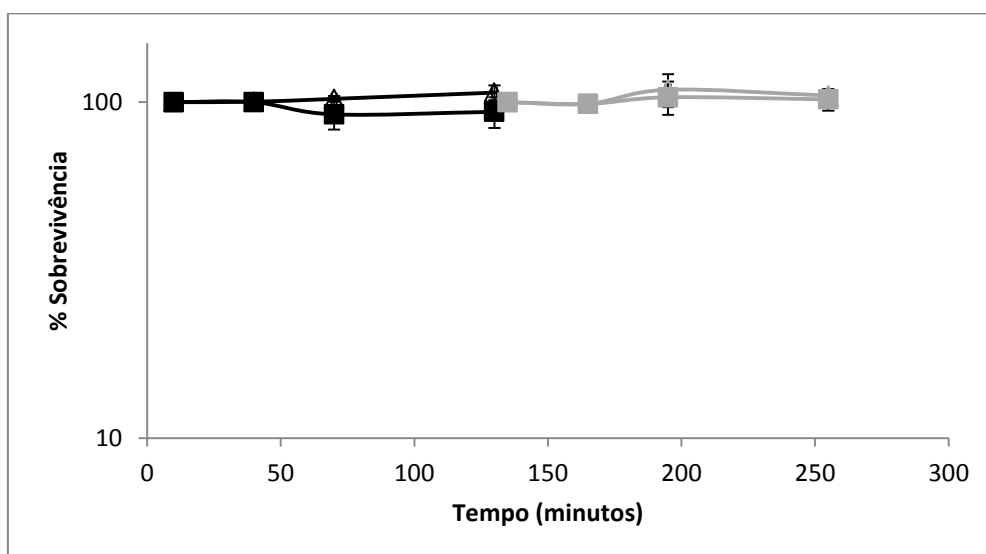


Fig. 7 – Sobrevivência de *Listeria monocytogenes* C882 no modelo de simulação do tracto gastrointestinal. As células bacterianas foram adaptadas (-■- e -■-) no meio SQ (pH 5,5 com 3,5% (p/v) NaCl) durante 2 horas a 20°C, 60 rpm. As células não adaptadas (-Δ- e -Δ-) permaneceram no meio SQ (pH 7,0 sem adição de NaCl). Após as 2h de adaptação no meio SQ as células foram transferidas para uma solução de simulação da saliva durante 5 min, em seguida foram colocadas na presença do suco gástrico (símbolos a preto) por 2h (Tempo 0). Ao fim deste intervalo de tempo (T120) foram sujeitas ao tratamento com o suco intestinal durante 2h (símbolos a cinza). Os resultados são a média de quatro réplicas. As barras de erro representam o valor do desvio padrão.

Esta capacidade de sobrevivência de *L. monocytogenes* em sucos gástricos é semelhante à já descrita para algumas estirpes de *L. monocytogenes* (Barmpalia-Davis *et al*, 2008), mas muito superior à descrita para estirpes de *L. monocytogenes* de origem portuguesa provenientes de alimentos e de casos clínicos quando testadas em sistemas de simulação do tracto gastrointestinal com valores de pH semelhantes e composição próximas ao utilizado no presente estudo (Ramalheira *et al*, 2010). O perfil de resposta de tolerância ao ácido e ao sal descrito anteriormente para a estirpe C882 está obviamente relacionado com as condições de resposta ao stress letal (pH 3,5 ajustado com ácido láctico) utilizadas anteriormente (Faleiro *et al*, 2003) as quais são essencialmente diferentes das utilizadas no presente estudo (pH 2,5 ajustado com ácido clorídrico).

Coloca-se, então a questão se as células adaptadas utilizaram os mesmos mecanismos que as células não adaptadas para sobreviverem à exposição aos sucos gástricos e intestinais? A resposta a esta questão foi procurada através da análise proteómica.

3.2 Perfil proteico

3.2.1 Perfil proteico em condições de adaptação

No proteoma intracelular obtido após a passagem de *L. monocytogenes* C882 pelo meio de simulação de queijo (SQ) durante 2 horas foram detectados 197 pontos proteicos nas células não adaptadas (pH 7,0 e sem adição de sal) e 194 pontos proteicos nas células adaptadas (pH 5,5 e 3,5% (p/v) NaCl), dos quais 92 foram mais abundantes em condições de adaptação ($P < 0,05$) (Figura 8). Foram identificados nove pontos proteicos com maior abundância ($P < 0,05$) e quatro pontos proteicos com menor abundância ($P < 0,05$) em condições de adaptação em comparação com a condição controlo. Estes pontos proteicos são indicados na Tabela 6.

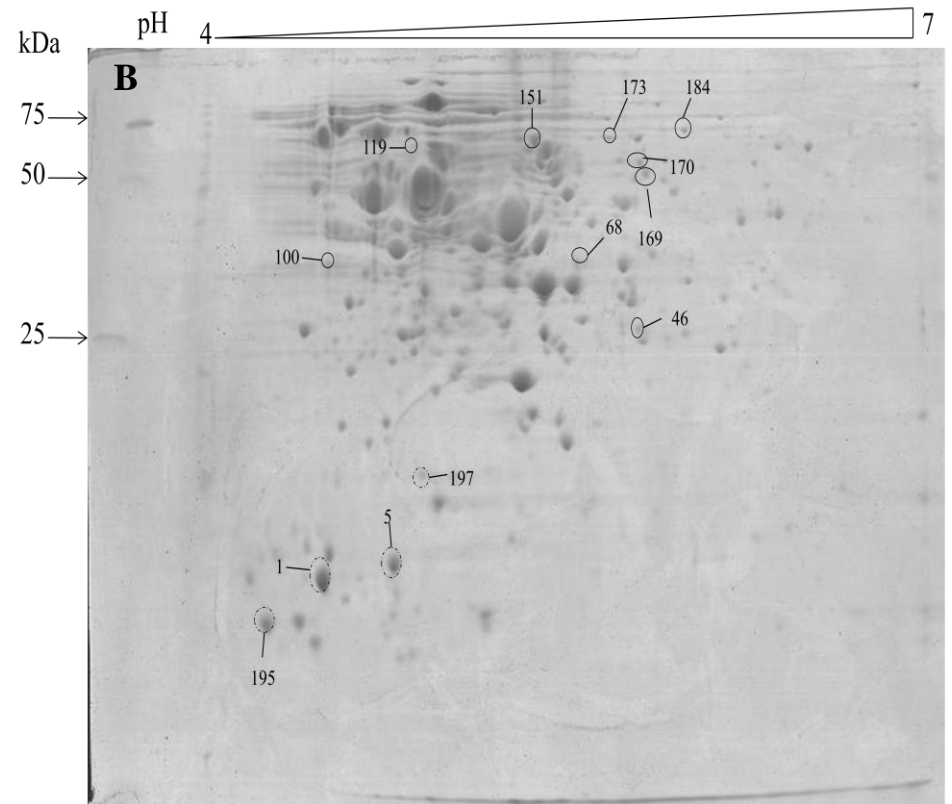
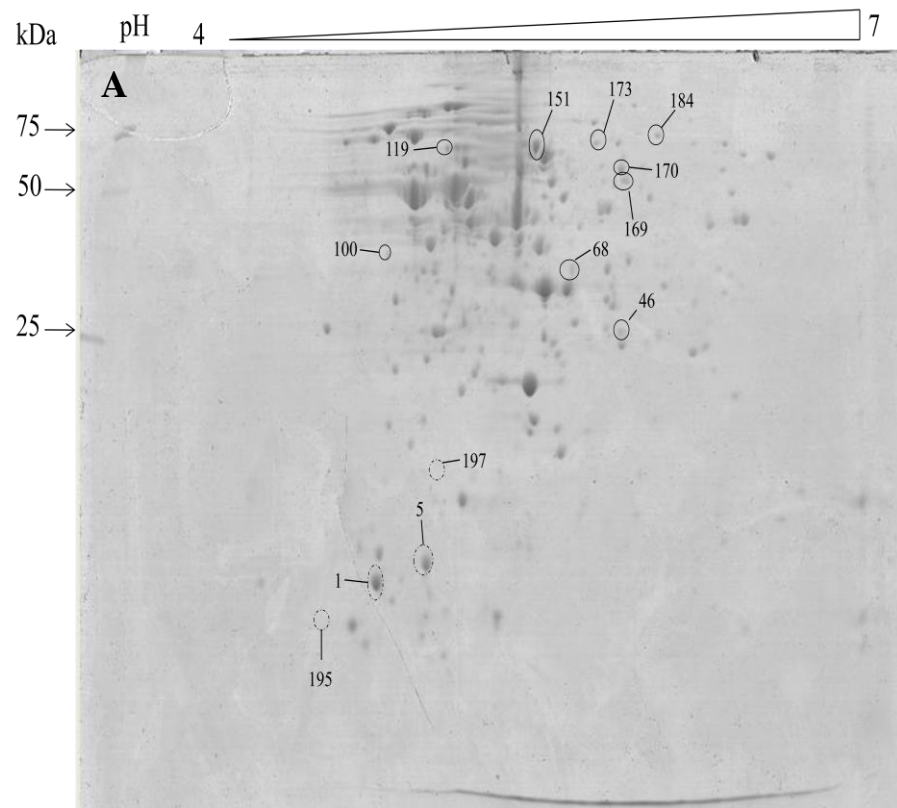


Fig. 8 – Perfil da distribuição das proteínas do extracto celular das células de *L. monocytogenes* C882 adaptadas no meio SQ (pH 5,5 e 3,5% NaCl) (A) e não adaptadas (pH 7,0 sem adição de sal) (B). Os pontos proteicos mais abundantes nas células adaptadas estão delimitados por linhas inteiras e os menos abundantes por linhas a tracejado. A identificação destes pontos proteicos está indicada na tabela 6.

Tabela 6. Identificação das proteínas do extracto celular das células adaptadas e não adaptadas em meio de simulação de queijo.

Categoria funcional	Ponto proteico	Gene/Locus	Nº de Uniprot	Nome da proteína	Teórico		Calculado		Score	Cobertura da sequência (%)
					MM* (kDa)	pI**	MM (kDa)	pI		
Proteínas mais abundantes nas células adaptadas (pH 5,5 e 3,5% (p/v) NaCl)										
Metabolismo dos hidratos de carbono	46	gpmA/LMOF2365_2238	GPMA_LISMF	Mutase fosfoglicerato 2,3-bisfosfoglicerato-dependente	26,4	5,47	24,5	5,55	194	49
	68	manL/LMOh7858_0120	Q4EK17	Sistema PTS, manose específico	35,0	5,33	32,7	5,35	94	28
	151	gpmI/LMOF2365_2529	GPMI_LISMF	Mutase fosfoglicerato 2,3-bisfosfoglicerato-independente	56,1	5,18	62,9	5,3	253	47
Resposta ao stress	100	hslO/LMOF2365_0233	Q724J1	<i>Chaperone</i> 33 kDa	32,1	4,56	39,9	4,8	102	31
Síntese dos ácidos nucleicos	169	purB/LMOh7858_1898	Q4EFZ5	Adenilosuccinato liase	49,2	5,52	53,9	5,6	126	32
	173	purH/LMOF2365_1790	PUR9_LISMF	Proteína bifuncional na biossíntese das purinas, PurH	54,9	5,39	59,4	5,4	174	36
	184	LMJG_02766	C8K6Y8	Citidina trifosfato (CTP) síntase	59,5	5,57	63,2	5,7	129	19
Reacções de oxidação-redução	119	LMOh7858_2558	Q4EHW9	Proteína não caracterizada putativa	52,7	4,87	62,9	5,0	125	20
	170	sufD/LMOF2365_2385	Q71X14	Proteína SufD do grupo FeS	47,6	5,61	56,1	5,6	142	30
Proteínas menos abundantes nas células adaptadas (pH 5,5 e 3,5% (p/v) NaCl)										
Factor de virulência	1	actA/lmo0204	C7A0B1	Actina (fragmento)	66,4	5,05	7,9	4,6	61	12
Metabolismo dos hidratos de carbono	5	ptsH/LMOF6854_1051	Q4ER91	Fosfotransportador Hpr	9,4	4,81	8,3	4,9	94	56
Resposta ao stress	195	LMFG_01795	D3KND4	Proteína de choque térmico ao frio csplA	7,3	4,45	6,3	4,35	76	74
Função desconhecida	197	LMOh7858_1343	Q4EE92	Proteína não caracterizada putativa	18,3	4,88	13,5	4,9	104	50

* MM - Massa molecular; ** pI - Ponto isoeléctrico

Apenas foi identificada uma proteína associada a respostas de tolerância ao stress, a *chaperone* de 33 kDa ou HSP33 (*Heat shock protein 33*), que é induzida em condições de stress oxidativo, a sua actividade é activada pelo ambiente de oxidação-redução através do grupo de cisteínas que são muito reactivas e respondem rapidamente às mudanças ambientais (Jakob *et al*, 1999). A HSP33, tal como outras *heat shock proteins* garante o enrolamento correcto e evita a agregação de outras proteínas. Até ao momento ainda não foi identificada a participação desta hsp em respostas ao stress em *L. monocytogenes*, incluindo choque térmico, osmótico, ácido e oxidativo (Soni *et al*, 2011 e referências aí indicadas). Durante a exposição ao stress ácido pode surgir um stress oxidativo, ou seja o stress oxidativo neste caso é um stress secundário (Mols e Abee, 2011). Três proteínas importantes para a síntese dos ácidos nucleicos das quais a adenilosuccinato liase e a proteína bifuncional estão envolvidas na síntese das purinas e a CTP sintase na síntese das pirimidinas. Uma maior abundância destas proteínas em condições de adaptação revela uma maior necessidade de nucleótidos pela estirpe C882 quando enfrenta condições sub-letais. Este tipo de resposta tem sido descrito noutras bactérias, como *E. coli* e *Salmonella enterica* em ambientes de escassos recursos nutricionais, como o sangue humano (Samant *et al*, 2008). As proteínas do grupo ferro-enxofre (Fe-S) são extremamente importantes para a célula bacteriana, desempenham várias funções, nomeadamente o transporte de electrões, ligação ao substrato e activação, conservação de ferro, regulação da expressão de genes e dadores de enxofre (Johnson *et al*, 2005). Nas condições de adaptação estudadas observou-se uma maior abundância da proteína SufD pertencente ao grupo das proteínas Fe-S. A sua maior abundância na montagem de uma resposta de tolerância pode estar ligada a mais de uma função deste grupo de proteínas. As duas proteínas, a mutase fosfoglicerato 2,3-bisfosfoglicerato-dependente e a mutase fosfoglicerato 2,3-bisfosfoglicerato-independente participam na segunda fase do processo de glicólise, onde é catalisada a oxidação do composto fosfogliceraldeído a piruvato, mas estas duas enzimas participam mais propriamente na conversão reversível de 3-fosfoglicerato a 2-fosfoglicerato e outro dos papéis do processo de glicólise é, não só a oxidação do hidrato de carbono a piruvato e a fosforilação de ADP, mas também fornece vários metabolitos precursores para uma larga variedade de vias metabólicas, neste caso em particular 3-fosfoglicerato é um precursor dos aminoácidos glicina, serina e cisteína que são importantes para a actividade de muitas enzimas (White, 2000). Outro aspecto que pode estar relacionado com a maior abundância destas proteínas é o facto de serem muito susceptíveis a baixos

valores de pH (Chander *et al*, 1999) e conseqüentemente a célula necessita de assegurar a presença destas enzimas em quantidades que garantem a sua sobrevivência em condições letais.

No grupo das proteínas menos abundantes nas células adaptadas destaca-se o factor de virulência ActA (ponto proteico 1) e a proteína de choque térmico ao frio, csplA (ponto proteico 195). A actividade da actina é superior, a valores de pH neutro e quando ocorre uma acidificação a sua concentração crítica diminui (Wang *et al*, 1989). As proteínas de choque térmico ao frio, Csp, têm um papel facilitador no processo de tradução ao actuarem como *chaperones* de RNA ligando-se ao RNA de cadeia simples até o ribossoma iniciar a sua tradução assegurando deste modo respostas eficazes a condições de stress a temperaturas baixas, mas igualmente em condições de stress osmótico e oxidativo (Chan e Wiedmann, 2008; Schmid *et al*, 2009; Cacace *et al*, 2010; Loepfe *et al*, 2010) e contribuem para a invasão das células do hospedeiro (Loepfe *et al*, 2010). A menor abundância destas proteínas nas células adaptadas poderá ter um impacto negativo no seu potencial de virulência.

3.2.2 Perfil proteico em condições de stress gástrico

O perfil proteico das células adaptadas e não adaptadas de *L. monocytogenes* em condições de stress gástrico (pH 2,5 ajustado com HCl) foi obtido após exposição a 5 min. em saliva e posterior exposição durante 2 h aos sucos gástricos.

No proteoma intracelular obtido após o tratamento das células bacterianas com o suco gástrico foram detectados 205 pontos proteicos, quer nas células adaptadas quer nas não adaptadas dos quais 74 foram mais abundantes nas células adaptadas e 104 foram menos abundantes quando comparados com as células não adaptadas (Figura 9). Foram identificados 8 pontos proteicos com maior abundância ($P < 0,05$) nas células com adaptação prévia e quatro pontos proteicos com menor abundância ($P < 0,05$). Os pontos proteicos identificados são apresentados na Tabela 7.

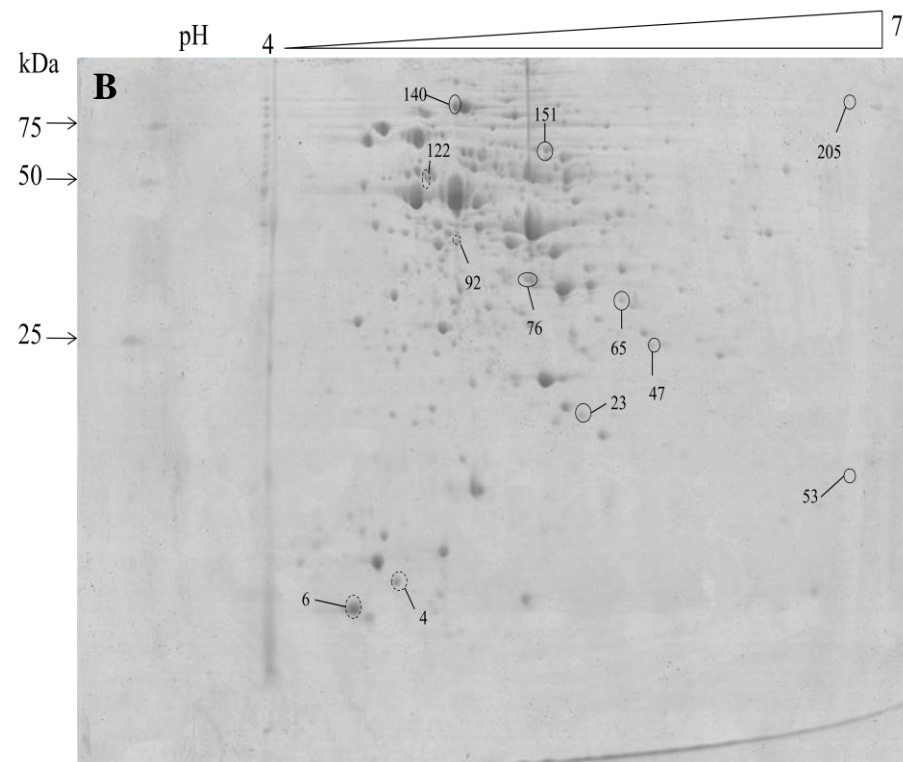
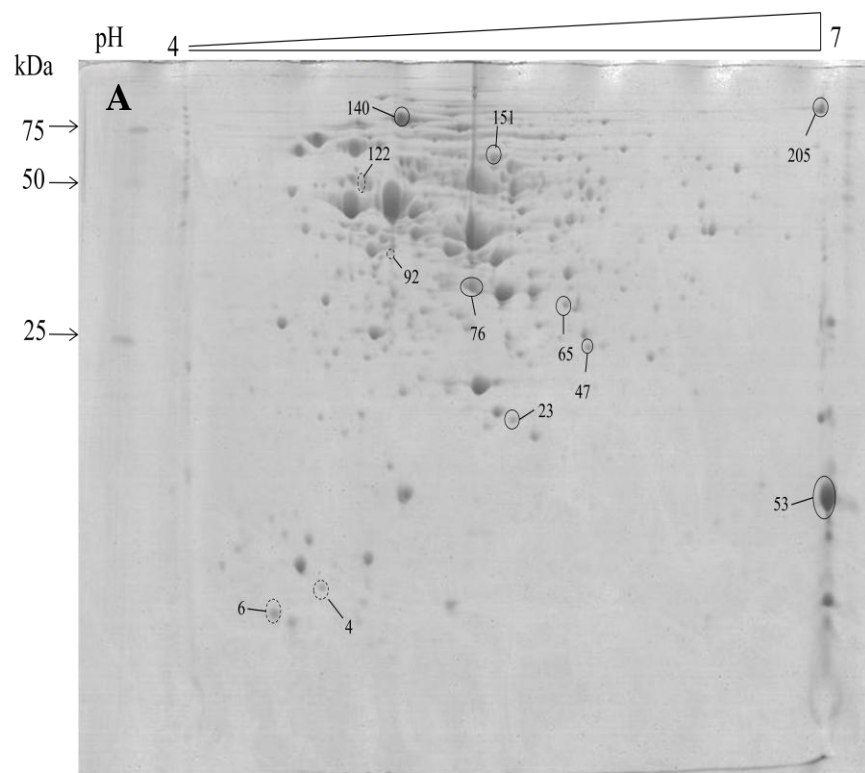


Fig 9. – Perfil da distribuição das proteínas do extracto celular das células de *L. monocytogenes* C882 em condições de stress gástrico após adaptação prévia em meio (SQ) (pH 5,5 e 3,5% NaCl) (A) e sem adaptação prévia (pH 7,0 sem adição de sal) (B). Os pontos proteicos mais abundantes nas células adaptadas estão delimitados por linhas inteiras e os menos abundantes por linhas a tracejado. A identificação destes pontos proteicos está indicada na Tabela 7.

Tabela 7: Identificação das proteínas do extracto celular das células de *L. monocytogenes* em condições de stress gástrico.

Categoria funcional	Ponto proteico	Gene/Locus	Nº de Uniprot	Nome da proteína	Teórico		Calculado		Score	Cobertura da sequência (%)
					MM* (kDa)	pI**	MM (kDa)	pI		
Proteínas mais abundantes nas células adaptadas (pH 5,5 e 3,5% (p/v) NaCl)										
Hidrólise	23	LMIG_00907	C8JQX9	Protease intracelular	19,1	5,22	16,3	5,3	143	57
Síntese de aminoácidos	47	LMOF2365_2365	Q71X34	Proteína não caracterizada putativa	22,8	5,51	23,5	5,5	122	55
Resposta ao stress	53	Lm4b_02646	C1KZM7	Proteína conservada pertencente a família de proteínas universais	17,3	8,93	11,7	6,4	454	46
Síntese de vitaminas	76	pdxS/Lm4b_02122	C1KX53	Biossíntese piridoxal liase pdxS	31,8	5,24	31,9	5,2	165	55
Síntese proteica	140	map/LMOF2365_1733	C8KDF3	Factor de alongação G	77,0	4,85	74,5	4,9	330	48
	65	fusA/LMMG_02489	Q71YV8	Metionina aminopeptidase	28,0	5,41	29,8	5,5	118	54
Metabolismo dos hidratos de carbono	151	gpmI/LMOF2365_2429	Q71WX0	Mutase fosfoglicerato 2,3-bisfosfoglicerato-independente	56,1	5,18	61,3	5,2	253	47
	205	LMIG_01097	C8JYE9	Bifuncional acetaldeído – CoA / álcool desidrogenase	95,1	6,48	83,1	6,4	320	34
Proteínas menos abundantes nas células adaptadas (pH 5,5 e 3,5% (p/v) NaCl)										
Resposta ao stress	4	groES/LMOh7858_2198	Q4EEZ7	<i>Chaperone</i> 10 kDa	10,1	4,6	7,3	4,6	65	38
	6	cspLA/lmo1364	P0A355	Proteína de choque térmico ao frio CspLA	7,3	4,45	6,4	4,45	1027	100
Metabolismo dos hidratos de carbono	92	Lm4b_02132	C1KX63	Manose – 6 fosfato isomerase putativa	35,4	4,94	38,9	4,9	1700	86
	122	glmM/LMIG_00768	C8JRB8	Fosfoglucosamina mutase	48,6	4,7	54	4,8	156	28

* MM – Massa molecular,

** pI – Ponto isoeléctrico

As oito proteínas identificadas que apresentaram uma maior abundância nas células adaptadas estão englobadas em seis grupos funcionais, hidrólise, síntese de aminoácidos, resposta a condições de stress, síntese de vitaminas, síntese proteica e metabolismo dos hidratos de carbono. O grupo de síntese proteica e metabolismo dos hidratos de carbono incluíram, cada um, duas proteínas, o que pode significar uma maior importância destes elementos na resposta ao stress gástrico. A proteína identificada no grupo de resposta a condições de stress foi uma proteína da família das proteínas de stress universais (Usp). Uma maior expressão de proteínas do grupo Usp a condições de adaptação e resistência ao ácido foi descrita na estirpe *L. monocytogenes* EGD, nomeadamente foi implicada a proteína Lmo1580 (Wemekamp-Kamphuis *et al*, 2004). A metionina aminopeptidase participa no processo de eliminação do resíduo N-terminal da metionina no processo de síntese proteica. Este processo de eliminação do resíduo N-terminal da metionina ocorre na maioria das proteínas (cerca de 80%) e é um processo essencial para a viabilidade celular (Giglione *et al*, 2003; Chang *et al*, 1989; Miller *et al*, 1989). A sua essencialidade pode ser justificada pelo facto de que a maioria das proteínas para desempenharem a sua actividade correctamente e terem uma localização apropriada necessitam de ter a região N-terminal de metionina eliminada (Lowther e Matthews, 2000). Algumas bactérias como *Bacillus subtilis* possuem no seu genoma dois genes que codificam duas metionina aminopeptidase putativas, o gene *map* que é essencial e o gene *yflG* que não é essencial (You *et al*, 2005). A pesquisa no genoma de *L. monocytogenes* EGD revelou a existência de dois genes que codificam duas metionina aminopeptidase putativas, *lmo1578* e *lmo1354*. O seu papel fisiológico ainda não foi esclarecido. Uma maior expressão dos factores de alongação como o EF-Tu e EF-G tem sido assinalada em respostas a diferentes condições de stress, como a valores de pH baixos e a baixas temperaturas na bactéria *E. coli* (Huang *et al*, 2007) e também foi assinalada em *L. monocytogenes* em resposta a baixas temperaturas (Cacace *et al*, 2010) e em condições de adaptação ao ácido (Melo *et al*, em processo de submissão). Os factores de alongação têm um papel de assistência no processo de tradução e para além deste parece que também podem desempenhar um papel semelhante aos *chaperones* (Caldas *et al*, 2000). É, pois presumível que a maior expressão do EF-G nas células adaptadas esteja associada à actividade *chaperone* auxiliando na protecção das células contra o stress gástrico. No metabolismo dos hidratos de carbono observou-se a maior abundância da proteína bifuncional acetaldeído-CoA/álcool desidrogenase e a mutase fosfoglicerato 2,3-bisfosfoglicerato-

independente. A proteína bifuncional acetaldeído-CoA/álcool desidrogenase é uma enzima chave na produção de etanol. Porque razão as células adaptadas evidenciam uma maior produção desta enzima ligada à produção de etanol necessita de ser esclarecida. A enzima mutase fosfoglicerato 2,3-bisfosfoglicerato-independente não tem apenas um papel no processo da adaptação ao ácido (conforme referido no ponto 3.2.1), mas também na resposta de resistência ao ácido. Foi evidente uma menor abundância de duas proteínas importantes na resposta ao stress nas células adaptadas, a *chaperone* 10 kDa e a *cspLA*. A *chaperone* 10 kDa também denominada groES ou Hsp10 pertence ao regulador de transcrição negativo HrcA que inclui, para além de groES, os *chaperones* groEL e DnaK e em *L. monocytogenes* apenas foi descrita a sua participação em respostas de tolerância a temperaturas elevadas (Hu *et al*, 2007). As duas proteínas *chaperones* groES e CspLA farão parte do sistema que permite às células não adaptadas de sobreviver eficazmente as condições impostas pelos sucos gástricos.

3.2.3. Perfil proteico em condições de stress osmótico pelos sucos intestinais

Recorde-se que neste ponto do modelo as células de *L. monocytogenes* foram previamente adaptadas em meio SQ (pH 5,5 e 3,5% (p/v) NaCl) e foram depois tratadas com saliva (5 min.) e em seguida com o suco gástrico (2h) e finalmente com o suco intestinal (2h). As células não adaptadas permaneceram no meio SQ (pH 7,0 sem adição de sal) por 2h seguindo-se o mesmo tratamento que as células adaptadas. No proteoma intracelular obtido após o tratamento das células bacterianas com o suco intestinal foram detectados 292 pontos proteicos, quer nas células adaptadas quer nas não adaptadas (Figura 10). Foram detectados 155 pontos proteicos mais abundantes nas células que sofreram uma adaptação prévia no meio de simulação de queijo em comparação com as células que não sofreram uma adaptação prévia. Foram identificados 16 pontos proteicos com maior abundância ($P < 0,05$) nas células com adaptação prévia e dez pontos proteicos com menor abundância ($P < 0,05$) em comparação com as células não adaptadas. Os pontos proteicos identificados são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8: Identificação das proteínas do extracto celular das células em stress osmótico pelos sucos intestinais.

Categoria funcional	Ponto proteico	Gene/locus	Nº de Uniprot	Nome da proteína	Teórico		Calculado		Score	Cobertura da sequência (%)
					MM* (kDa)	pI**	MM (kDa)	pI		
Proteínas mais abundantes nas células adaptadas (pH 5,5 e 3,5% (p/v) NaCl)										
Síntese proteica	1	rpIU/Lm5578_1687	D2P2H1	Proteína ribossomal 50S	11,21	9,57	14,09	6,05	182	56
	21	gltx/Lm4b_00257	C1KYH0	Glutamil-tRNA sintetase putativa	56,11	5,09	19,82	5,5	325	12
	71 ^a	tuf/Lm4b_02625	C1KZK6	Factor de elongação Tu	43,43	4,81	51,53	5,0	435	16
	251	fusA/Lm4b_02626	C1KZK7	Factor de elongação G	76,97	4,85	218,8	4,9	648	39
Metabolismo dos hidratos de carbono	12	fhs/Lm4b_01893	C1KWH6	Formato tetrahidrofolato ligase	60,37	5,34	36,63	6,1	291	10
	17	pgi/Lm4b_02337	C1KY08	Glicose-6-fosfato isomerase	49,86	5,27	28,52	5,45	295	26
	66 ^a	pykA/Lm4b_01581	C1KVL7	Piruvato cinase	62,69	5,39	41,05	5,2	362	26
	102	Ldh	A1E154	L-lactato desidrogenase	34,28	5,2	47,62	5,65	778	26
	139	pfkA/Lm4b_01582	C1KVL8	6-fosfofrutocinase	34,4	5,46	106,7	5,5	667	44
	156	pgk/Lm4b_02427	C1KY97	Fosfoglicerato cinase	42,11	5,02	77,93	5,8	589	45
Resposta ao stress	3	Lm4b_02334	C1KY05	Glutamato descarboxilase putativa	53,95	5,07	16,52	5,9	170	7
Regulação	13	Lm4b_02463	C1KYR1	Regulador negativo do regulão fosfato putativo	25,13	5,09	43,94	6	280	33
Percepção de quórum	227	Lm4b_02223	C1KXF1	Feromona ABC transportadora putativa	62,59	5,3	181,3	5,05	1378	61
Função desconhecida	4	Lm4b_01267	C1L2G5	Proteína não caracterizada putativa	18,25	4,88	16,9	6,05	249	53

^a - Dois pontos proteicos identificados

Cont. da Tabela 8

Categoria funcional	Ponto proteico	Gene/locus	Nº de Uniprot	Nome da proteína	Teórico		Calculado		Score	Cobertura da sequência (%)
					MM* (kDa)	pI**	MM (kDa)	pI		
Proteínas menos abundantes nas células adaptadas (pH 5,5 e 3,5% (p/v) NaCl)										
Resposta ao stress oxidativo	35	LMOh7858_1004	Q4EFI8	Resistência ao peróxido Dpr	18,04	4,86	26,58	4,9	146	84
	40	fri/Lm4b_00962	C1L1L4	Ferritina não-hémica	18,04	4,86	28,52	4,8	521	67
	73	sod/Lm4b_01449	C1L2Z5	Superóxido dismutase (SOD)	22,60	5,23	42,74	5,2	199	68
Resposta ao stress	76	clpP/Lm4b_02437	C1KYN5	Clp protease dependente de ATP	21,61	4,94	42,74	4,9	1376	35
	288	atpD-2/LmOh7858_2682	Q4EEV9	ATP sintase F1	51,58	4,73	77,71	4,8	142	30
Síntese das vitaminas	134	thiD/lmo0662	Q8Y971	Proteína ThiD	28,92	5,25	53,72	5,4	70	20
Síntese dos aminoácidos	154	cysK/Lm4b_00221	C1KYF6	Cisteína sintase	32,18	5,32	62,93	5,3	1778	80
Metabolismo do glicerol	254	LMOf2365_2674	Q71W77	Dihidroxiacetona cinase putativa, Dak1	35,01	4,79	94,3	4,7	74	25
	289	LMOh7858_2957	Q4EJS2	Dihidroxiacetona cinase	35,01	4,79	79,09	4,8	558	33
Reacções de oxidação-redução	290	LMOf2365_0671	Q722Q9	Oxidoreductase, aldo-ceto reductase	34,11	5,02	66,34	5	107	30

* MM – Massa molecular

** pI – Ponto isoeléctrico

As dezasseis proteínas mais abundantes nas células adaptadas, foram distribuídas por cinco categorias funcionais e as duas categorias que incluem o maior número de proteínas são a síntese proteica (5 proteínas) e o metabolismo dos hidratos de carbono (7 proteínas). No grupo de proteínas da categoria da síntese proteica encontram-se dois factores de alongação, EF-Tu e EF-G que como referimos no ponto 3.2.2. podem desempenhar funções de *chaperones*. No grupo de proteínas da categoria funcional do metabolismo dos hidratos de carbono encontramos a glucose-6-fosfato isomerase, a 6-fosfofrutocinase, a fosfoglicerato cinase, e a piruvato cinase, todas elas são enzimas envolvidas na glicólise. Tal como nas células sob stress ácido também nas células sob stress osmótico se observa um desvio do metabolismo para a fermentação, pois nesta condição regista-se uma maior abundância da enzima L-lactato desidrogenase que converte o piruvato em lactato. Uma maior abundância da proteína glutamato descarboxilase ou GAD foi observada, a sua associação com o stress osmótico até à data não foi descrito, apenas se conhece o seu envolvimento em respostas de stress ácido (Cotter *et al*, 2001). Foi detectada a maior abundância de uma proteína ligada à percepção de quórum, a feromona ABC transportadora putativa. As moléculas de sinal são do tipo lactonas homoserina acetiladas nas bactérias Gram negativas e péptidos nas bactérias Gram positivas (Camilli e Bassler, 2006) qualquer uma delas desempenham funções vitais na modelação das comunidades bacterianas, nomeadamente auxiliam a montagem de respostas a diferentes condições de stress, formação de biofilme e resistências aos mais diversos agentes antibacterianos (Camilli e Bassler, 2006).

As proteínas com menor abundância nas células adaptadas destacam-se três proteínas envolvidas no stress oxidativo, a superóxido dismutase (SOD) leva a cabo a eliminação dos intermediários reactivos de oxigénio (ROS) (Dallmier e Martin, 1990). A proteína Dpr, que confere resistência ao peróxido, também está envolvida na protecção contra as ROS e pertence a família das proteínas ligadas ao DNA de células sem nutrientes (Dps). A ferritina não-hémica pertence a família Dps e está envolvida na protecção contra o stress oxidativo (Bozzi *et al*, 1997; Tsou *et al*, 2008). Esta diferença entre as células adaptadas e não adaptadas sugere que as células adaptadas desenvolveram mecanismos de protecção contra o stress oxidativo que eventualmente estão a experienciar durante a exposição aos sucos gástricos e que as células não adaptadas são obrigadas a sintetizar para conseguirem ultrapassar esta barreira. Foram ainda identificadas duas proteínas envolvidas na resposta ao stress do suco intestinal e

bílis, a Clp protease que degrada as proteínas mal configuradas (Nair *et al*, 2000) e a bomba de prótons ATPase F1 que actua na manutenção do pH intracelular (Cotter e Hill, 2003). As células de *L. monocytogenes* C882 parecem experienciar baixos valores de pH quando são submetidas aos sucos intestinais, uma vez que evidenciam uma maior produção de proteínas envolvidas em respostas a valores de pH baixos, no entanto as proteínas são diferentes; nas células adaptadas é o sistema GAD o mais expresso, enquanto que nas células não adaptadas foi identificada a bomba de prótons ATPase.

3.3 Avaliação do potencial de virulência em *Galleria mellonella*

De modo a esclarecermos se uma prévia adaptação a baixos valores de pH e presença de sal contribuem para um maior potencial de virulência, utilizou-se o modelo de *G. mellonella*. Recorde-se que as células adaptadas apresentaram uma menor abundância de actina em comparação com as células não adaptadas. Neste ensaio foram infectadas 10 larvas com cerca de $4,0 \times 10^6$ CFU/larva para ambas as estirpes C882 e ScottA. Para estudar a virulência da bactéria *L. monocytogenes* C882 inoculou-se 10 μ l da suspensão inicial nas larvas de *Galleria mellonella*. Como estirpe de referência foi utilizada a estirpe *L. monocytogenes* ScottA. A sobrevivência das larvas durante o período de 5 dias está representada na Figura 11 e 12. A estirpe mais virulenta neste modelo foi a estirpe C882. Após 2 dias da infecção a sobrevivência das larvas foi nula quando foram infectadas com células não adaptadas e de 20% para o caso das larvas infectadas com as células adaptadas, em contraste com a estirpe Scott A onde se registou uma sobrevivência de cerca 80%, quer para as larvas infectadas com as células adaptadas, quer com as células não adaptadas. Nas estirpes estudadas a prévia adaptação a baixos valores de pH e presença de sal não contribuiu para um maior potencial de virulência, pois não se registaram diferenças significativas ($P > 0,05$) na sobrevivência de *G. mellonella* infectada com as células adaptadas e não adaptadas.

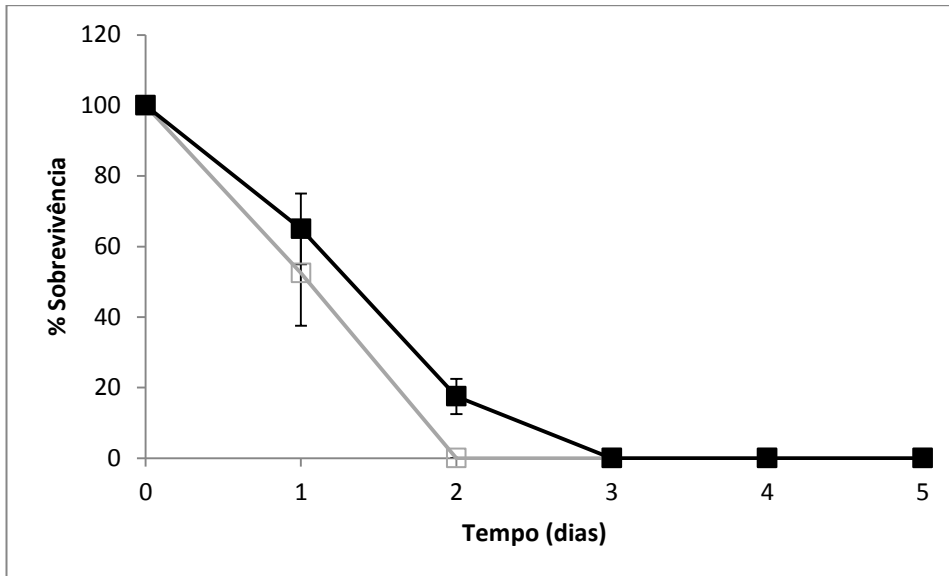


Fig. 11 - Sobrevivência das larvas inoculadas com as células adaptadas (pH 5,5 e 3,5% (p/v) NaCl) (-■-) e não adaptadas (pH 7,0 sem adição de NaCl) (-□-) de *L. monocytogenes* C882 em meio SQ. Os dados representam a média de quatro réplicas. As barras de erro representam o valor do desvio padrão.

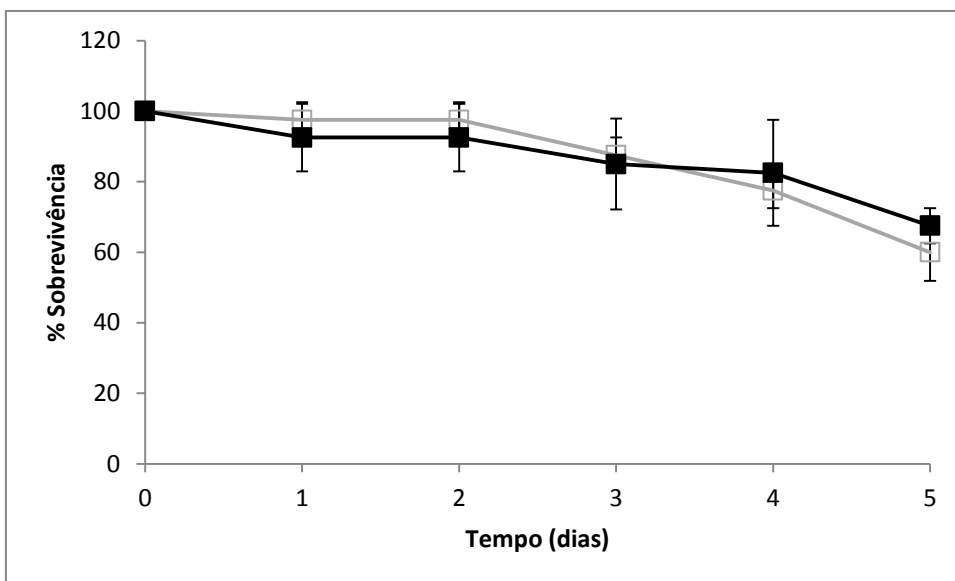


Fig. 12 - Sobrevivência das larvas inoculadas com as células adaptadas (pH 5,5 e 3,5% (p/v) NaCl) (-■-) e não adaptadas (pH 7,0 sem adição de NaCl) (-□-) de *L. monocytogenes* Scott A em meio SQ. Os dados representam a média de quatro réplicas. As barras de erro representam o valor do desvio padrão.

Durante o processo de desenvolvimento da infecção com as estirpes C882 e Scott A foi observado o aumento gradual da pigmentação das larvas e que está representado na Figura 13. As larvas injectadas com a suspensão controlo (PBS) não desenvolveram a pigmentação durante o ensaio (Fig. 13A). O desenvolvimento desta pigmentação é devido a melanização (Joyce e Gahan, 2010).



Fig. 13 - Várias etapas do desenvolvimento da pigmentação após a infecção das larvas de *G. mellonella* com a estirpe *L. monocytogenes* C882. A: Antes das larvas serem infectadas (T=0); B: Após 12h da infecção; C: Após 24h; D: Após 36h; E: Após 48h; F: Após 72h. As larvas controlo permaneceram sem o desenvolvimento da pigmentação até ao final do ensaio (5 dias) como se observa em A.

3.4 Cinética do crescimento de *L. monocytogenes* em *Galleria mellonella*

Como foi observado uma maior virulência da estirpe C882, em comparação com a estirpe clínica Scott A a possibilidade de esta capacidade estar ligada a um maior crescimento da estirpe C882 no insecto, relativamente à estirpe Scott A foi avaliada pela análise da cinética do crescimento das estirpes durante 24 h após a infecção. Os resultados são ilustrados nas Figuras 14 e 15. O crescimento das estirpes C882 e Scott A em *G. mellonella* é semelhante ($P>0,05$) para qualquer uma das estirpes. Observa-se um decréscimo da viabilidade logo após a infecção até às 4 horas e após 6 horas o número de bactérias aumenta, de modo pouco significativo e mantém-se estável até às 24 h.

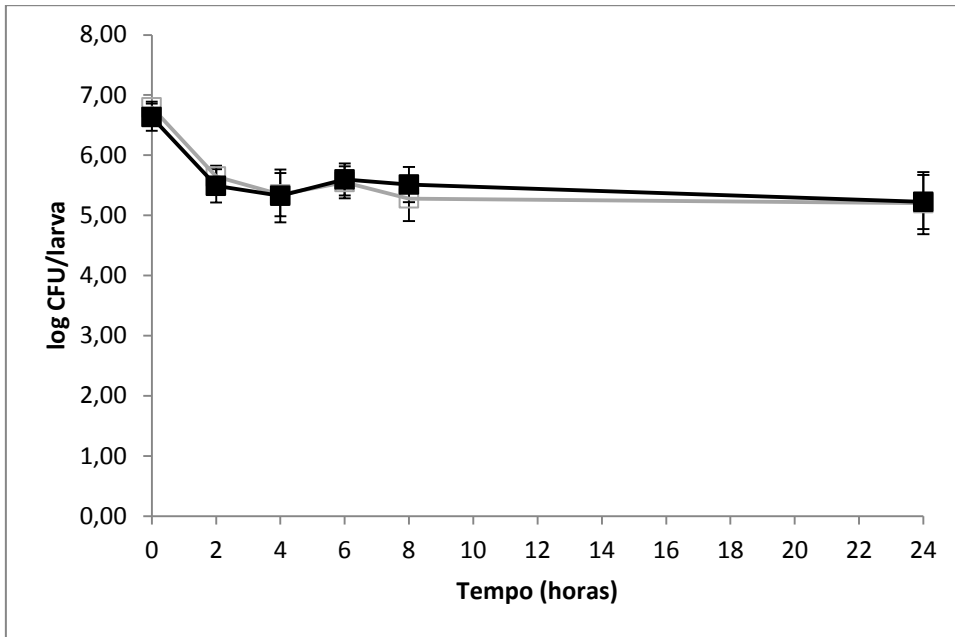


Fig. 14 – Cinética do crescimento das células adaptadas (pH 5,5 e 3,5% (p/v) NaCl) (-■-) e não adaptadas (pH 7,0 sem adição de sal) (-□-) de *L. monocytogenes* C882 em *G. mellonella* após 2, 4, 6, 8 e 24 horas da infecção. Os dados são a média de 5 larvas. As barras de erro representam o desvio padrão.

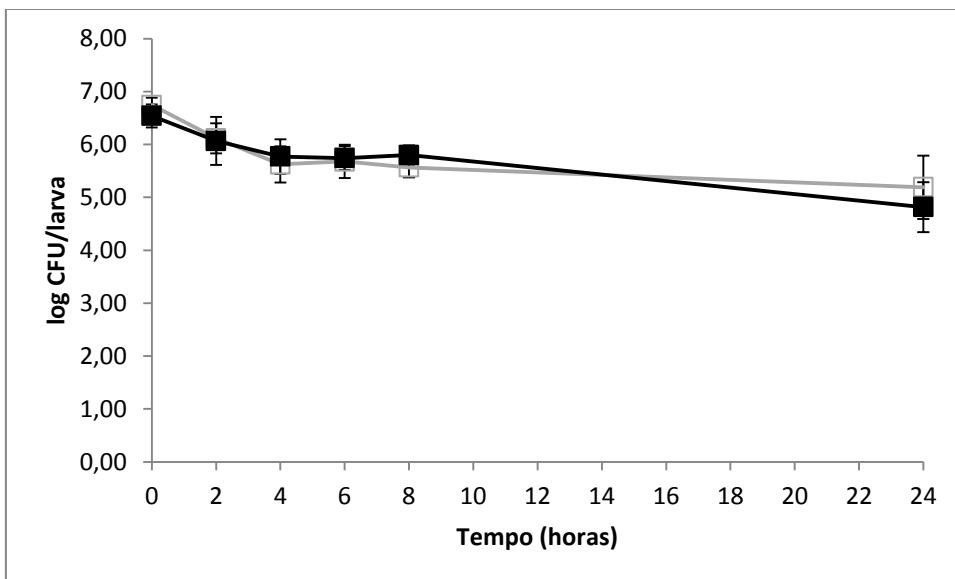


Fig. 15 – Cinética do crescimento das células adaptadas (pH 5,5 e 3,5% (p/v) NaCl) (-■-) e não adaptadas (pH 7,0 sem adição de sal) (-□-) de *L. monocytogenes* Scott A em *G. mellonella* após 2, 4, 6, 8 e 24 horas da infecção. Os dados são a média de 5 larvas. As barras de erro representam o desvio padrão.

3.5 Expressão dos genes de virulência

Como se observou no ponto anterior (3.4) a sobrevivência das larvas não foi afectada pelo número de células adaptadas e não adaptadas de *L. monocytogenes* C882 e ScottA. De modo a esclarecer esta capacidade a expressão de alguns genes de virulência, nomeadamente, *hly*, *actA* e *inlA* foi avaliada por PCR em tempo real nas células adaptadas e não adaptadas. Os valores de eficiência dos *primers* utilizados para os genes em estudo foram semelhantes (Tabela 9). A expressão relativa dos genes referidos está indicada na Figura 16. O gene endógeno utilizado foi o gene *rpsP*.

Tabela 9: Eficiência do gene endógeno *rpsP* e dos genes alvo *inlA*, *hly* e *actA*.

Os valores de eficiência são a média de duas réplicas \pm desvio padrão.

Gene	Eficiência
<i>rpsP</i>	90,09 \pm 0,03
<i>inlA</i>	90,21 \pm 0,23
<i>hly</i>	90,19 \pm 0,04
<i>actA</i>	90,22 \pm 0,16

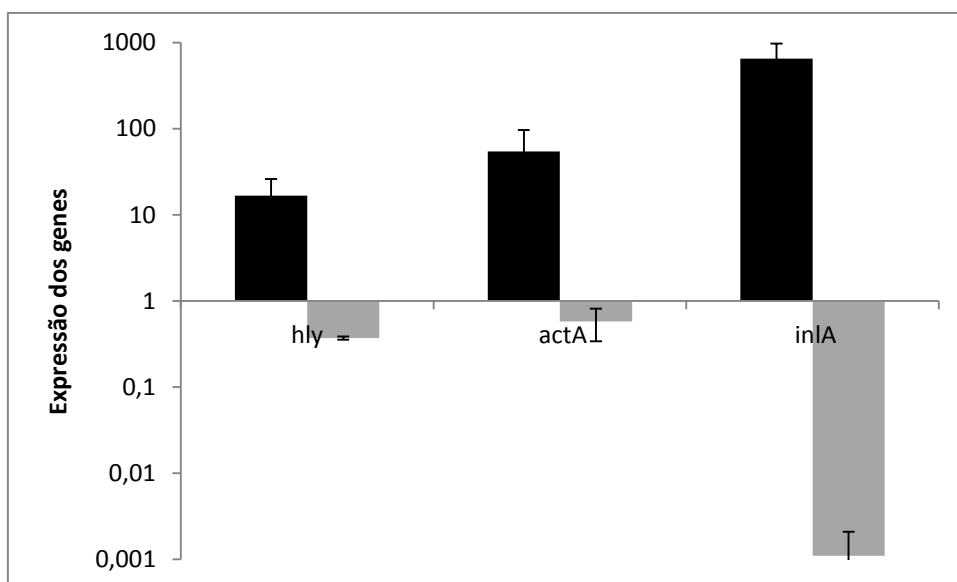


Figura 16 – Expressão relativa dos genes de virulência *inlA*, *hly* e *actA* nas células adaptadas em comparação com as células não adaptadas de *Listeria monocytogenes* ScottA (■) e C882 (■). Os valores representam a média de três réplicas. As barras representam o desvio padrão.

A expressão relativa dos genes de virulência *inlA*, *hly* e *actA* nas células adaptadas foi baixa na estirpe *L. monocytogenes* C882 em contraste com a estirpe ScottA. No estudo conduzido por Joyce e Gahan, 2010 foi demonstrado a essencialidade do gene *hly* para a virulência de *L. monocytogenes* em *G. mellonella*. No entanto, uma maior expressão deste gene não assegura um maior potencial de virulência, nem a menor expressão de outros genes, como *actA* e *hly* é indicativo de um menor potencial de virulência. Este estudo sugere que outros factores estão envolvidos na patogenicidade das estirpes de *L. monocytogenes*, muito provavelmente a capacidade das diferentes estirpes resistirem ao sistema imunitário dos insectos.

Capítulo IV – Conclusões

4.1 Conclusões

Os dados obtidos no presente estudo possibilitaram verificar a elevada resistência da estirpe *L. monocytogenes* C882 aos sucos gastrointestinais. Quer as células adaptadas ou não adaptadas quando expostas aos sucos gástrico e intestinal foram capazes de atingir 100% de sobrevivência.

A análise proteómica permitiu verificar que a exposição a condições sub-letais (pH 5,5 e 3,5% (p/v) NaCl) em meio de simulação de queijo levou a alterações em alguns grupos funcionais de proteínas, nomeadamente as células adaptadas apresentaram uma maior abundância de proteínas ligadas 1) ao metabolismo dos hidratos de carbono, 2) síntese de ácidos nucleicos, 3) proteínas envolvidas em reacções de oxidação-redução e apenas foi identificada uma proteína de resposta ao stress, a *chaperone* de 33 kDa ou HSP33. Em comparação com as células não adaptadas verificou-se uma menor abundância de duas proteínas em particular, o factor de virulência ActA, e a proteína de choque térmico ao frio, cspLA.

Em condições de stress ácido (suco gástrico, pH 2,5) as células adaptadas apresentaram alterações no perfil proteico após as 2 h de exposição em comparação com as células não adaptadas. Os grupos funcionais com variação foram 1) hidrólise, 2) síntese de aminoácidos, 3) resposta a condições de stress, 4) síntese de vitaminas, 5) síntese proteica e 6) metabolismo dos hidratos de carbono. Particular interesse pelo seu possível envolvimento na protecção das células na presença dos sucos gástricos podemos salientar a proteína da família das proteínas de stress universais (Usp), a metionina aminopeptidase e o factor de elongação G. Em comparação com as células não adaptadas verificou-se a menor abundância do *chaperone* groES e a proteína de choque térmico ao frio, cspLA. Estas duas proteínas podem ter um papel relevante na resposta ao stress ácido pelas células não adaptadas.

Durante a exposição às condições de stress osmótico provocado pela exposição aos sucos intestinais o perfil proteico das células adaptadas evidenciou diferenças significativas relativamente ao perfil proteico das células não adaptadas. Foram registadas alterações na abundância das proteínas de vários grupos funcionais; 1) síntese proteica, 2) metabolismo dos hidratos de carbono, 3) resposta ao stress, 4) regulação e

5) percepção de quórum. Os grupos funcionais com maior número de proteínas identificadas foram o grupo da síntese proteica e o metabolismo dos hidratos de carbono. Esta observação sugere que as células adaptadas direccionam os seus mecanismos de sobrevivência em condições de stress osmótico, em particular o causado pelos sucos intestinais através de alterações no seu metabolismo e uma maior produção de elementos que não só participam na síntese proteica, mas também actuam como *chaperones*, como é o caso dos factores de alongação EF-Tu e EF-G. Foi identificada uma proteína do grupo de percepção de quórum com maior abundância nas células adaptadas que nunca foi descrita em respostas de resistência a condições de stress, a feromona ABC transportadora. No que diz respeito a proteínas com menor abundância nas células adaptadas em comparação com as células não adaptadas verificamos uma menor abundância de proteínas ligadas ao combate ao stress oxidativo (SOD, Dpr e ferritina) e uma menor abundância de outras duas proteínas, a Clp e ATPase que estão envolvidas no combate a condições de stress osmótico e ácido, respectivamente. Estas proteínas no seu conjunto permitirão às células não adaptadas transpor as condições de stress induzidas pelos sucos intestinais.

Podemos então concluir que as células adaptadas e não adaptadas conseguem ultrapassar as barreiras do stress ácido e osmótico criadas pelos sucos gástricos e intestinal através de estratégias moleculares diferentes.

Foi observado que as células adaptadas apresentaram uma menor abundância do factor de virulência ActA, embora a identificação de outros factores de virulência, como Hly não foram identificados, muito provavelmente pela limitação financeira do número de pontos proteicos a identificar sabemos que a actina e a listeriolisina O, entre outros são reguladas por um regulador de transcrição comum, o PrfA, pelo que fomos avaliar o seu potencial de virulência num modelo de fácil acesso e que foi comprovada a sua utilidade na avaliação da patogenicidade de *L. monocytogenes*, a larva da cera, *G. mellonella*. Com a utilização deste modelo foi possível verificar que a estirpe C882 é mais virulenta que a estirpe de origem clínica Scott A utilizada como referência. Não se detectou diferenças significativas ($P > 0,05$) na sobrevivência das larvas infectadas com as células adaptadas ou com células não adaptadas. A elevada virulência da estirpe C882 avaliada no modelo *G. mellonella* está de acordo com dados anteriores onde se determinou a virulência desta estirpe em ratinhos (Faleiro *et al*, 2003). Através da análise da expressão relativa dos genes de virulência, *inlA*, *hly* e *actA* verificou-se que, tal como previsto a expressão relativa destes genes nas células adaptadas foi inferior em

comparação com as células não adaptadas. No entanto esta baixa expressão não explica o mesmo potencial de virulência encontrado nas células adaptadas e não adaptadas, pelo que se coloca a hipótese desta estirpe apresentar elevada resistência aos mecanismos de defesa do hospedeiro.

Um dos impactos significativos do presente estudo prende-se com o reconhecimento das extraordinárias capacidades fisiológicas desta importante bactéria onde podemos encontrar estirpes capazes de responder com uma marcante plasticidade nos mecanismos moleculares que lhe permitem ultrapassar uma das mais importantes barreiras do hospedeiro. Obtivemos nova informação sobre os processos fisiológicos que a bactéria *L. monocytogenes* pode utilizar perante os desafios à sua sobrevivência e que faz com elevado sucesso. Estes aspectos são igualmente importantes no design de novas estratégias de controlo deste patogénico de origem alimentar devido à semelhança de condições de stress que a bactéria pode encontrar durante o processamento de alimentos, como o stress ácido e osmótico.

4.2 Perspectivas futuras

Os resultados obtidos na análise dos diferentes mecanismos moleculares implicados na sobrevivência de *L. monocytogenes* C882 permitem-nos avançar com algumas hipóteses a testar em trabalho futuro, nomeadamente:

1. Testar a essencialidade dos genes *lmo1578* e *lmo1354* (metionina aminopeptidases putativas) e o seu envolvimento em respostas de tolerância através de mutagénesis condicional e através de fusões de transcrição com uma proteína fluorescente verde (GFP) e ainda a avaliação da sua actividade.
2. Avaliar a participação do péptido de sinal, feromona ABC transportador nas respostas de resistência em células não adaptadas através da técnica de Northern blot e através de técnicas de interacção proteína-proteína para identificação das possíveis ligações com outras proteínas.
3. Avaliar através de microarrays e da técnica Electroforese bi-dimensional de Diferença de Fluorescência (2-DIGE) o perfil de expressão das células adaptadas e não adaptadas durante o processo infeccioso das larvas *G. mellonella*. Avaliar a sobrevivência das células adaptadas e não adaptadas em macrófagos e utilizar as técnicas acima referidas na avaliação da expressão durante a passagem pelos macrófagos de ratinho.

Capítulo V - Bibliografia

- Adrião, A., Vieira, M., Fernandes, I., Barbosa, M., Sol, M., Tenreiro, R.P., Chambel, L., Barata, B., Zilhao, I., Shama, G., Perni, S., Jordan, S.J., Andrew, P.W., Faleiro, M.L. (2008). Marked intra-strain variation in response of *Listeria monocytogenes* dairy isolates to acid and salt stress and the effect of acid and salt adaptation on adherence to abiotic surface. *International Journal of Food Microbiology* 123: 142 – 150.
- Aebersold, R., Mann, M. (2003). Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 422: 198 – 207.
- Akbas, M.Y., Ölmez, H. (2007). Inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* on iceberg lettuce by dip wash treatments with organic acids. *Letters in Applied Microbiology* 44: 619 – 624.
- Allerberger, F., Wagner, M. (2009). Listeriosis: a resurgent foodborne infection. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 16: 16 – 23.
- Almeida, G.N., Gibbs, P.A., Hogg, T.A., Teixeira, P.C. (2006). Listeriosis in Portugal: an existing but under reported infection. *BMC Infectious Diseases* 6: 153 – 156.
- Balestrino, D., Hamon, M.A., Dortet, L., Nahori, M-A., Pizarro-Cerda, J., Alignani, D., Dussurget, O., Cossart, P., Toledo-Arana, A. (2010). Single-cell techniques using chromosomally tagged fluorescent bacteria to study *Listeria monocytogenes* infection processes. *Applied and Environmental Microbiology* 76: 3625 – 3636.
- Bakardjiev, A.I., Stacy, B.A., Fisher, S.J., Portnoy, D.A. (2004). Listeriosis in the pregnant guinea pig: a model of vertical transmission. *Infection and Immunity* 72: 489 – 497.
- Barmpalia-Davis, I.M., Geornaras, I., Kendall, P.A., Sofos, J.N. (2008). Differences in survival among thirteen *Listeria monocytogenes* strains in a dynamic model of the stomach and small intestine. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 5563 – 5567.
- Becker, L.A., Evans, S.N., Hutkins, R.W., Benson, A.K. (2000). Role of σ^B in adaptation of *Listeria monocytogenes* to growth at low temperature. *Journal of Bacteriology* 182: 7083 – 7087.
- Begley, M., Gahan, C.G.M., Hill, C. (2005). The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiology Reviews* 29: 625 – 651.

- Begley, M., Hill, C., Gahan, C.G.M. (2006). Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 1729 – 1738.
- Bierne, H., Cossart, P. (2007). *Listeria monocytogenes* surface proteins: from genome predictions to function. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 71: 377 – 397.
- Bille, J., Blanc, D.S., Schmid, H., Boubaker, K., Baumgartner, A., Siegrist, H.H., Tritten, M.L., Lienhard, R., Berner, D., Anderau, R., Treboux, M., Ducommun J.M., Malinverni, R., Genné, D., Erard, P.H., Waespi, U. (2006). Outbreak of human listeriosis associated with tomme cheese in northwest Switzerland, 2005. *Eurosurveillance* 11: 91 – 93.
- Boerlin, P., Rocourt, J., Grimont, F., Grimont, P. A. D., Jacquet, C., and Piffaretti, J.C. (1992). *Listeria ivanovii* subsp. londoniensis subsp. nov. *International Journal Systemic Bacteriology* 42: 69 – 73.
- Bonazzi, M., Lecuit, M., Cossart, P. (2009). *Listeria monocytogenes* internalin and E-cadherin: from structure to pathogenesis. *Cellular Microbiology* 5: 693 – 702.
- Bozzi, M., Mignogna, G., Stefanini, S., Barra, D., Longhi, C., Valenti, P., Chiancone, E. (1997). A novel non-heme iron-binding ferritin related to the DNA-binding proteins to the Dps family in *Listeria innocua*. *The Journal of Biological Chemistry* 272: 3259 – 3265.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248 – 254.
- Büla, C.J., Bille, J., Glauser, M.P. (1995). An epidemic of food-borne listeriosis in western Switzerland: description of 57 cases involving adults. *Clinical Infectious Diseases* 20: 66 – 72.
- Cacace, G., Mazzeo, F., Sorrentino, A., Spada, V., Malorni, A., Siciliano R.A. (2010). Proteomics for the elucidation of cold adaptation mechanisms in *Listeria monocytogenes*. *Journal of Proteomics* 73: 2021 – 2030.
- Caldas, T., Laalami, S., Richarme, G. (2000). Chaperone properties of bacterial elongation factor EF-G and initiation factor IF2. *The Journal of Biological Chemistry* 275: 855 – 860.
- Camejo, A., Buchrieser, C., Couvé, E., Carvalho, F., Reis, O., Ferreira, P., Sousa, S., Cossart, P., Cabanes, D. (2009). *In vivo* transcriptional profiling of *Listeria*

- monocytogenes* and mutagenesis identify new virulence factors involved in infection. Plos Pathogens 5.
- Camilli, A., Bassler, B.L. (2006). Bacterial small-molecule signaling pathways. Science 311: 1113 – 1116.
- Carlin, F., Gontard, N., Reich, M., Nguyen-The, C. (2001). Utilization of zein coating and sorbic acid to reduce *Listeria monocytogenes* growth on cooked sweet corn. Journal of Food Science 66: 1385 – 1389.
- CCDR. (2003). First documented outbreak of *Listeria monocytogenes* in Quebec, 2002. Canada Communicable Disease Report 29.
- CDC. Centers for disease control and prevention (2011).
- Chan, Y.C., Wiedmann, M. (2008). Physiology and genetics of *Listeria monocytogenes* survival and growth at low temperatures. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 49: 237 – 253.
- Chander, M., Setlow, P., Lamani, E., Jedrzejak, M.J. (1999). Structural studies on a 2,3-diphosphoglycerate independent phosphoglycerate mutase from *Bacillus stearothermophilus*. Journal of Structural Biology 126: 156 – 165.
- Chang, S.Y., McGary, E.C., Chang, S. (1989). Methionine aminopeptidase gene of *Escherichia coli* is essential for cell growth. Journal of Bacteriology 171: 4071 – 4072.
- Charpentier, E., Courvalin, P. (1999). Antibiotic resistance in *Listeria* spp. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 43: 2103 – 2108.
- Chorianopoulos, N., Giaouris, E., Grigoraki, I., Skandamis, P., Nychas G-J. (2011). Effect of acid tolerance response (ATR) on attachment of *Listeria monocytogenes* Scott A to stainless steel under extended exposure to acid or/and salt stress and resistance of sessile cells to subsequent strong acid challenge. International Journal of Food Microbiology 145: 400 – 406.
- Clauss, H.E., Lorber, B. (2008). Central nervous system infection with *Listeria monocytogenes*. Current Infectious Disease Reports 10: 300 – 306.
- Comissão Europeia. (2005). Commission regulation (EC) No2073/2005 of 15 November 2005 on Microbiological criteria for foodstuffs. Official Journal of the European Union.
- Comité de nomenclatura. (1954). International bulletin of bacteriological nomenclature and taxonomy 4: 141 – 158.

- Conly, J.M., Johnston, B.L. (2008). *Listeria*: A persistent food-borne pathogen. The Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology 19: 327 – 328.
- Conte, M.P., Longhi, C., Polidoro, M., Petrone, G., Buonfiglio, V., Di Santo, S., Papi, E., Seganti, L., Visca, P., Valenti, P. (1996). Iron availability affects entry of *Listeria monocytogenes* into the enterocytelike cell line Caco-2. Infection and Immunity 64: 3925 – 3929.
- Cossart, P., Lecuit, M. (1998). Interactions of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells during entry and actin-based movement: bacterial factors, cellular ligands and signaling. The EMBO Journal 17: 3797 – 3806.
- Cotter, P.D., Gahan, C.G.M, Hill, C. (2001). A glutamate decarboxylase system protects *Listeria monocytogenes* in gastric fluid. Molecular Microbiology 40: 465 – 475.
- Cotter, P.D., Hill, C., (2003). Surviving the acid test: responses of Gram-positive bacteria to low pH. Microbiology and Molecular Biology Reviews 67: 429 - 453.
- Czuprynski, C.J., Faith, N.G., Steinberg, H. (2003). A/J mice are susceptible and C57BL/6 mice are resistant to *Listeria monocytogenes* infection by intragastric inoculation. Infection and Immunity 71: 682 – 689.
- Dallmier, A.W., Martin, S.E. (1990). Catalase, superoxide dismutase, and hemolysin activities and heat susceptibility of *Listeria monocytogenes* after growth in media containing sodium chloride. Applied and Environmental Microbiology 56: 2807 – 2810.
- Dalton, C.B., Austin, C.C., Sobel, J., Hayes, P.S., Bibb, W.F., Graves, L.M., Swaminathan, B., Proctor, M.E., Griffin, P.M. (1997). An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. The New England Journal of Medicine 336: 100 – 105.
- Danielsson-Tham, M-L., Eriksson, E., Helmersson, S., Leffler, M., Lüdtkke, L., Steen, M., Sorgjerd, S., Tham, W. (2004). Causes behind a human cheese-borne outbreak of gastrointestinal listeriosis. Foodborne Pathogens and Disease 1: 153 – 159.
- Davis, M.J., Coote, P.J., O’Byrne, C.P. (1996). Acid tolerance in *Listeria monocytogenes*: the adaptive acid tolerance response (ATR) and growth-phase-dependent acid resistance. Microbiology 142: 2975 – 2982.
- Dickson, J.S., Cutter, C.G., Siragusa, G.R. (1994). Antimicrobial effects of trisodium phosphate against bacteria attached to beef tissue. Journal of Food Protection 57: 952 – 955.

- Duché, O., Trémoulet, F., Glaser, P., Labadie, J. (2002). Salt stress proteins induced in *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 1491 – 1498.
- Dussurget, O., Cabanes, D., Dehoux, P., Lecuit, M., the European Listeria Genome Consortium, Buchrieser, C., Glaser, P., Cossart, P. (2002). *Listeria monocytogenes* bile salt hydrolase is a PrfA-regulated virulence factor involved in the intestinal and hepatic phases of listeriosis. *Molecular Microbiology* 45: 1095 – 1106.
- Dussurget, O., Dumas, E., Archambaud, C., Chafsey, I., Chambon, C., Hébraud, M., Cossart, P. (2005). *Listeria monocytogenes* ferritin protects against multiple stresses and is required for virulence. *FEMS Microbiology Letters* 250: 253 – 261.
- Dykes, G.A., Moorhead, S.M. (2000). Survival of osmotic and acid stress by *Listeria monocytogenes* strains of clinical or meat origin. *International Journal of Food Microbiology* 56: 161 – 166.
- Encontro Internacional sobre Doenças Emergentes e Vigilância. (2009). Abstract 10.098.
- Faleiro, M. L., Andrew, P. W., Power, D. (2003). Stress response of *Listeria monocytogenes* isolate from cheese and other foods. *International Journal of Food Microbiology* 84: 207 – 216.
- Faleiro, M.L., (2011). Response of Foodborne Bacteria to Acid Shock. In *Stress Response of Foodborne Microorganisms*, Ed. Wong, HC. Nova Science Publishers, Inc. ISBN 978-1-61122-810-6 (no prelo).
- Farber, J., Peterkin, P. (1991). *Listeria monocytogenes*, a food borne pathogen. *Microbiology Reviews*, 55: 476 – 511.
- Fleming, D.W., Cochi, S.L., MacDonald, K.L., Brondum, J., Hayes, P.S., Plikaytis, B.D., Holmes, M.B., Audurier, A, Broome, C.V., Reingold, A.L. (1985). Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *The New England Journal of Medicine* 312: 404 – 407.
- Folio, P., Chavant, P., Chafsey, I., Belkorchia, A., Chambon, C., Hébraud, M., (2004). Two-dimensional electrophoresis database of *Listeria monocytogenes* EGDe proteome and proteomic analysis of mid-log and stationary growth phase cells. *Proteomics* 4:3187-3201.
- Freitag, N.E., Rong, L., Portnoy, D.A. (1993). Regulation of the *PrfA* transcriptional activator of *Listeria monocytogenes*: multiple promoter elements contribute to

- intracellular growth and cell-to-cell spread. *Infection and Immunity* 61: 2537 – 2544.
- Freitag, N.E., Port, G.C., Miner, M.D. (2009). *Listeria monocytogenes* – from saprophyte to intracellular pathogen. *Nature Reviews Microbiology* 7: 623 – 628.
- Fretz, R., Sagel, U., Ruppitsch, W., Pietzka, A.T., Stöger, A., Huhulescu, S., Heuberger, S., Pichler, J., Much, P., Pfaff, G., Stark, K., Prager, R., Flieger, A., Feenstra, O., Allerberger, F. (2010). Listeriosis outbreak caused by acid curd cheese ‘Quargel’, Austria and Germany 2009. *Eurosurveillance* 15.
- Gandhi, M., Chikindas, M.L. (2007). *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology* 113: 1 – 15.
- Gardan, R., Duché, O., Leroy-Sétrin, S., Labadie, J., European *Listeria* genome consortium. (2003). Role of *ctc* in *Listeria monocytogenes* in osmotolerance. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 154 – 161.
- Geoffroy, C., Gaillard, J-L., Alouf, J.E., Berche, P. (1987). Purification, characterization, and toxicity of the sulfhydryl-activated hemolysin listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity* 55: 1641 – 1646.
- Giglione, C., Vallon, O., Meinel, T. (2003). Control of protein life- span by N-terminal methionine excision. *The EMBO Journal* 22: 13 – 23.
- Gill, D.A. (1933). Circling disease: a meningoencephalites of sheep in New Zealand. Notes on a new species of pathogenic organism. *The Veterinary Journal* 89: 258 – 270.
- Glaser, P., Frangeul, L., Buchrieser, C., Amend, A., Baquero, F., Berche, P., Bloecker, H., Brandt, P., Chakraborty, T., Charbit, A., Chetouani, F., Couve, E., de Daruvar, A., Dehoux, P., Domann, E., Dominguez-Bernal, G., Duchaud, E., Durand, L., Dussurget, O., Entian, K.-D., Fsihi, H., Garcia-Del Portillo, F., Garrido, P., Gautier, L., Goebel, W., Gomez-Lopez, N., Hain, T., Hauf, J., Jackson, D., Jones, L.-M., Karst, U., Kreft, J., Kuhn, M., Kunst, F., Kurapkat, G., Madueno, E., Maitournam, A., Mata Vicente, J., Ng, E., Nordsiek, G., Novella, S., de Pablos, B., Perez-Diaz, J.-C., Rimmel, B., Rose, M., Rusniok, C., Schlueter, T., Simoes, N., Tierrez, A., Vazquez-Boland, J.-A., Voss, H., Wehland, J., Cossart, P. (2001). Comparative genomics of *Listeria* species. *Science* 294: 849 – 852.
- Görg, A., Weiss, W., Dunn, M.J. (2004). Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* 4: 3665 – 3685.

- Gottlieb, S.L., Newbern, E.C., Griffin, P.M., Graves, L.M., Hoekstra, R.M., Baker, N.L., Hunter, S.B., Holt, K.G., Ramsey, F., Head, M., Levine, P., Johnson, G., Schoonmaker-Bopp, D., Reddy, V., Kornstein, L., Gerwel, M., Nsubuga, J., Edwards, L., Stonecipher, S., Hurd, S., Austin, D., Jefferson, M.A., Young, S.D., Hise, K., Chernak, E.D., Sobel, J. (2006). Multistate outbreak of listeriosis linked to turkey deli meat and subsequent changes in US regulatory policy. *Clinical Infectious Disease* 42: 29 – 36.
- Goulet, V., Rocourt, J., Rebiere, I., Jacquet, C., Moyse, C., Dehaumont, P., Salvat, G., Veit, P. (1998). Listeriosis outbreak associated with consumption of rillettes in France in 1993. *The Journal of Infectious Diseases* 177: 155 – 160.
- Graves, L.M., Hunter, S.B., Ong, A.R., Schoonmaker-Bopp, D., Hise, K., Kornstein, L., DeWitt, W.E., Hayes, P.S., Dunne, E., Mead, P., Swaminathan, B. (2005). Microbiological aspects of investigation that traced the 1998 outbreak of listeriosis in the United States to contaminated hot dogs and establishment of molecular subtyping-based surveillance for *Listeria monocytogenes* in the pulsenet network. *Journal of Clinical Microbiology* 43: 2350 – 2355.
- Graves, L.M., Hesel, L.O., Steigerwalt, A.G., Morey, R.E., Daneshvar, M.I., Roof, S.E., Orsi, R.H., Fortes, E.D., Millilo, S.R., den Bakker, H.C., Wiedmann, M., Swaminathan, B. Sauders, B.D. (2010). *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 60: 1280.
- Gray, M.L., Killinger, A.H. (1966). *Listeria monocytogenes* and listeric infections. *Bacteriological reviews* 30: 309 – 371.
- Harris, D.C. (2005). Análise química quantitativa. 6ª edição. W.H.Freeman and Company. ISBN 85-216-1423-3.
- Hill, C., O'Driscoll, B., Booth, I. (1995). Acid adaptation and food poisoning microorganisms. *International Journal of Food Microbiology* 28: 245 – 254.
- Hu, Y., Oliver, H.F., Raengpradub, S., Palmer, M.E., Orsi, R.H., Wiedmann, M., Boor, K.J. (2007). Transcriptomic and phenotypic analyses suggest a network between the transcriptional regulators HrcA and σ^B in *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 7981 – 7991.
- Huang YJ., Tsai TY., Pan TM. (2007). Physiological response and protein expression under acid stress of *Escherichia coli* o157:H7 TWC01 isolated from Taiwan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 7182 – 7191.

- Jakob, U., Muse, W., Eser, M., Bardwell, J.C.A. (1999). Chaperone activity with a redox switch. *Cell* 96: 341 – 352.
- Jaradat, Z.W., Bhunia, A.K., (2003). Adhesion, invasion, and translocation characteristics of *Listeria monocytogenes* serotypes in Caco-2 cell and mouse models. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 3640 – 3645.
- Jeffers, G.T., Bruce, J.L., McDonough, P.L., Scarlett, J., Boor, K.J., Wiedmann, M. (2001). Comparative genetic characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from human and animal listeriosis cases. *Microbiology* 147: 1095 – 1104.
- Jensen, A., Frederiksen, W., Gerner-Smidt, P. (1994). Risk factors for listeriosis in Denmark, 1989-1990. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 26: 171 – 178.
- Jiang, L., Olesen, I., Andersen, T., Fang, W., Jespersen, L. (2010). Survival of *Listeria monocytogenes* in simulated gastrointestinal system and transcriptional profiling of stress- and adhesion-related genes. *Foodborne Pathogens and Disease* 7: 267 – 274.
- Johnson, D.C., Dean, D.R., Smith, A.D., Johnson, M.K. (2005). Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters. *Annual Review of Biochemistry* 74: 247 – 281.
- Jones, C. E., Shama, G., Jones, D., Roberts, I.S., Andrew, P.W. (1997). Physiological and biochemical studies on psychrotolerance in *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Microbiology* 83: 31 – 35.
- Jones, D. (1990). Foodborne listeriosis. *The Lancet*, 336: 1171 – 1174.
- Jones, D., Seeliger, H.P.R. (1991). The genus *Listeria*. In: Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., Scheifer, K-H. *The prokaryotes, a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification and application*, vol.II, Springer-Verlag, New York.
- Jordan, S.J., Perni, S., Glenn, S., Fernandes, I., Barbosa, M., Sol, M., Tenreiro, R.P., Chambel, L., Barata, B., Zilhao, I., Aldsworth, T.G., Adrião, A., Faleiro, M.L., Shama, G., Andrew, P.W. (2008). *Listeria monocytogenes* biofilm-associated protein (BapL) may contribute to surface attachment of *L. monocytogenes* but is absent from many field isolates. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 5451 – 5456.
- Joyce, S. A., Gahan, C.G.M. (2010). Molecular pathogenesis of *Listeria monocytogenes* in the alternative model host *Galleria mellonella*. *Microbiology* 156: 3456 – 3468.

- Kagkli, D. M., Tâche, R., Cogan, T. M., Hill, C., Casaregola, S., Bonnarme, P. (2006). *Kluyveromyces lactis* and *Sacharomyces cerevisiae*, two potent deacidifying and volatile-sulphur-aroma-producing microorganisms of the cheese ecosystem. *Applied Microbial and Cell Physiology*, 434 – 442.
- Kavanagh, K., Reeves, E.P. (2004). Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens. *Microbiology reviews* 28: 101 – 112.
- Koch, J., Dworak, R., Prager, R., Becker, B., Brockmann, S., Wicke, A., Wichmann-Schauer, H., Hof, H., Werber, D., Stark, K. (2010). Large listeriosis outbreak linked to cheese made from pasteurized milk, Germany, 2006 – 2007. *Foodborne Pathogens and Disease* 7: 1581 – 1584.
- Kuhn, M., Goebel, W. (1989). Identification of an extracellular protein of *Listeria monocytogenes* possibly involved in intracellular uptake by mammalian cells. *Infection and Immunity* 57: 55 – 61.
- Lecuit, M. (2007). Human listeriosis and animal models. *Microbes and Infection* 9: 1216 – 1225.
- Linnan, M.J., Mascola, L., Xiao, D.L., Goulet, V., May, S., Salminen, C., Hird, D.W., Yonekura, L., Hayes, P., Weaver, R., Audurier, A., Plikaytis, B.D., Fannin, S.L., Kleks, A., Broome, C.V. (1988). Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. *The New England Journal of Medicine* 319: 823 – 828.
- Liu, S. Graham, J.E., Bigelow, L., Morse P.D., Wilkinson, B.J. (2002). Identification of *Listeria monocytogenes* genes expressed in response to growth at low temperature. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 1697 – 1705.
- Loepfe, C., Raimann, E., Stephan, R., Tasara, T. (2010). Reduced host cell invasiveness and oxidative stress tolerance in double and triple *csp* gene family deletion mutants of *Listeria monocytogenes*. *Foodborne Pathogens and Disease* 7: 775 – 783.
- Lowther, W.T., Matthews, B.W. (2000). Structure and function of the methionine aminopeptidases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1477: 157 – 167.
- Lyytikäinen, O., Autio, T., Maijala, R., Ruutu, P., Honkanen-Buzalski, T., Miettinen, M., Hatakka, M., Mikkola, J., Anttila, V-J., Johansson, T., Rantala, L., Aalto, T., Korkeala, H., Siitonen, A. (2000). An outbreak of *Listeria monocytogenes* serotype 3a infections from butter in Finland. *The Journal of Infectious Diseases* 181: 1838 – 1841.

- MacDonald, P.D.M., Whitwam, R.E., Boggs, J.D., MacCormack, J.N., Anderson, K.L., Reardon, J.W., Saah, J.R., Graves, L.M., Hunter, S.B., Sobel, J. (2005). Outbreak of listeriosis among Mexican immigrants as a result of consumption of illicitly produced Mexican-style cheese. *Clinical Infectious Diseases* 40: 677 – 682.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M. (2006). Brock, *Biology of Microorganisms*. 11ª edição. Pearson Education, Inc. ISBN 0-13-196893-9.
- McClure, P.J., Roberts, T.A., Oguru, O. (1989). Comparison of the effects of sodium chloride, pH and temperature on the growth of *Listeria monocytogenes* on gradient plates and in liquid medium. *Letters in Applied Microbiology* 9: 95 – 99.
- McGann, P., Ivanek, R., Wiedmann, M., Boor, K.J. (2007). Temperature-dependent expression of *Listeria monocytogenes* internalin and internalin-like genes suggests functional diversity of these proteins among the listeriae. *Applied Environmental Microbiology* 73: 2806 – 2814.
- McLauchin, J., Hall, S.M., Velani, S.K., Gilbert, R.J. (1991). Human listeriosis and paté: a possible association. *British Medical Journal* 303: 773 – 775.
- McLauchin, J. (1996). The relationship between *Listeria* and listeriosis. *Food Control* 7: 187 – 193.
- Melo, J., Andrew, P.A., Faleiro, M.L. Different assembly of acid and salt tolerance response in *Listeria monocytogenes* (em processo de submissão).
- Miles, A.A.; Misra, S.S., Irwin, J.O., (1938). The estimation of the bactericidal power of the blood. *Journal of hygiene* 38: 732 – 749.
- Miller, C.G., Kukral, A.M., Miller, J.L., Movva, N.R. (1989). *pepM* is an essential gene in *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology* 171: 5215 – 5217.
- Mols, M., Abee, T. (2011). Minireview. Primary and secondary oxidative stress in *Bacillus*. *Environmental Microbiology* 13: 1387 – 1394.
- Mukherjee, K., Altincicek, B., Hain, T., Domann, E., Vilcinskis, A., Chakraborty, T. (2010). *Galleria mellonella* as model system to study *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* 76: 310 – 317.
- Murray, E.G.D., Webb, R.A., Swann, M.B.R., (1926). A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes*. *Journal of Pathology and Bacteriology* 29: 407 – 439.
- Murray, E.G.D. (1955). A characterization of listeriosis in man and other animals. *Canadian Medical Association Journal* 72: 99 – 103.

- Nair, S., Milohanic, E., Berche, P. (2000). ClpC ATPase is required for cell adhesion and invasion of *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity* 68: 7061 – 7068.
- O’Driscoll, B., Gahan, C.G.M., Hill, C. (1996). Adaptive acid tolerance response in *Listeria monocytogenes*: isolation of an acid-tolerant mutant which demonstrates increased virulence. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 1693 – 1698.
- O’Driscoll, B., Gahan, C.G.M., Hill, C. (1997). Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis analysis of the acid tolerance response in *Listeria monocytogenes* LO28. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 2679 – 2685.
- O’Farrell, P.H. (1975). High-Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of proteins. *Journal of Biological Chemistry* 250: 4007 – 4021.
- Olesen, I., Vogensen F.K., Jespersen, L. (2009). Gene transcription and virulence potential of *Listeria monocytogenes* strains after exposure to acidic and NaCl stress. *Foodborne Pathogens and Disease* 6: 669 – 678.
- Olesen, I., Thorsen, L., Jespersen, L. (2010). Relative transcription of *Listeria monocytogenes* virulence genes in liver pâtés with varying NaCl content. *International Journal of Food Microbiology* 141: 60 – 68.
- Olsen, S.J., Patrick, M., Hunter, S.B., Reddy, V., Kornstein, L., MacKenzie, W.R., Lane, K., Bidol, S., Stoltman, G.A., Frye, D.M., Lee, I., Hurd, S., Jones, T.F., LaPorte, T.N., Dewitt, W., Graves, L., Wiedmann, M., Schoonmaker-Bopp, D.J., Huang, A.J., Vincent, C., Bugenhagen, A., Corby, J., Carloni, E.R., Holcomb, M.E., Woron, R.F., Zansky, S.M., Dowdle, G., Smith, F., Ahrabi-Fard, S., Ong, A.R., Tucker, N., Hynes, N.A., Mead, P. (2005). Multistate outbreak of *Listeria monocytogenes* infection linked to delicatessen turkey meat. *Clinical Infectious Diseases* 40: 962 – 967.
- Organização mundial de saúde (2004). Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. Microbiological risk assessment series.
- Pandey, A., Mann, M. (2000). Proteomics to study genes and genomes. *Nature* 405 : 837 – 846.
- Peel, M., Donachie, W., Shaw, A. (1988). Temperature-dependent expression of flagella of *Listeria monocytogenes* studied by electron microscopy, SDS-PAGE and western blotting. *Journal of Genetic Microbiology* 134: 2171 – 2178.
- Pérez-García, C.C., Peña-Penabad, M., Cano-Rábano, M.J., García-Rodríguez, M.B., Gallego-Morales, D., Ríos-Granja, M.A., Díez-Prieto, I. (2002). A simple

- procedure to perform intravenous injections in the mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Laboratory Animals* 37: 68 – 71.
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids research* 29: 2002 – 2007.
- Pinto E., Andrew P.W., Faleiro, M.L. Over production of P60 family proteins, glycolytic and stress response proteins characterize the autolytic profile of *Listeria monocytogenes* (em processo de submissão).
- Poyart-Salmeron, C., Trieu-Cuot, P., Carlier, C., MacGowan, A, McLauchlin, J., Courvalin, P. (1992). Genetic basis of tetracycline resistance in clinical isolates of *Listeria monocytogenes*. *Antimicrobial agents and Chemotherapy* 36: 463 – 466.
- Pron, B., Boumaila, C., Jaubert, F., Sarnacki, S., Monnet, J-P., Berche, P., Gaillard, J-L. (1998). Comprehensive study of the intestinal stage of listeriosis in a rat ligated ileal loop system. *Infection and Immunity* 66. 747 – 755.
- Ramalheira, R., Almeida, M., Azeredo, J., Brandão, T.R.S., Almeida, G., Silva, J., Teixeira, P. (2010). Survival of clinical and food isolates of *Listeria monocytogenes* through simulated gastrointestinal tract conditions. *Foodborne Pathogens and Disease* 7: 121 – 128.
- Rasmussen, O.F., Skouboe, P., Dons, L., Rossen, L., Olsen, J.E., (1995). *Listeria monocytogenes* exists in at least three evolutionary lines: evidence from flagellin, invasive associated protein and listeriolysin O genes. *Microbiology* 141: 2053 – 2061.
- Rasmussen, R. (2001). Quantification on the lightcycler. In Meuer, S., Wittwer, C., Nakagawara, K. (eds). *Rapid cycle real-time PCR methods and applications*. Springer Press. Heidelberg. pp. 21 – 34.
- Roberts, A., Nightingale, K., Jeffers, G., Fortes, E., Kongo, J.M., Wiedmann, M., (2006). Genetic and phenotypic characterization of *Listeria monocytogenes* lineage III. *Microbiology* 152: 685 – 693.
- Rocourt, J., Goulet, V., Lepoutre-Toulemon, A., Jacquet, Ch., Catimel, B., Rebiere, I., Miegerville, A.F., Courtieu, A.L., Pierre, O., Dehaumont, P., Veit, P. (1993). Outbreak of listeriosis in France. *Médecine et Maladies Infectieuses* 23: 482 – 484.
- Ryan, S., Begley, M., Gahan, C.G.M., Hill, C. (2009). Molecular characterization of the arginine deiminase system in *Listeria monocytogenes*: regulation and role in acid tolerance. *Environmental Microbiology* 11: 432 – 445.

- Samant, S., Lee, H., Ghassemi, M., Chen, J., Cook, J.L., Mankin, A.S., Neyfakh, A.A. (2008). Nucleotide biosynthesis is critical for growth of bacteria in human blood. *PLoS Pathogens* 4.
- Samara, A., Koutsoumanis, K.P. (2009). Effect of treating lettuce surfaces with acidulants on the behaviour of *Listeria monocytogenes* during storage at 5 and 20°C and subsequent exposure to simulated gastric fluid. *International Journal of Food Microbiology* 129: 1 – 7.
- Schlech, W.F., Lavigne, P.M., Bortolussi, R.A., Allen, A.C., Haldane, E.V., Wort, A.J., Hightower, A.W., Johnson, S.E., King, S.H., Nicholls, E.S., Broome, C.V. (1983). Epidemic listeriosis – evidence for transmission by food. *New England Journal of Medicine* 308: 203 – 206.
- Schlech, W.F. (2000). Foodborne listeriosis. *Clinical Infectious Diseases* 31: 770 – 775.
- Schmid, B., Klumpp, J., Raimann, E., Loessner, M.J., Stephan, R., Tasara, T. (2009). Role of cold shock proteins in growth of *Listeria monocytogenes* under cold and osmotic stress conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 1621 – 1627.
- Shahamat, M., Seaman, A., Woodbine, M. (1980). Survival of *Listeria monocytogenes* in high salt concentrations. *Zentralblatt für Bakteriologie und Hygiene. I. Abt. Originale A* 246: 506 – 511.
- Sleator, R.D., Wouters, J., Gahan, C.G.M., Abee, T., Hill, C. (2001). Analysis of the role of OpuC, an osmolyte transport system, in salt tolerance and virulence potential of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 2692 – 2698.
- Soni, K.A., Nannapaneni, R., Tasara, T. (2011). The contribution of transcriptomic and proteomic analysis in elucidating stress adaptation responses of *Listeria monocytogenes*. *Foodborne Pathogens and Disease* 8: 843 – 852.
- Stanley-Samuels, D.W., Jensen, E., Nickerson, K.W., Tiebel, K., Ogg, C.L., Howard, R.W. (1991). Insect immune response to bacterial infection is mediated by eicosanoids. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88: 1064 – 1068.
- Stephens, J.C., Roberts, I.S., Jones, D., Andrew, P.W. (1991). Effect of growth temperature on virulence of strains of *Listeria monocytogenes* in the mouse: evidence for a dose dependence. *Journal of Applied Microbiology* 70: 239 – 244.
- Stopforth, J.D., Yoon, Y., Barmpalia, I.M., Samelis, J., Skandamis, P.N., Sofos, J.N. (2005). Reduction of *Listeria monocytogenes* populations during exposure to a

- simulated gastric fluid following storage of inoculated frankfurters formulated and treated with preservatives. *International Journal of Food Microbiology* 99: 309 – 319.
- Swaminathan, B., Gerner-Smidt, P. (2007). The epidemiology of human listeriosis. *Microbes and Infection* 9: 1236 – 1243.
- Taillefer, C., Boucher, M., Laferrière, C., Morin, L. (2010). Perinatal listeriosis: Canada's 2008 outbreaks. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada* 32: 45 – 48.
- TDSHS. (2007). Listeriosis in the Rio Grande valley 2003 – 2008.
- Thévenot, D., Dernburg, A., Vernozy-Rozand, C. (2006). An updated review of *Listeria monocytogenes* in the pork meat industry and its products. *Journal of Applied Microbiology* 101: 7 – 17.
- Trivett, T.L., Meyer, E.A. (1971). Citrate cycle and related metabolism of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Bacteriology* 107: 770 – 779.
- Tsou, C-C., Chiang-Ni, C., Lin, Y-S., Chuang, W-J., Lin, M-J., Liu, C-C., Wu, J-J. (2008). An iron-binding protein, Dpr, decreases hydrogen peroxide stress and protects *Streptococcus pyogenes* against multiple stresses. *Infection and Immunity* 76: 4038 – 4045.
- Van Renterghem, R., Waes, G., de Ridder, H. (1990). Detection of *Listeria monocytogenes* in cheese by DNA colony hybridization. *Milchwissenschaft* 45: 426 – 427.
- Valk, H. de, Vaillant, V., Jacquet, C., Rocourt, J., Querrec, F. Le., Stainer, F., Quelquejeu, N., Pierre, O., Pierre, V., Desenclos, J-C., Goulet, V. (2001). Two consecutive nationwide outbreaks of listeriosis in France, October 1999 – February 2000. *American Journal of Epidemiology* 154: 944 – 950.
- Vasseur, C. Baverel, L., Hébraud M., Labadie J. (1999). Effect of osmotic, alkaline, acid or thermal stresses on the growth and inhibition of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Microbiology* 86: 469 – 476.
- Versantvoort, C.H.M., Oomen, A.G., Kamp, E., Rompelberg, C.J.M., Sips, A.J.A.M., (2005). Applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. *Food and Chemical Toxicology* 43: 31 – 40.
- Vít, M., Olejník, R., Dlhý, J., Karpísková, R., Částková, J., Příkazský, V., Příkazská, M., Benes, C., Petrás, P. (2007). Outbreak of listeriosis in Czech Republic, late 2006 – preliminary report. *Eurosurveillance* 12: 3132

- Voet, D., Voet, J.G. Biochemistry. (2004). 3ª edição. John Wiley & Sons, Inc. ISBN 0-471-19350-x.
- Wang, F., Sampogna, R.V., Ware, B.R. (1989). pH dependence of actin self-assembly. *Journal of Biophysics* 55: 293 – 298.
- Ward, T.J., Ducey, T.F., Usgaard, T., Dunn, K.A., Bielawski, J.P., (2008). Multilocus genotyping assays for single nucleotide polymorphism-based subtyping of *Listeria monocytogenes* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 7629 – 7642.
- Warriner, K., Namvar, A. (2009). What is the hysteria with *Listeria*? *Trends in Food Science & Technology* 20: 245 – 254.
- Wemekamp-Kamphuis H.H., Wouters J.A., de Leeuw P.P., Hain T., Chakraborty T., Abee, T. (2004). Identification of sigma factor σ^B -controlled genes and their impact on acid stress, high hydrostatic pressure, and freeze survival in *Listeria monocytogenes* EGD-e. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 3457 – 3466.
- White, D. (2000). The physiology and biochemistry of prokaryotes. 2ª edição. Oxford University Press. ISBN 0-19-530168-4.
- Wiedmann, M., Arvik, T.J., Hurley, R.J., Boor, K.J. (1998). General stress transcription factor σ^B and its role in acid tolerance and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Bacteriology* 180: 3650 – 3656.
- Wollert, T., Pasche, B., Rochon, M., Deppenmeier, S., van den Heuvel, J., Gruber, A.D., Heinz, D.W., Lengeling, A., Schubert, W-D. (2007). Extending the host range of *Listeria monocytogenes* by rational protein design. *Cell* 129: 891 – 902.
- You, CH., Lu, HG., Sekowska, A., Fang, G., Wang, YP., Gilles, A-M., Danchin, A. (2005). The two authentic methionine aminopeptidase genes are differentially expressed in *Bacillus subtilis*. *BMC Microbiology* 5: 57 – 72.
- Zhang, S., Farber, J.M. (1996). The effect of various disinfectants against *Listeria monocytogenes* on fresh-cut vegetables. *Food Microbiology* 13: 311 – 321.

Anexos

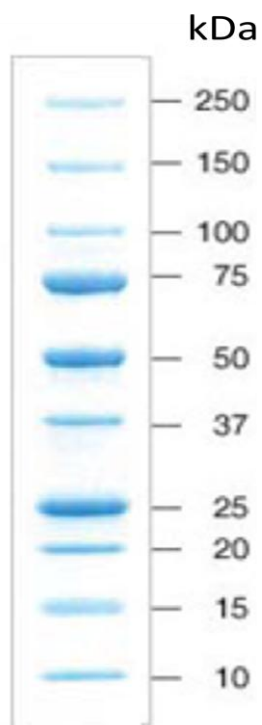


Fig. 17 – Marcador *Precision Plus Protein Prestained Standards, all blue* (Bio-Rad).

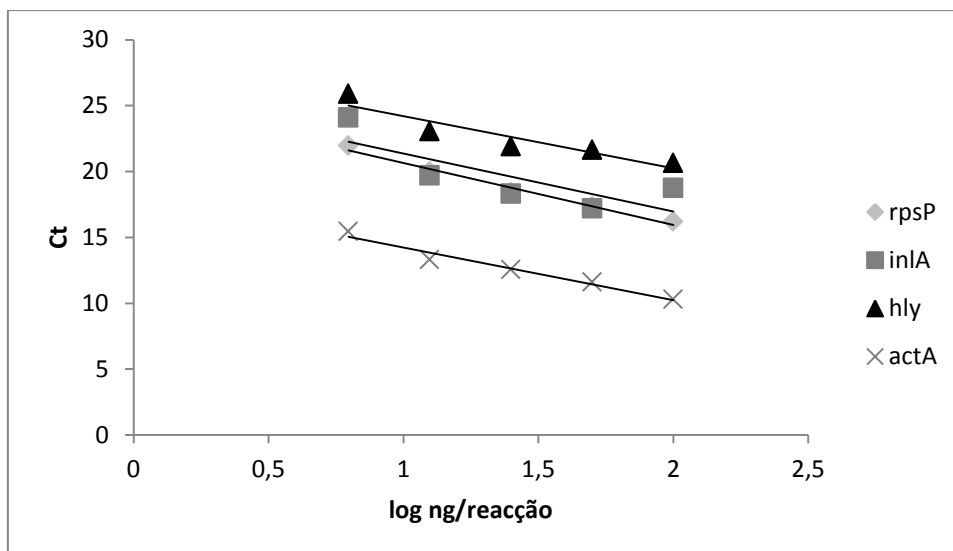


Fig. 18 – Determinação das eficiências dos *primers* utilizados na amplificação do gene endógeno *rpsP* e dos genes alvo, *inlA*, *hly* e *actA*. As eficiências foram calculadas através da equação: $E = (10 + \text{Exp}(m) - 1) * 10$ (Rasmussen, 2001). A recta representa a regressão linear.

Tabela. 10 – Cálculo da eficiência dos *primers*

Gene	Equação da recta	Eficiência
<i>rpsP</i>	$y = -4,7005x + 25,351$	$90,09 \pm 0,03$
<i>inlA</i>	$y = -4,3849x + 25,74$	$90,21 \pm 0,23$
<i>hly</i>	$y = -3,9531x + 28,156$	$90,19 \pm 0,04$
<i>actA</i>	$y = -3,9863x + 18,213$	$90,22 \pm 0,16$